

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 178**

51 Int. Cl.:

C12P 7/46 (2006.01)

C12P 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2014 PCT/EP2014/060807**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014 WO14188000**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2014 E 14727795 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3004363**

54 Título: **Procedimiento para la mejora de un gas combustible durante la producción de ácido succínico**

30 Prioridad:

24.05.2013 EP 13169127

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

30.11.2018

73 Titular/es:

**TECHNICAL UNIVERSITY OF DENMARK (100.0%)
Anker Engelundsvej 1
2800 Kgs. Lyngby, DK**

72 Inventor/es:

**ANGELIDAKI, IRINI;
BRAGI GUNNARSSON, INGÓLFUR y
ALVARADO-MORALES, MERLIN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 692 178 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 para la mejora de un gas combustible durante la producción de ácido succínico

5 **Campo técnico**

La presente invención se relaciona con el campo de mejora de un gas combustible que contiene CO₂ como biogás convirtiendo el contenido de CO₂ del gas combustible en ácido succínico mediante el uso de bacterias que producen ácido succínico.

10

Antecedentes

La producción y la utilización de biogás mediante la digestión anaeróbica de residuos orgánicos es una tecnología de energía alternativa emergente. El biogás se concibe como un elemento clave en la estrategia de energías renovables emergentes en Europa, motivadas por el objetivo de la Unión Europea de conseguir el 20 % de energía renovable en el 2020. El gobierno danés también se propuso un objetivo de utilizar el 50 % del estiércol producido en Dinamarca para la producción de energía renovable en el 2020 y se cumpliría básicamente a través de una fuerte expansión del biogás.

20 El biogás contiene principalmente metano o CH₄(50-75 %) y dióxido de carbono o CO₂(25-50 %). Para que el biogás se pueda utilizar como combustible se debe mejorar. El proceso de mejora elimina los gases no deseados del biogás, principalmente CO₂, pero también otras impurezas del gas. Mejorar el biogás hasta un contenido de CH₄ superior al 90 % no solamente puede aumentar el valor calorífico, sino también reducir la corrosión causada por el gas ácido y, por lo tanto, ampliar la utilización del biogás como fuente de energía renovable.

25

Los procedimientos convencionales de mejora del gas combustible incluyen el lavado con agua, la adsorción por variación de presión, la adsorción de poliglicol y el tratamiento químico, que pretenden eliminar el CO₂ del biogás. Los costes de los procedimientos anteriores son relativamente altos, ya que necesitan o una presión alta o una adición de productos químicos. Además, al eliminar CO₂ del biogás, también se eliminan pequeñas cantidades de CH₄, que posiblemente aumentarán la emisión de gases de efecto invernadero.

30

Otra estrategia es aplicar microorganismos anaeróbicos para convertir CO₂ en CH₄ para mejorar el biogás, con el consumo simultáneo de H₂ (ecuación 1):

35



Este proceso es posible con los organismos metanogénicos cultivados preferentemente en un pH de entre 7-8. El proceso incluye añadir gas que contiene H₂ a un reactor de biogás. Sin embargo, cuando el proceso progresa, el CO₂ del medio de cultivo se consume teniendo como resultado el incremento del pH del medio de cultivo; cuando el pH excede de 8,3 el proceso se inhibe, ya que las condiciones de cultivo para el organismo metanogénico se han vuelto subóptimas. Este proceso se describe, por ejemplo, en WO 2013/060331.Nghiem et al, Applied Biochemistry and Biotechnology (2010) 162:1915-1928, descripción de la producción de ácido succínico de glucosa con y sin dióxido de carbono.Luo et al, Biotechnology and Bioengineering (2012) 109:2729-2736, descripción de mejora de biogás en un reactor de biogás que contiene metanógenos hidrogenotrópico, como Metanobacteriales, para convertir CO₂ a CH₄.Lu et al, 30th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2008, New Orleans, debate sobre los efectos de gas de combustión de centrales eléctricas en producción de succinato. Además, Gunnarsson et al, Seminario de tarde sobre Biorrefinería en la región de Oresund, junio de 2013, presentó partes del presente procedimiento. Se necesitan procedimientos alternativos para mejorar gases combustibles que contienen CO₂.

50 **Resumen**

El biogás producido mediante la digestión anaeróbica de materia orgánica es una mezcla de gases que contienen un 50-75 % de metano (CH₄) y un 25-50 % de dióxido de carbono (CO₂).

55 El biogás es actualmente una de las fuentes de energía de crecimiento más rápidas. Sin embargo, el biogás se produce a partir de la biomasa y contiene una gran proporción de CO₂ que tiene un valor bajo como fuente de energía. Así, es conveniente disminuir el contenido de CO₂ en biogás por un proceso al que se refiere a menudo como mejora del biogás. Los procedimientos de mejora más comunes eliminan las impurezas mecánica o químicamente.

Otros gases combustibles, como gas de síntesis y gas de hulla, también contienen CO₂.

Hasta hace poco, el procedimiento común de producción a escala industrial de ácido succínico era derivado del petróleo. Las tecnologías "verdes" emergentes para producir ácido succínico biológico tienen un coste operativo menor y una huella respetuosa con el medio ambiente. Estas explotan la fermentación llevada a cabo por biocatalizador de fuente de carbono.

La presente invención proporciona un proceso biológico de fermentar una fuente de carbono a ácido succínico, explotando el consumo simultáneo o fijación de CO₂ de un gas combustible que contiene CO₂ mediante microorganismos anaeróbicos que producen ácido succínico. Este proceso proporciona así la mejora de gas combustible y la producción de ácido succínico de forma simultánea, los cuales son productos relevantes de forma comercial de valor considerable.

Es así una realización de la presente invención para proporcionar un procedimiento de fabricar un gas combustible mejorado y, simultáneamente, producir ácido succínico. Dicho procedimiento comprende los pasos de:

- a. proporcionar un biorreactor,
- b. proporcionar microorganismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
- c. proporcionar un sustrato de carbono para dichos microorganismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
- d. añadir un gas combustible que contiene CO₂ al biorreactor,
- e. recoger el gas combustible mejorado así producido, donde dicho gas combustible mejorado tiene un contenido de CO₂ inferior al gas combustible que contiene CO₂ añadido y
- f. recoger el efluente que contiene el ácido succínico.

En una realización dicho gas combustible que contiene CO₂ se selecciona del grupo que consta de biogás, gas de síntesis y gas de hulla. En una realización dicho procedimiento comprende los pasos de:

- a. proporcionar un biorreactor,
- b. proporcionar organismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
- c. proporcionar un sustrato basado en carbono para dichos organismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
- d. añadir biogás al biorreactor,
- e. recoger el biogás mejorado así producido, y
- f. recoger, de manera opcional, el ácido succínico que contiene efluente.

En una realización, dicho microorganismo anaeróbico que produce ácido succínico es una bacteria anaeróbica que produce ácido succínico; en una realización dicha bacteria es la *Actinobacillus succinogenes*.

En una realización, dicho sustrato basado en el carbono es un sustrato de carbohidratos que comprende uno o más de los siguientes compuestos: glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, maltosa, fructosa, sacarosa, celobiosa, lactosa, manitol, arabitol, sorbitol, manosa, ribosa, glicerol, pectina, beta-glucósida, gluconato, idonate, ascorbato, glucarate, galactarate y/o 5-ceto-glucanate.

En una realización, el procedimiento comprende, además, el paso de recuperar y/o purificar el ácido succínico del efluente que contiene ácido succínico.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención ofrece varias ventajas, ya que podría resultar ser más eficiente en el consumo de energía que las actuales tecnologías para mejorar el gas combustible que contiene CO₂ y, potencialmente, da como resultado menores costes de inversión y operativos que las tecnologías de mejora convencionales.

Además, el ácido succínico del subproducto del presente procedimiento de la mejora de gas combustible es un producto comercializable por sí mismo, con un creciente potencial de mercado. Comparado con el proceso convencional de producción de ácido succínico derivado del petróleo, el procedimiento tiene potencial para mejorar el impacto medioambiental y, al mismo tiempo, promocionar la economía biológica.

El biogás mejorado se mejora preferentemente para utilizarse en redes de distribución de gas existentes.

Descripción de los dibujos

Figura 1: Esquema de mejora del reactor del biogás.

Figura 2: Mejora del biogás. El crecimiento bacteriano (OD660nm) se monitorizó durante 36 horas. Durante el crecimiento bacteriano se midió la composición del biogás en la fase de gas (w. GC) y el CO₂ solubilizado (w. sensor en línea in situ de CO₂). Como se observa en esta figura el biogás en este experimento se mejora desde la composición de 60/40 a la composición de 90/10.

5 Figura 3:A. crecimiento de succinogenes y metabolites. Crecimiento bacteriano (OD660) idéntico a la figura 4. El consumo de glucosa y la producción de succinato, lactato, formiato (metanoato), acetato y etanol se midieron utilizando HPLC. La presencia de lactato indica presencia de pequeñas cantidades de O₂. Después de observar la presencia de lactato, los tubos en nuestro sistema se cambiaron a tubos herméticos de aire. Después de eso, no se observó ningún lactato. Con las recientes optimizaciones, ahora tenemos el sistema ejecutándose donde no se produjo ningún lactato.

10 Figura 4: Resultados de mejora del biogás. Comparación de la composición del biogás antes y después de la mejora (21 horas). Solamente se observaron trazas de CO₂ en el gas después de la mejora. Como se muestra en el gráfico, todo el biogás se mejora después de 21 horas cuando el volumen de gas total en el sistema es 6,7 L y la glucosa está presente en exceso. El mayor rendimiento de ácido succínico hasta la fecha que se alcanzó utilizando biogás como fuente de CO₂ es de 0,61 g SA/g glucosa. Sin embargo, el mayor rendimiento utilizando MgCO₃ como fuente de CO₂

15 fue de 0,85 g SA/g glucosa.
Figura 5: Mejora del biogás de 6,7 L de biogás (GC). Utilizando la fermentación de ácido succínico el biogás mejoró a un 99,6 % CH₄/0,4 % CO₂.

Figura 6: Fermentación de ácido succínico durante la mejora de biogás (HPLC). No se consumió toda la glucosa debido a la reducción de CO₂. La ración entre el succinato y otros metabolitos disminuye cuando los niveles de CO₂ disminuyen. La producción de ácido succínico en este experimento fue como se esperaba, se alcanzan rendimientos de ácido succínico inferiores cuando los niveles de CO₂ son bajos. El rendimiento observado era de 0,37 g SA/g glucosa. La producción de ácido succínico depende mucho de la disponibilidad de CO₂. Sin embargo, durante la fermentación el biogás mejoró a un 99,6 % CH₄ y solamente un 0,4 % de CO₂ restante.

Figura 7: Se utilizaron biorreactores 3-L (Sartorius BIostat Aplus, Alemania) con un volumen de trabajo inicial de 1,5 L. Los biorreactores se equiparon con sondas EASYFERM PLUS K8 200 pH (Hamilton Bonaduz AG, Suiza), temperatura y CO₂ (Mettler Toledo, Suiza). El flujo de las mezclas de gases se controló a través de una bomba peristáltica (Watson-Marlow, Reino Unido). Para monitorizar y controlar la presión dentro de los biorreactores se montó un manómetro (Cewai, Italia) con una válvula de escape (Hy-Lok, EE.UU.) ajustada a la presión experimental. Se utilizaron bolsas de gas de tamaño diferente (7,5 y 12,5 L) para suministrar gas al sistema. El sistema consiste en una recirculación de gases que permite observar los cambios en la composición del biogás durante la fermentación.

30 Figura 8: La fermentación se llevó cabo en dos condiciones diferentes. En primer lugar, a presión atmosférica donde la Figura 1a) muestra los productos de fermentación y la Figura 1b) muestra la composición del biogás. En segundo lugar, a una presión de 1,6 bar, la Figura 1c) muestra los productos de fermentación y la Figura 1d) muestra la composición del biogás. El volumen del biogás utilizado en este experimento era de 12,5 litros. La concentración de ácido succínico aumentó un 11 % (de 12,85 g/L a 14,39 g/L) cuando la fermentación a la presión atmosférica se comparó con la fermentación llevada a cabo a 1,6 bar. El rendimiento de ácido succínico aumentó un 4 % (de 0,597 g/g a 0,621 g/g) cuando se compararon las dos condiciones experimentadas. Cuando se compara la composición del biogás al final de la fermentación, debido a la mayor producción de ácido succínico, menos formación de subproducto y una solubilidad superior de CO₂ el contenido de metano aumentó del 76 % (fermentación a presión atmosférica) a un 91 % (fermentación a 1,6 bar de presión). *Glu = Glucosa, SA = Ácido succínico, FA = Ácido fórmico, AA = Ácido acético

45 Figura 9: La fermentación se llevó cabo en dos condiciones diferentes. En primer lugar, a presión atmosférica donde la Figura 1a) muestra los productos de fermentación y la Figura 1b) muestra la composición del biogás. En segundo lugar, a una presión de 1,6 bar, la Figura 1c) muestra los productos de fermentación y la Figura 1d) muestra la composición del biogás. El volumen del biogás utilizado en este experimento era de 7,5 litros. La concentración de ácido succínico no aumentó cuando la fermentación en la presión atmosférica se comparó con la fermentación llevada a cabo a 1,6 bar. Sin embargo, el rendimiento de ácido succínico aumentó un 7 % (de 0,545 g/g a 0,585 g/g) cuando se compararon las dos condiciones experimentadas. Cuando se compara la composición del biogás al final de la fermentación, debido al menor volumen de gas (volumen reducido de 12,5 L a 7,5 L en comparación con la figura 8), menos formación de subproducto y una mayor solubilidad de CO₂, el contenido de metano aumentó del 85 % (fermentación a presión atmosférica) al 95 % (fermentación a 1,6 bar de presión). *Glu = Glucosa, SA = Ácido succínico, FA = Ácido fórmico, AA = Ácido acético

Descripción detallada

55 La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

El gas combustible es cualquiera de una serie de combustibles que son gaseosos en condiciones normales. Muchos gases combustibles están compuestos de hidrocarburos (como metano o propano), hidrógeno, monóxido de carbono o mezclas de los mismos. Dichos gases son una potencial fuente de energía térmica o energía lumínica que se pueden

transmitir y distribuir directamente a través de tubos desde el punto de origen directamente al sitio de consumo.

El gas combustible contrasta con combustibles líquidos y combustibles sólidos, aunque algunos gases combustibles se licuan para su almacenamiento o transporte. El tipo más común de gas combustible actualmente en uso es el gas natural, compuesto principalmente de metano.

El gas combustible se puede clasificar en gases fabricados (producidos a través de un proceso artificial, normalmente gasificación en fábricas de gas) y los que se producen naturalmente (incluyendo el gas natural y gases del petróleo). Los gases fabricados incluyen gas de hulla, gas de agua, gas pobre, gas de síntesis, gas de madera, hidrógeno y biogás.

El gas de síntesis es una mezcla de gas combustible que consiste principalmente de hidrógeno (H₂), monóxido de carbono (CO) y con mucha frecuencia algún dióxido de carbono (CO₂). El hidrógeno se debe separar desde el CO₂ para poder utilizarlo. Esto se hace principalmente por adsorción por variación de presión (PSA), lavado de amina y reactores de membrana.

El gas de hulla (también gas ciudad y gas de iluminación) es un combustible gaseoso inflamable realizado con destilación destructora de carbono y contiene una variedad de gases caloríficos incluyendo hidrógeno, monóxido de carbono, metano e hidrocarburos volátiles junto con pequeñas cantidades de gases no caloríficos como dióxido de carbono y nitrógeno.

Biogás

El biogás es una fuente sostenible de energía y es un tipo de biocombustible. El biogás se produce con la digestión anaeróbica de materia orgánica (biomasa) como estiércol, aguas residuales, residuos municipales, residuos verdes, material vegetal, material animal, residuos de cocina y cultivos. El biogás está compuesto principalmente de metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) y puede tener pequeñas cantidades de ácido sulfhídrico (H₂S), humedad y siloxanos.

Se pueden quemar los gases metano, hidrógeno y monóxido de carbono (CO). La liberación de energía a través de dicha combustión permite que el biogás se utilice como combustible. El biogás se puede utilizar como combustible en cualquier país con cualquier fin térmico, como cocinar. También se puede utilizar en digestores anaeróbicos donde se utiliza usualmente en un motor de gas para convertir la energía del gas en electricidad y calor. El biogás se puede comprimir, al igual que el gas natural, y utilizar en vehículos a motor. En el Reino Unido, por ejemplo, se estima que el biogás tiene el potencial para reemplazar alrededor del 17 % del combustible para vehículos. El biogás es un combustible renovable, de forma que se califica para subvenciones de energía renovable en algunas partes del mundo. El biogás también se puede limpiar y mejorar a estándares de gas natural (biometano).

La composición del biogás varía dependiendo de la biomasa y el origen utilizado para el proceso de digestión anaeróbica. Sin embargo, la composición de biogás bruto producido por procedimientos tradicionales normalmente oscila entre los valores resumidos en la tabla 1 que se muestra a continuación:

Tabla 1

Compuesto	Fórmula	%
Metano	CH ₄	50-75
Dióxido de carbono	CO ₂	25-50
Nitrógeno	N ₂	0-10
Hidrógeno	H ₂	0-1
Ácido sulfhídrico	H ₂ S	0-3
Oxígeno	O ₂	0-0

La composición del biogás varía dependiendo del origen del proceso de digestión anaeróbica. El gas de los vertederos normalmente tiene concentraciones de metano de cerca de un 50 %. Las tecnologías de tratamiento de residuos avanzados puede producir biogás con 55-75 % CH₄, que para reactores con líquidos libres se pueden aumentar al 80-90 % de metano utilizando técnicas de purificación de gas in-situ.

Quando se utiliza el biogás, surgen muchas ventajas. En Norteamérica, la utilización del biogás generaría suficiente electricidad como para cubrir el tres por ciento del gasto de electricidad del continente. Además, el biogás podría ayudar a reducir el cambio climático global. Normalmente, el estiércol que se deja descomponer suelta principalmente dos gases que causan cambio climático global: dióxido nitroso y metano. El dióxido nitroso (N₂O) calienta la atmósfera 310 veces más que el dióxido de carbono y el metano 21 veces más que el dióxido de carbono. Convirtiendo el estiércol

de vaca en biogás de metano vía digestión anaeróbica, los millones de vacas en los Estados Unidos producirían cien mil millones de kilovatio-horas de electricidad, suficiente para dar energía a millones de casas en los Estados Unidos. De hecho, una vaca puede producir suficiente estiércol en un día para generar tres kilovatio-horas de electricidad; solamente son necesarios 2,4 kilovatios hora de electricidad para alimentar a una lámpara de 100 vatios durante un día. Además, convirtiendo el estiércol de vaca en biogás de metano en lugar de dejarlo descomponerse, sería posible reducir los gases de calentamiento global en noventa y nueve millones de toneladas métricas o un cuatro por ciento.

Utilización del biogás

10 El biogás se puede utilizar para la producción de electricidad en depuradoras de aguas residuales en motores de gas de una planta de cogeneración, donde el calor residual del motor se aprovecha para calentar el digestor; cocinar; calefacción; calentamiento de agua y calor de proceso. Si se comprime, puede sustituir al gas natural comprimido para su uso en vehículos, donde puede alimentar a un motor de combustión o células de combustible y desplaza de una manera mucho más eficaz al dióxido de carbono que el uso normal en plantas de cogeneración en el sitio.

15 El metano dentro del biogás se puede concentrar a través de un mejorador de biogás hasta los mismos estándares del gas natural fósil, que por sí mismo ha tenido que pasar por un proceso de limpieza y convertirse en biometano. Si la red de gas local lo permite, el productor del biogás puede utilizar las redes de distribución de gas local. El gas debe estar muy limpio para llegar a la calidad del gaseoducto y debe ser de la composición correcta para que lo acepte la red de distribución local. Se deben eliminar, si los hay, el dióxido de carbono, el agua, el ácido sulfhídrico y las partículas.

Los requisitos para la pureza y la composición del biogás para la distribución en la red de gas natural son diferentes según los países. Por ejemplo, los requisitos nacionales daneses para el biogás incluyen, por ejemplo, un índice de wobbe en el intervalo de 50,8 a 55,8 MJ/Nm³ y un contenido de CO₂ inferior al 2,5 %. Por ejemplo, un biogás con un contenido de CH₄ de 97,3 % tiene un índice de wobbe aceptable y se puede utilizar directamente en la red de distribución de gas natural danesa.

En una realización como la descrita aquí, al gas combustible mejorado por el presente procedimiento se le añade propano para ajustar el valor de combustión (índice de wobbe) del gas. Los procedimientos convencionales para mejorar los gases combustibles se enumeran en la tabla 2 que se muestra a continuación:

Tabla 2

Técnica	Coste de inversión (€)	Coste de funcionamiento (€)	precio de coste del biogás mejorado (€/Nm ³)	Rendimiento alcanzable máximo (%)	Pureza alcanzable máxima (%)
Absorción química	353 000	134 500	0,17	90	98
Lavado de agua a alta presión	265 000	110.000	0,13	94	98
Absorción por variación de presión	680 000	187.250	0,25	91	98
Separación criogénica	908 500	397.500	0,44	98	91
Separación de membrana	233 000	81.750	0,12	78	89,5

35 Los costes de los procedimientos anteriores son relativamente altos, ya que necesitan o una presión alta o una adición de productos químicos. Además, cuando se elimina CO₂ del biogás, también se eliminan pequeñas cantidades de CH₄.

Ácido succínico

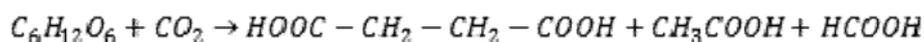
40 El ácido succínico (ácido butanodioico; históricamente conocido como licor de ámbar) es un ácido diprótico, dicarboxílico con fórmula química C₄H₆O₄ y fórmula estructural HOOC-(CH₂)₂-COOH. Es un sólido blanco e inodoro.

El succinato juega un papel en el ciclo del ácido cítrico, un proceso de producción energética. El nombre deriva del Latín *succinum*, que significa ámbar, del que se obtuvo originalmente el ácido.

- 5 En el pasado se utilizó principalmente de forma externa para dolores reumáticos e internamente en fracturas inveteradas. El ácido succínico es un precursor de algunos poliésteres especializados. También es un componente de algunas resinas alquídicas. El ácido succínico se utiliza en la industria alimentaria y de bebidas, principalmente como regulador de acidez. En forma nutracéutica como aditivo alimentario y suplemento dietético, es seguro y aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. Como excipiente en productos farmacéuticos se utiliza para controlar la acidez y, raramente, en comprimidos efervescentes.
- 10 Las sales formadas por ácido succínico neutralizantes se llaman succinatos. Un ejemplo es el succinato sódico, una sal blanca e hidrosoluble. Los ésteres del ácido succínico también se llaman succinatos. El succinato y el ácido succínico se pueden utilizar de forma indistinta aquí.
- 15 El ácido succínico se puede producir por diversos procedimientos. Las rutas industriales comunes incluyen hidrogenación de anhídrido maleico e hidratación de anhídrido succínico; hidratación de anhídrido maleico e hidrogenación de ácido maleico; oxidación de butanodiol 1.4 y carbonilación de etilenglicol. Los procesos anteriores se designan como la ruta basada en productos petroquímicos.
- 20 Las técnicas emergentes proporcionan un proceso respetuoso con el medio ambiente para producir ácido succínico hecho de fuentes renovables y sostenibles. El ácido succínico biológico (ácido biosuccínico) se produce de la fermentación de una fuente de carbono tal como un carbohidrato (por ejemplo, glucosa), seguido de paso de recuperación y purificación. El proceso es anaeróbico en la naturaleza y consume CO₂ en vez de soltarlo. En el proceso interviene un microorganismo biocatalizador.
- 25 La producción global se estima en 30 000 toneladas al año, con un índice de crecimiento del 10 %. Con la introducción del ácido biosuccínico se espera que se expanda el mercado.
- 30 *A. succinogenes* y *M. succiniciproducens* son bacterias que convierten de forma natural los azúcares y el CO₂ en altas concentraciones de ácido succínico como parte de una fermentación mezclada con ácido. Se están haciendo esfuerzos para maximizar el flujo de carbono a succinato para conseguir un proceso aplicable industrialmente (McKinlay et al., 2010).

Estequiometría de fermentación de ácido succínico

- 35 Teóricamente se consume 1 mol de CO₂ por mol de ácido succínico producido, como se ilustra en la fórmula química de fermentación de la glucosa en el ácido succínico. El rendimiento químico teórico para el ácido succínico es (ecuación 2):



- 40 Como se mencionó antes, el biogás en bruto producido de la digestión en los reactores de biogás tradicionales son aproximadamente de un 60 % de metano y un 40 % de CO₂. El alto contenido de CO₂ hace que el biogás sea menos atractivo para el uso directo como fuente de energía. La solución es el uso de la mejora de biogás o el proceso de purificación donde los contaminantes en el flujo del biogás en bruto se absorben o restregan, dejando hasta un 98 % de metano por unidad de volumen de gas. Tradicionalmente ha habido cuatro procedimientos principales de mejora de biogás incluyendo lavado con agua, absorción por variación de presión, absorción de selexol y tratamiento de gas de amina. El procedimiento más prevalente es el lavado con agua, en donde gas de alta presión fluye en una columna donde el dióxido de carbono y otras trazas de elementos se refriegan por agua en cascada en un flujo en
- 50 contracorriente con el gas. Las disposiciones actuales, sin embargo, son caras y, prácticamente, imposibles, ya que requieren un paso más antes de que se pueda utilizar el biogás. Los presentes inventores han demostrado que es posible obtener grandes cantidades de alta calidad (contenido alto de CH₄) de biogás haciendo uso de un proceso biológico relativamente simple para consumir CO₂ en el biogás en el proceso de formación de ácido succínico. El biogás mejorado se puede utilizar en una red de distribución de gas natural existente y/o directamente como fuente
- 55 de combustible.

Si bien se sabe que determinados microorganismos pueden producir ácido succínico, no se ha sugerido previamente que los microorganismo que producen ácido succínico se puedan emplear para mejorar el gas combustible mediante el consumo o la fijación del contenido de CO₂ del gas combustible y la producción simultánea de ácido succínico. Así,

se obtienen dos productos relevantes comercialmente (gas combustible mejorado y ácido succínico) en una reacción.

Es un aspecto de la invención para proporcionar

- 5 -un procedimiento de mejora de un gas combustible que contiene CO₂, como el biogás,
-un procedimiento de producir ácido succínico y
-un procedimiento de mejora simultánea de un gas combustible que contiene CO₂, como biogás, y produciendo ácido succínico,
- 10 dichos procedimientos, como se define en las reivindicaciones, comprenden organismos anaeróbicos que producen ácido succínico, proporcionando un sustrato de carbohidratos para dichos organismos anaeróbicos que producen ácido succínico y proporcionando gas combustible que contiene CO₂ como biogás.

Preferentemente, las reacciones utilizadas en dichos procedimientos tendrán lugar en un biorreactor adecuado para
15 contener gas y un caldo de fermentación y para proporcionar un medio anaeróbico.

Es, por lo tanto, una realización para proporcionar un procedimiento de fabricar un gas combustible mejorado, dicho procedimiento comprende los pasos de:

- 20 a. proporcionar un biorreactor,
b. proporcionar organismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
c. proporcionar un sustrato basado en carbono para dichos organismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
d. añadir un gas combustible que contiene CO₂ al biorreactor,
e. recoger el gas combustible mejorado así producido, donde dicho gas combustible mejorado tiene un contenido de
25 CO₂ inferior al gas combustible que contiene CO₂ que se añadió y
f. recoger, de manera opcional, el ácido succínico que contiene efluente.

El termino "gas combustible mejorado" como se menciona en la presente y de acuerdo con la presente descripción significa que se reduce el componente incombustible o el componente no calorífico del gas combustible; el cual en
30 una realización concreta es reducción del contenido de CO₂ del gas combustible. Simultáneamente, el componente del combustible, o el componente calorífico del gas combustible se incrementa.

Se entiende que un procedimiento de fabricación de un gas mejorado se considera idéntico a un procedimiento de reducción del contenido de CO₂(g) de un gas que contiene CO₂ y/o reduciendo o disminuyendo la presión parcial de
35 CO₂ en un gas que contiene CO₂.

El proceso que se produce en el biorreactor tendrá en cuenta la fermentación de la fuente basada en el carbono mientras se consume el contenido de CO₂ del gas combustible añadido para que se produzca el ácido succínico, antes
40 de recoger el gas combustible mejorado y/o el efluente o caldo de fermentación que contiene ácido succínico.

El gas combustible mejorado se puede seleccionar del grupo que consiste en biogás mejorado, gas de síntesis mejorado y gas de hulla mejorado. El gas combustible que contiene CO₂ en una realización se puede seleccionar del grupo que consta de biogás, gas de síntesis y gas de hulla. Un gas combustible que contiene CO₂ no significa sustancialmente incluir CO₂ puro.
45

El "efluente que contiene ácido succínico" utilizado aquí también se puede llamar fase líquida o caldo de fermentación. El gas combustible mejorado se puede utilizar como combustible de vehículos o se puede utilizar en una central térmica, como una central térmica de distribución de distrito o se puede utilizar para la producción de electricidad. Es una realización adicional para proporcionar un procedimiento de fabricar un biogás mejorado, dicho procedimiento
50 comprende los pasos de:

- a. proporcionar un biorreactor,
b. proporcionar organismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
c. proporcionar un sustrato basado en carbono para dichos organismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
55 d. añadir biogás al biorreactor,
e. recoger el biogás mejorado así producido, y
f. recoger, de manera opcional, el ácido succínico que contiene efluente.

En una realización, el paso de añadir biogás al biorreactor se produce inyectando biogás en el biorreactor, como
60 inyectar el biogás en el fondo del reactor.

Se entiende que un procedimiento de fabricar un biogás mejorado se considera idéntico a un procedimiento de fabricar un biogás con alto contenido de CH₄.

- 5 El biogás mejorado se mejora preferentemente de forma suficiente para que se utilice en una red de distribución de gas natural existente y/o directamente como fuente de combustible.

Se entiende que un procedimiento de fabricar un biogás mejorado se considera idéntico a un procedimiento de aumentar el contenido de CH₄ de biogás y/o aumentar la presión parcial de CH₄ en biogás.

10

Se entiende que un procedimiento de fabricar un biogás mejorado se considera idéntico a un procedimiento de reducir el contenido de CO₂ (g) de biogás y/o reducir o disminuir la presión parcial de CO₂ en biogás.

Eliminando el contenido de CO₂ de baja energía del biogás, se aumenta el contenido de energía general del biogás.

- 15 Por lo tanto, se entiende que un procedimiento de fabricar un biogás mejorado se considera idéntico a un procedimiento para aumentar el contenido de energía del biogás.

- 20 La expresión "biogás mejorado" y "biogás de alto contenido de CH₄" se considera como un biogás que tiene un contenido de CH₄ que excede el del biogás no mejorado convencional. Por lo tanto, de acuerdo con la presente descripción, un "biogás de alto contenido de CH₄" y "biogás mejorado" normalmente contiene, al menos, un 90 % de CH₄, como al menos un 91 % de CH₄, por ejemplo, al menos un 92 % de CH₄, como al menos un 93 % de CH₄, por ejemplo, al menos un 94 % de CH₄, como al menos un 95 % de CH₄, por ejemplo, al menos un 96 % de CH₄, como al menos un 97 % de CH₄, por ejemplo, al menos de un 98 % de CH₄, como al menos un 99 % de CH₄, por ejemplo, al menos un 99,5 % de CH₄, como al menos un 99,6 % de CH₄, por ejemplo, al menos un 99,7 % de CH₄, como al menos un 99,8 % de CH₄, por ejemplo, al menos un 99,9 % de CH₄ c medido por el contenido de CH₄ del biogás.

- 30 En otra realización un "biogás de alto contenido de CH₄" y "biogás mejorado" contiene al menos entre un 90-91 % de CH₄, como un 91-92 % de CH₄, por ejemplo, un 92-93 % de CH₄, como un 93-94 % de CH₄, por ejemplo, un 94-95 % de CH₄, como un 95-96 % de CH₄, por ejemplo, un 96-97 % de CH₄, como un 97-98 % de CH₄, por ejemplo, un 98-99 % de CH₄, como un 99-99,5 % de CH₄, por ejemplo, un 99,5-99,9 % de CH₄, como un 99,9-100 % de CH₄, medido por el contenido de CH₄ del biogás.

- 35 El biogás producido es preferentemente de una calidad adecuada para el uso directo en la red de distribución de gas natural sin mejora adicional y/o purificación. Es una realización adicional proporcionar un procedimiento de fabricar un gas de síntesis o gas de hulla mejorado, dicho procedimiento comprende los pasos de:

- 40 a. proporcionar un biorreactor,
 b. proporcionar organismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
 c. proporcionar un sustrato basado en carbono para dichos organismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
 d. añadir gas de síntesis o gas de hulla al biorreactor,
 e. recoger el gas de síntesis o el gas de hulla mejorado así producido, donde dicho gas de síntesis o gas de hulla tiene un contenido más bajo de CO₂ que el gas de síntesis o el gas de hulla añadido, y
 f. recoger, de manera opcional, el ácido succínico que contiene efluente.

- 45 Se entiende que un procedimiento de fabricar un gas de síntesis o gas de hulla mejorado se considera idéntico a un procedimiento de reducir el contenido de CO₂ de gas de síntesis o gas de hulla y/o reducir la presión parcial de CO₂ en gas de síntesis o gas de hulla.

- 50 Se entiende que un procedimiento de fabricar un gas de síntesis mejorado se considera idéntico a un procedimiento de aumentar el contenido de H₂ y/o contenido de CO de gas de síntesis o gas de hulla aumentando la presión parcial de H₂ y/o CO en gas de síntesis.

- 55 Se entiende que un procedimiento de fabricar un gas de hulla mejorado se considera idéntico a un procedimiento de aumentar el contenido de CH₄, H₂ y/o CO del gas de hulla y/o aumentar la presión parcial de CH₄, H₂ y/o CO en el gas de hulla. El gas combustible se puede producir y mejorar en un biorreactor individual, es decir, mejora in situ o en biorreactores separados, es decir, ex situ.

- 60 Es una realización adicional proporcionar un procedimiento de fabricar un gas combustible mejorado y simultáneamente producir ácido succínico. Dicho procedimiento comprende los pasos de:

- a. proporcionar un biorreactor,
- b. proporcionar organismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
- c. proporcionar un sustrato basado en carbono para dichos organismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
- d. añadir un gas combustible que contiene CO₂ al biorreactor,
- 5 e. recoger el gas combustible mejorado así producido, donde dicho gas combustible mejorado tiene un contenido de CO₂ inferior al gas combustible que contiene CO₂ añadido y
- f. recoger el efluente que contiene el ácido succínico.

En una realización dicho gas combustible que contiene CO₂ se selecciona del grupo que consta de biogás, gas de hulla y gas de síntesis. En una realización preferida de la presente descripción, dicho gas que contiene CO₂ es biogás.

En una realización dicho gas que contiene CO₂ no es CO₂ puro. En otro dicho gas que contiene CO₂ comprende, al menos, otros tipos gaseosos distintos al CO₂, como H₂, CO, CH₄ y/o N₂. Preferentemente, el gas que contiene CO₂ consta, al menos, de un 5 %, más preferentemente al menos un 10 % o más, de al menos otro tipo gaseoso.

15 Se entiende que los procedimientos de mejorar un gas combustible y/o producir ácido succínico se pueden optimizar para conseguir las condiciones óptimas para la conversión de una fuente de carbono y CO₂ en ácido succínico. Las condiciones iniciales se pueden establecer y llevar a que el microorganismo consuma una fuente de carbono de la que se alimenta con el fin de reproducirse, para obtener una masa celular bien crecida. Este cultivo celular se puede obtener en un reactor o contenedor separado del biorreactor descrito aquí. El cultivo celular se puede transferir a un fermentador mayor, el biorreactor, donde las condiciones se establecen y llevan al microorganismo a fermentar la fuente de carbono de la que se alimenta en el producto deseado (ácido succínico).

20 En una realización, el biorreactor se alimenta de un cultivo de microorganismos que comprende microorganismos anaeróbicos que producen ácido succínico y una fuente de carbono.

Los presentes inventores han descubierto que una presión mayor en el biorreactor puede aumentar la concentración y la producción de ácido succínico. Así, en una realización interesante, se lleva a cabo una fermentación a una presión superior a la presión atmosférica, es decir, superior a 1 bar.

30 En una realización la presión del biorreactor es al menos 1,1 bar, como al menos 1,2 bar, por ejemplo, al menos 1,3 bar, como al menos 1,4 bar, por ejemplo, al menos 1,5 bar, como al menos 1,6 bar, por ejemplo, al menos 1,7 bar, como al menos 1,8 bar, por ejemplo, al menos 1,9 bar, como al menos 2,0 bar, por ejemplo, al menos 2,1 bar, como al menos 2,2 bar, por ejemplo, al menos 2,3 bar, como al menos 2,4 bar, por ejemplo, al menos 2,5 bar, como al menos 2,6 bar, por ejemplo, al menos 2,7 bar, como al menos 2,8 bar, por ejemplo, al menos 2,9 bar, como al menos 3,0 bar, por ejemplo, al menos 3,5 bar, como al menos 4 bar, por ejemplo, 5 bar, como al menos 6 bar, por ejemplo, al menos 7 bar, como al menos 8 bar o más.

En una realización la presión en el biorreactor está entre 1,1 y 10 bar, como entre 1,1 y 5 bar, por ejemplo, entre 1,1 y 4 bar, como entre 1,1 y 3 bar, por ejemplo, entre 1,1 y 2 bar.

En una realización la presión en el biorreactor está entre 1,2 y 10 bar, como entre 1,2 y 5 bar, por ejemplo, entre 1,2 y 4 bar, como entre 1,2 y 3 bar, por ejemplo, entre 1,2 y 2 bar.

45 En una realización la presión en el biorreactor está entre 1,3 y 10 bar, como entre 1,3 y 5 bar, por ejemplo, entre 1,3 y 4 bar, como entre 1,3 y 3 bar, por ejemplo, entre 1,3 y 2 bar.

En una realización la presión en el biorreactor está entre 1,4 y 10 bar, como entre 1,4 y 5 bar, por ejemplo, entre 1,4 y 4 bar, como entre 1,4 y 3 bar, por ejemplo, entre 1,4 y 2 bar.

50 En una realización la presión en el biorreactor está entre 1,5 y 10 bar, como entre 1,5 y 5 bar, por ejemplo, entre 1,5 y 4 bar, como entre 1,5 y 3 bar, por ejemplo, entre 1,5 y 2 bar.

Organismo que produce ácido succínico

55 En el proceso de producción de ácido succínico intervendrán, o catalizarán, organismos anaeróbicos que producen ácido succínico, preferentemente microorganismos, que utilizarán el CO₂ contenido en un gas combustible, como el CO₂ del biogás. De esta forma, el gas combustible se mejora con el proceso de fermentación de ácido succínico, en el caso de biogás obteniendo así biometano de alta pureza.

60 Los organismos anaeróbicos que producen ácido succínico incluyen un organismo que es capaz de fijar CO₂ en

condiciones anaeróbicas promocionando así la producción de ácido succínico.

Los organismos anaeróbicos que producen ácido succínico incluyen cualquier organismo que es capaz de fermentar una fuente de carbono a ácido succínico.

5

Los organismos anaeróbicos que producen ácido succínico son, en una realización, microorganismos anaeróbicos que producen ácido succínico.

Los organismos o microorganismos anaeróbicos que producen ácido succínico son, en una realización, bacterias anaeróbicas que producen ácido succínico.

10

Las bacterias anaeróbicas que producen ácido succínico incluyen bacterias que son capaces de fijar CO₂ en condiciones anaeróbicas promocionando así la producción de ácido succínico.

15 Las bacterias anaeróbicas que producen ácido succínico incluyen cualquier bacteria que es capaz de producir ácido succínico en condiciones fisiológicas en la presencia de un sustrato de carbono CO₂; como glucosa y CO₂.

En una realización, dicha bacteria anaeróbica que produce ácido succínico se selecciona del grupo en el que constan: *Actinobacillus succinogenes* (*A. succinogenes*), *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (*A. succiniciproducens*),
20 *Mannheimia succiniciproducens* (*M. succiniciproducens*), *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) y recombinante *Escherichia coli* (*E. coli*).

En una realización en concreto, dicha bacteria que produce ácido succínico es *Actinobacillus succinogenes*.

25 *Sustratos de Actinobacillus succinogenes* y la vía metabólica de *Actinobacillus succinogenes* se describen en McKinlay et al. 2010.

Los organismos osmofílicos son microorganismos adaptados a entornos con presiones osmóticas altas, como concentraciones de azúcar altas. *A.succinogenes* es un osmófilo moderado y tiene una alta tolerancia a
30 concentraciones de azúcar iniciales (≤ 158 g/L glucosa) y también unas concentraciones de ácido succínico altas (>70 g/L).

En una realización dicho microorganismo que produce ácido succínico es un microorganismo diseñado (o recombinante) capaz de fermentar un fuente de carbono a ácido succínico.

35

En la realización donde la bacteria anaeróbica que produce ácido succínico es un recombinante *E. coli*, dicho recombinante *E. coli* se modifica para poder ser capaz de fermentar una fuente de carbono a ácido succínico. *E. coli* se puede modificar, por ejemplo, como se describió previamente en Wu et al. 2007 por manipulación genética de vías metabólicas centrales para mejorar la producción de ácido succínico. Por ejemplo, una estrategia es bloquear la vía de la competición a ácido succínico, como por inactivación de piruvato: formiato liasa (PFL) y lactato deshidrogenasa (LDH), la proteína EIICB en el sistema de fofotransferase (PTS), alcohol deshidrogenasa (ADH), fosfato acetiltransferasa-acetato quinasa, etc. Otra estrategia es sobreexpresar enzimas de fijación de CO₂ endógenos o heterólogos, como piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa (PPC), PEP carboxiquinasa (PCK) y encima málica (ME).

45

Sustrato basado en carbono

Un sustrato para un organismo o microorganismo anaeróbico que produce ácido succínico, como una bacteria, es un sustrato requerido y suficiente para que el organismo concentre CO₂ en condiciones anaeróbicas para promover la
50 producción de ácido succínico.

En una realización dicho sustrato es un sustrato de carbohidrato.

En una realización dicho sustrato es un sustrato de alto contenido de carbohidratos.

55

En general, cualquiera y todos los tipos de biomasa hidrolizada se pueden utilizar siempre que el contenido de carbohidratos en el hidrolizado sea alto.

Algunos residuos industriales tienen un contenido de carbohidratos alto y se pueden utilizar como sustrato de acuerdo
60 con la presente descripción. Así, en una realización, el sustrato es un residuo industrial agrícola, forestal y/o

alimentario. Ejemplos de productos de residuos adecuados incluyen residuos de glicerol de la industrial de biodiésel, suero de la producción de queso y agricultura pretratada y desechos forestales como paja, astillas de madera, estiércol animal incluyendo, por ejemplo, estiércol de vaca o caballo.

5 Los cultivos energéticos también se contemplan como posibles sustratos. Un cultivo energético es una planta cultivada como cosecha de bajo coste y bajo mantenimiento utilizada de forma convencional para realizar biocombustibles, como bioetanol o quemada para que su contenido de energía genere electricidad o calor. Los cultivos de energía se categorizan generalmente como madera o plantas herbáceas; muchas de las últimas son hierbas (Graminaceae). Los cultivos de energía comerciales se plantan típicamente de manera densa, especies de cultivos de alta producción
10 donde los cultivos de energía se quemarán para generar energía. Los cultivos de madera como el sauce o el álamo se utilizan ampliamente, además de pastos templados como *Miscanthus* y *Pennisetum purpureum*. Cosechas enteras como maíz, pasto del Sudán, mijo, melitoto blanco y muchos otros también se contemplan como posibles sustratos de carbohidratos. Los cultivos de energía se pueden pretratar (hidrolizado) para obtener una cantidad superior de azúcares fermentables.

15 En una realización dicho sustrato basado en el carbono o de carbohidratos comprende o consiste en uno o más de los siguientes compuestos: glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, maltosa, fructosa, sacarosa, celobiosa, lactosa, manitol, arabitol, sorbitol, manosa, ribosa, glicerol, pectina, beta-glucósida, gluconato, idonate, ascorbato, glucarate, galactarate y/o 5-ceto-glucanate.

20 En una realización dicho sustrato de carbohidratos comprende uno o más azúcares fermentables. En una realización de la presente descripción, dicho sustrato es un sustrato de carbohidratos fermentable.

En una realización dicho sustrato de carbohidratos comprende uno o más de los siguientes compuestos: glucosa,
25 xilosa, arabinosa, galactosa, maltosa, fructosa, sacarosa, celobiosa, lactosa, manitol, arabitol, sorbitol, manosa y/o ribosa.

En una realización concreta, dicho sustrato de carbohidratos comprende glucosa.

30 En una realización, dicho sustrato de carbohidratos comprende glicerol.

En otra realización concreta, dicho sustrato de carbohidratos comprende un azúcar reducido y/o polialcohol (es decir, derivado de un azúcar por reducción). En una realización de la presente descripción, dicho sustrato comprende o
35 consiste en uno o más de manitol, arabitol y/o sorbitol.

En una realización el sustrato de carbohidratos es una mezcla de carbohidratos que comprenden al menos dos carbohidratos diferentes, como al menos tres carbohidratos diferentes, por ejemplo, al menos cuatro carbohidratos diferentes, como al menos cinco carbohidratos diferentes o más.

40 **Biorreactor**

Preferentemente, las reacciones tendrán lugar en un biorreactor apropiado, por tanto, tal biorreactor es capaz de contener gas y proporcionar un medio sustancialmente anaeróbico.

45 Los procedimientos para mejorar biogás son particularmente eficientes si se utiliza un biorreactor que comprende un sistema de inyección de gas capaz de inyectar gas que contiene CO₂ en la fase del fluido del contenido del biorreactor, sin producir burbujas. Un biorreactor adecuado comprende:

- a. un recipiente del reactor
- 50 b. un sistema de inyección de gas
- c. medios de carga adecuados para añadir al recipiente un organismo de producción de ácido succínico y uno o más sustratos de carbohidratos y
- d. medios de descarga para productos y/o residuos.

55 Dicho recipiente del reactor puede comprender una fase líquida, donde dicha fase líquida puede ser un caldo de fermentación.

El recipiente del reactor del biorreactor preferentemente es un recipiente cerrado capaz de contener gas y proporcionar un medio sustancialmente anaeróbico. En una realización del procedimiento, se usa un reactor de depósito de
60 agitación continua (CSTR).

El proceso de mejorar gas combustible como biogás y/o producir ácido succínico se puede hacer como un proceso por lotes, donde los componentes se cargan en el recipiente del biorreactor, la reacción sigue y el recipiente se vacía.

- 5 El proceso de mejorar gas como biogás y/o producir ácido succínico se puede hacer como un proceso continuo, donde los componentes se cargan continuamente y se extraen del recipiente del biorreactor.

El sistema de inyección de gas se utiliza para introducir el gas combustible que contiene CO₂ en el biorreactor.

- 10 En una realización del procedimiento, el gas combustible que contiene CO₂ se añade continuamente al biorreactor. Preferentemente, dicho sistema de inyección de gas se localiza en el fondo del reactor o el recipiente, para que el gas se pueda inyectar en el fondo del reactor. Esto permitirá que se añada gas directamente en la fase líquida o en el caldo de fermentación comprendido en el recipiente del reactor.

- 15 Preferentemente el tamaño del gas o de las burbujas del biogás inyectado así se mantiene mínimo para mantener su área de superficie por volumen lo más alto posible, para que el CO₂ del gas se puede difundir con más libertad en la fase líquida que comprende organismos que producen ácido succínico y una fuente de carbono.

- 20 De acuerdo con la ley de Henry ($[CO_2] = P_{CO_2}/H_0$) hay un equilibrio entre el CO₂ disuelto en líquido y CO₂ en fase de gas. Cuando las burbujas de biogás pasan por el reactor y se consume el CO₂ la presión parcial de CO₂ disminuye en la fase líquida, lo que obliga al CO₂ de la fase de gas a disolverse en líquido. Cuando las burbujas llegan a espacios vacíos sobre el líquido todo el CO₂ se ha eliminado sustancialmente por el organismo que produce ácido succínico, dejando metano purificado. Como el metano es mucho menos soluble en el agua que el CO₂ poco metano se disipará de la burbuja en el líquido.

25

- La transferencia de gas sin burbujas a través de membrana de fibra hueca (HFM) es un procedimiento potencial para conseguir el fin de la utilización completa de CO₂. El gas dentro de la HFM se puede entregar en la fase líquida a través de membranas por difusión. Así, el gas se disuelve directamente en el líquido, no se forma ninguna burbuja y el CO₂ lo toman los microorganismos con más eficacia. Así, en una realización en concreto del procedimiento, dicho sistema de inyección de gas comprende fibras huecas para introducir el gas combustible que contiene CO₂ en el biorreactor.

- 30 Los medios de carga adecuados para añadir al recipiente un organismo que produce ácido succínico y uno o más sustratos basados en carbono pueden ser capaces de proporcionar dichos componentes, alimentando dicho biorreactor con dichos componentes, añadiendo y/o inyectando dichos componentes en el biorreactor. El biorreactor comprende un gas combustible que contiene CO₂ como se define aquí, como biogás, gas de síntesis o gas de hulla; preferentemente biogás.

- 35 En una realización del procedimiento, el biorreactor comprende bacterias que producen ácido succínico y una o más fuentes de carbohidratos, que se describen aquí en otros lugares.

Las condiciones óptimas para la reacción de fermentación puede determinarlas una persona cualificada, incluyendo factores variables como velocidad de flujo, temperatura, pH, etc.

- 45 Preferentemente la velocidad de flujo en el reactor está equilibrada con la velocidad de CO₂ y el consumo de carbohidratos.

- 50 En una realización del procedimiento, el sustrato basado en carbono y los organismos que producen ácido succínico se mezclan y añaden al biorreactor juntos como una mezcla; en otra realización el sustrato basado en carbono se alimenta al reactor por separado desde la bacteria que produce ácido succínico.

Recuperación de ácido succínico del efluente

- 55 El procedimiento puede comprender recoger el efluente del biorreactor que contiene ácido succínico. Dicho efluente se refiere a la fase líquida contenida en el reactor y también puede denotar un caldo de fermentación.

Además de la fermentación, el ácido succínico se separa y recupera del caldo de fermentación donde está presente como sal disuelta (succinato), junto con la biomasa del microorganismo, azúcares no convertidos, una pequeña cantidad de subproducto y otros restos del medio.

60

En una realización el procedimiento comprende un paso adicional de recuperar y/o procesar el efluente que contiene ácido succínico, donde dicho ácido succínico se puede aislar, concentrar, purificar y/o recuperar.

En una realización, el procedimiento comprende, además, el paso de recuperar y/o purificar el ácido succínico del efluente que contiene ácido succínico. Así, un paso de recuperación y purificación se puede emplear para obtener ácido succínico (cristales) que cumplen los requisitos de especificación para la producción de derivados. Un procedimiento para hacerlo así se presenta aquí, pero se pueden prever otros procedimientos. En una realización del procedimiento, el primer paso de procesamiento es la separación de la célula por separación centrífuga o microfiltración, normalmente seguida de ultrafiltración para separar restos celulares, proteínas y otros polímeros de sobrenadante de fermentación.

Para el aislamiento y la concentración de ácido succínico se han sugerido muchas operaciones: precipitación con amoníaco o hidróxido de calcio, procesos de membrana como electrodiálisis, extracción de líquido-líquido como extracción de disolvente predispersado con afrones de líquidos coloidales, extracción reactiva, destilación, extracción a contracorriente, esterificación, cromatografía, etc. Diferentes procedimientos de adsorción/intercambio iónico y cristalización son los procedimientos escogidos para la purificación final del ácido aislado. Las ventajas y las desventajas de todas estas operaciones se tratan en Kurzrock & Weuster-Botz.

Referencias

- Zeikus, J.G et al. 1999. Biotechnology of succinic acid production markets for derived industrial products. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 545-552).
- Kurzrock & Weuster-Botz. 2010. Recovery of succinic acid from fermentation broth. Biotecnol. Lett. 32, 331-339).
- McKinlay et al. "A genomic perspective on the potential of Actinobacillus succinogenes for industrial succinate production". BMC Genomics 2010, 11:680.
- Song & Lee, "Production of succinic acid by bacterial fermentation," Enzyme and Microbial Technology, vol. 39, no. 3, pp. 352-361, Jul. 2006.
- Lin, et al. "Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by Actinobacillus succinogenes," Biochemical Engineering Journal, vol. 41, no. 2, pp. 128-135, Sep. 2008.
- Guettler et al, "Actinobacillus succinogenes sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen," Int J Syst Bacteriol, vol. 49, no. 1, pp. 207-216, Sep. 1999.
- Airlíquide, "Gas Encyclopaedia," 2009. [En línea]. Disponible: <http://encyclopedia.airliquide.com/encyclopedia.asp>.
- Petersson & Wellinger "Biogas upgrading technologies - developments and innovations," 2009.
- Ryckebosch et al. "Techniques for transformation of biogas to biomethane", Biomass and Bioenergy, vol. 35, no. 5, pp. 1633-1645, May 2011.
- Wu et al. "Improved Succinic Acid Production in the Anaerobic Culture of an Escherichia coli pflB IdhA Double Mutant as a Result of Enhanced Anaplerotic Activities in the Preceding Aerobic Culture", Appl Environ Microbiol, pp. 7837-7843, Dic 2007.

EJEMPLOS

Se utilizaron biorreactores

3-L (Sartorius BIOSTAT Aplus, Alemania) con un volumen de trabajo inicial de 1,5 L. Los biorreactores se equiparon con sondas EASYFERM PLUS K8 200 pH (Hamilton Bonaduz AG, Suiza), temperatura y CO₂ (Mettler Toledo, Suiza). El flujo de las mezclas de gases se controló a través de una bomba peristáltica (Watson-Marlow, Reino Unido). Para monitorizar y controlar la presión dentro de los biorreactores se montó un manómetro (Cewai, Italia) con una válvula de escape (Hy-Lok, EE.UU.) ajustada a la presión experimental. Se utilizaron bolsas de gas de tamaño diferente (6,7, 7,5 y 12,5 L) para suministrar gas al sistema. El sistema consiste en una recirculación de gases que permite observar los cambios en la composición del biogás durante la fermentación. Se han llevado a cabo experimentos utilizando tanto MgCO₃ (suministra exceso de CO₂ durante la fermentación) y el biogás (60 % CH₄/ 40 % CO₂).

Microorganismo, medio y fermentación de ácido succínico

La cepa A. succinogenes130Z se obtuvo de DSMZ. El cultivo madre se almacenó en glicerol a -80° hasta que se utilizó. El medio de cultivo para siembra está compuesto de (gr. por litro): glucosa (10,0), extracto de levadura (5,0), NaHCO₃(10,0), NaH₂PO₄·2H₂O (9,6), K₂HPO₄·3H₂O (20,3). El medio se esterilizó a 121 °C durante 20 min. El cultivo para siembra se cultivó a 37°C y 150 rpm en botellas anaeróbicas cerradas de 50 mL que contienen 30 ml de medio e inoculados con 1 ml de cultivo madre de glicerol a -80.

60

Los lotes de experimentos de mejora del biogás y de producción de ácido succínico se llevaron a cabo en duplicados. Los experimentos de fermentación se llevaron a cabo utilizando biogás (60 % CH₄, 40 % CO₂) o 100 % CO₂ como fuente de CO₂ para la producción de ácido succínico. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 1,01325 bar (presión atmosférica) o a una presión de 1,6 bar.

5

El medio experimental para mejora de biogás y fermentación estaba compuesto de (por litro): extracto de levadura (10,0), K₂HPO₄(3,0), MgCl₂(0,2), CaCl₂(0,2), NaCl (1,0). El medio se esterilizó a 121 °C durante 20 min.

10 Todas las fermentaciones del lote en biorreactores 3-l se llevaron a cabo a 37 °C, pH 6,75, 200 rpm durante 24 horas y se inocularon con 5 % (v/v) de inóculo exponencialmente creciente. Antes de empezar la fermentación, se ajustó el pH a 6,8 añadiendo ácido fosfórico al 50 % y 0,05 ml de Antiespumante estéril 204 (Sigma Aldrich). Se añadió automáticamente 8 M NaOH para mantener el pH a 6,8 durante la fermentación. Se utilizó N₂ gaseoso en todos los casos para crear condiciones anaeróbicas.

15 **Análisis de la muestra:**

20 Se midieron y cuantificaron glucosa, succinato, lactato, formiato, acetato y etanol utilizando cromatografía de líquido de alto rendimiento (HPLC). El HPLC (Agilent) tenía un detector de índice refractivo, una columna de Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm × 7,8 mm) con 0,04 M H₂SO₄ cuando el eluyente y la velocidad de flujo se estableció a 0,6 mL/min con la temperatura del horno de columna establecida a 63,5 °C.

El metano y el dióxido de carbono se analizaron GC-TCD provisto de columna paralela de 1,1 m × 3/16 in. Molsieve 137 y 0,7 m × 1/4 in. chromosorb 108.

25 El CO₂ soluble se monitorizó utilizando el sensor de Mettler Toledo InPro 5000 CO₂ / transmisor electrónico de CO₂ 5100. El crecimiento bacteriano se midió en 660 nm utilizando el espectrofotómetro de Jenway Buch y Holm A/S 64050UV/vis.

Los resultados de los experimentos se muestran en las figuras 2 a 6.

30 **Conclusión:**

Los presentes inventores han demostrado que el biogás se puede mejorar para contener más del 99 % (99,6 %) de CH₄ utilizando el presente procedimiento que comprende la producción simultánea de ácido succínico.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fabricación de un gas combustible mejorado, dicho procedimiento comprende los pasos de:
- 5
- a. proporcionar un biorreactor,
 - b. proporcionar microorganismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
 - c. proporcionar un sustrato de carbono para dichos microorganismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
 - d. añadir un gas combustible que contiene CO₂ al biorreactor,
 - 10 e. recoger el gas combustible mejorado así producido, donde dicho gas combustible mejorado tiene un contenido de CO₂ inferior al gas combustible que contiene CO₂ añadido y
 - f. recoger, de manera opcional, el ácido succínico que contiene efluente.
2. Un procedimiento de fabricación de un gas combustible mejorado y, simultáneamente, producir ácido succínico, dicho procedimiento comprende los pasos de:
- 15
- a. proporcionar un biorreactor,
 - b. proporcionar microorganismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
 - c. proporcionar un sustrato de carbono para dichos microorganismos anaeróbicos que producen ácido succínico,
 - 20 d. añadir un gas combustible que contiene CO₂ al biorreactor,
 - e. recoger el gas combustible mejorado así producido, donde dicho gas combustible mejorado tiene un contenido de CO₂ inferior al gas combustible que contiene CO₂ añadido y
 - f. recoger el efluente que contiene el ácido succínico.
- 25 3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde se selecciona dicho gas combustible que contiene CO₂- del grupo que consiste en biogás, gas de síntesis y gas de hulla.
4. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, donde dicho gas combustible que contiene CO₂- es biogás.
- 30 5. El procedimiento de reivindicación 4, donde el biogás mejorado así producido tiene un contenido de CH₄ de, al menos, el 90 % de CH₄.
6. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, donde dicho microorganismo anaeróbico que produce ácido succínico es una bacteria anaeróbica que produce ácido succínico.
- 35 7. El procedimiento de la reivindicación 6, donde dicha bacteria que produce ácido succínico se selecciona del grupo en el que constan: *Actinobacillus succinogenes* (*A. succinogenes*), *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (*A. succiniciproducens*), *Mannheimia succiniciproducens* (*M. succiniciproducens*), *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) y recombinante *Escherichia coli* (*E. coli*).
- 40 8. El procedimiento de cualquier reivindicación 6 a 7, donde dicha bacteria anaeróbica que produce ácido succínico es *Actinobacillus succinogenes*.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedente, donde dicho sustrato de carbono es un sustrato de hidrato de carbono.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 9, donde dicho sustrato de hidrato de carbono comprende uno más de los siguientes compuestos: glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, maltosa, fructosa, sacarosa, celobiosa, lactosa, manitol, arabitol, sorbitol, manosa, ribosa, glicerol, pectina, beta-glucósida, gluconato, idonate, ascorbato, glucarate, galactarate y/o 5-ceto-gluconate.
- 50 11. El procedimiento de reivindicación 10, donde el sustrato de carbohidratos comprende glicerol.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho procedimiento comprende, además, el paso de recuperar y/o purificar el ácido succínico del efluente que contiene ácido succínico.
- 55 13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho biorreactor comprende un sistema de inyección de gas que comprende fibras huecas.
- 60

14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho biorreactor es un reactor de depósito de agitación continuo (CSTR).

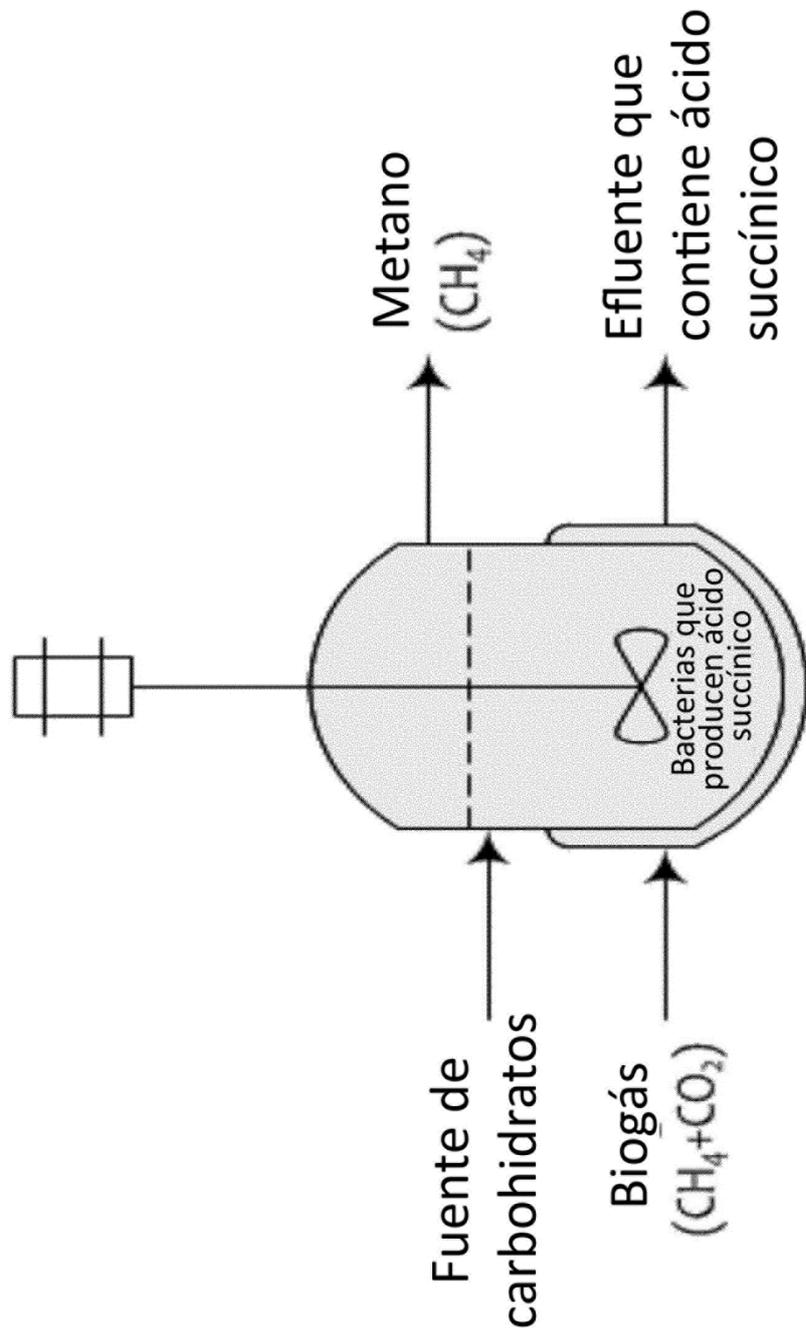


Figura 1

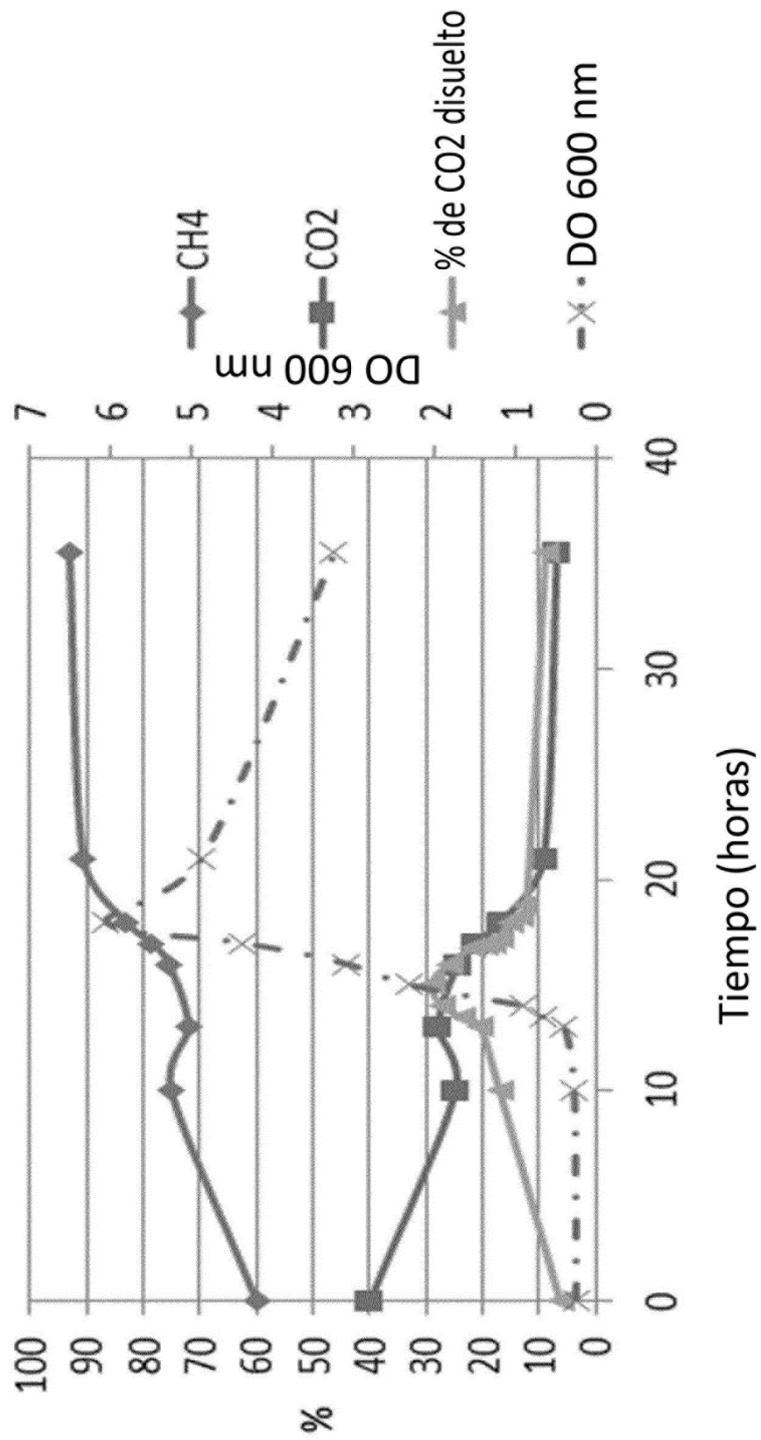


Figura 2

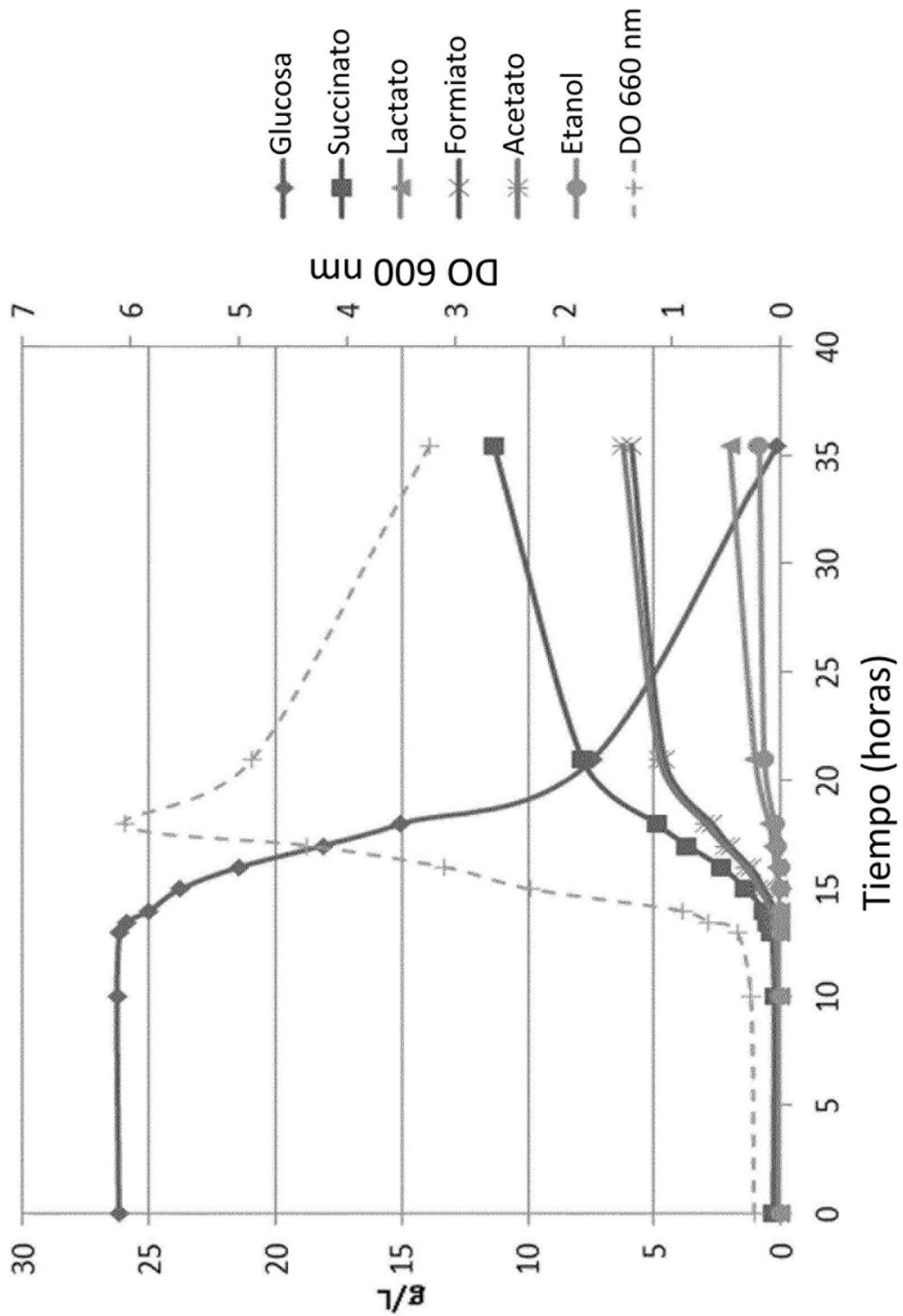


Figura 3

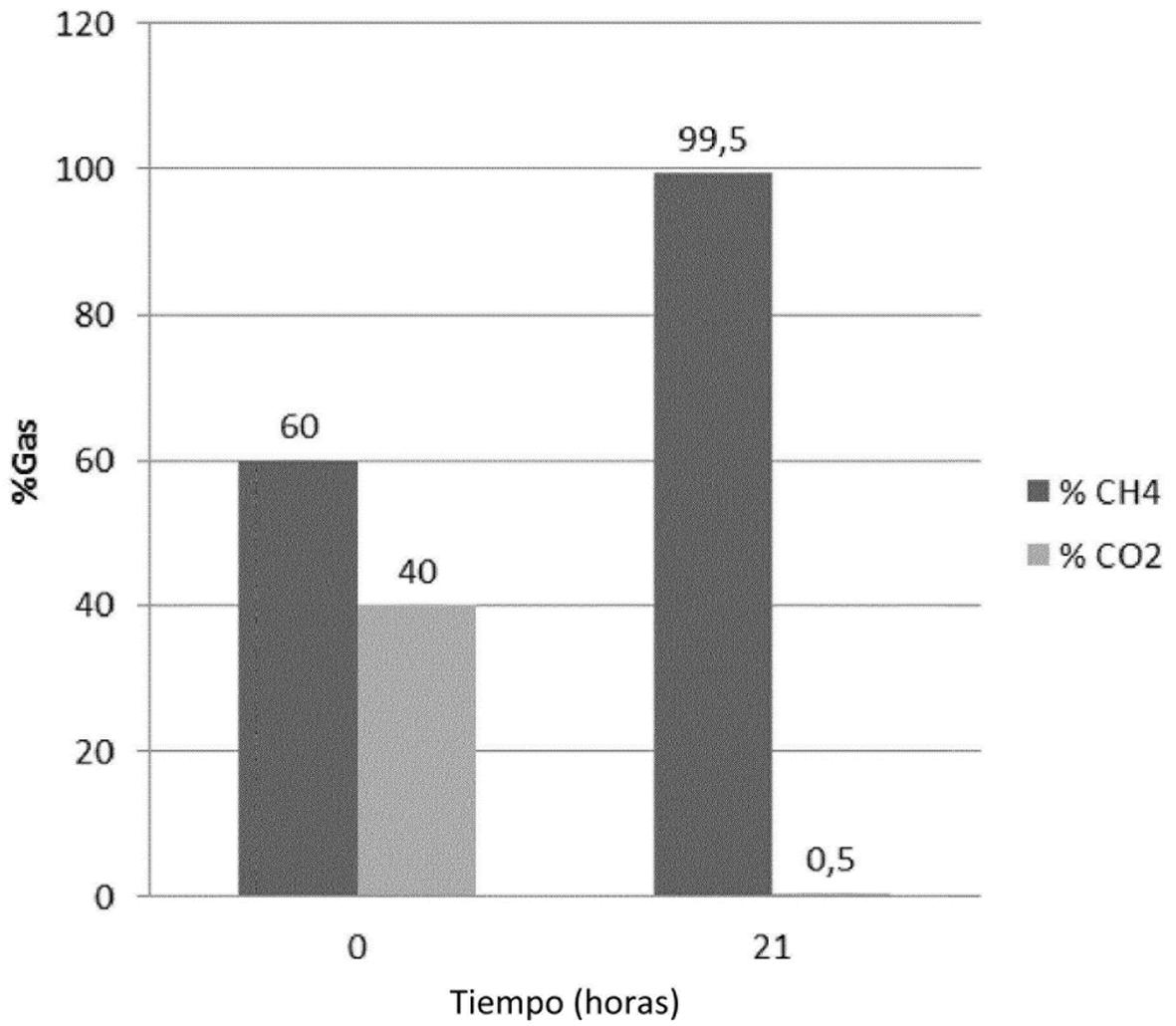


Figura 4

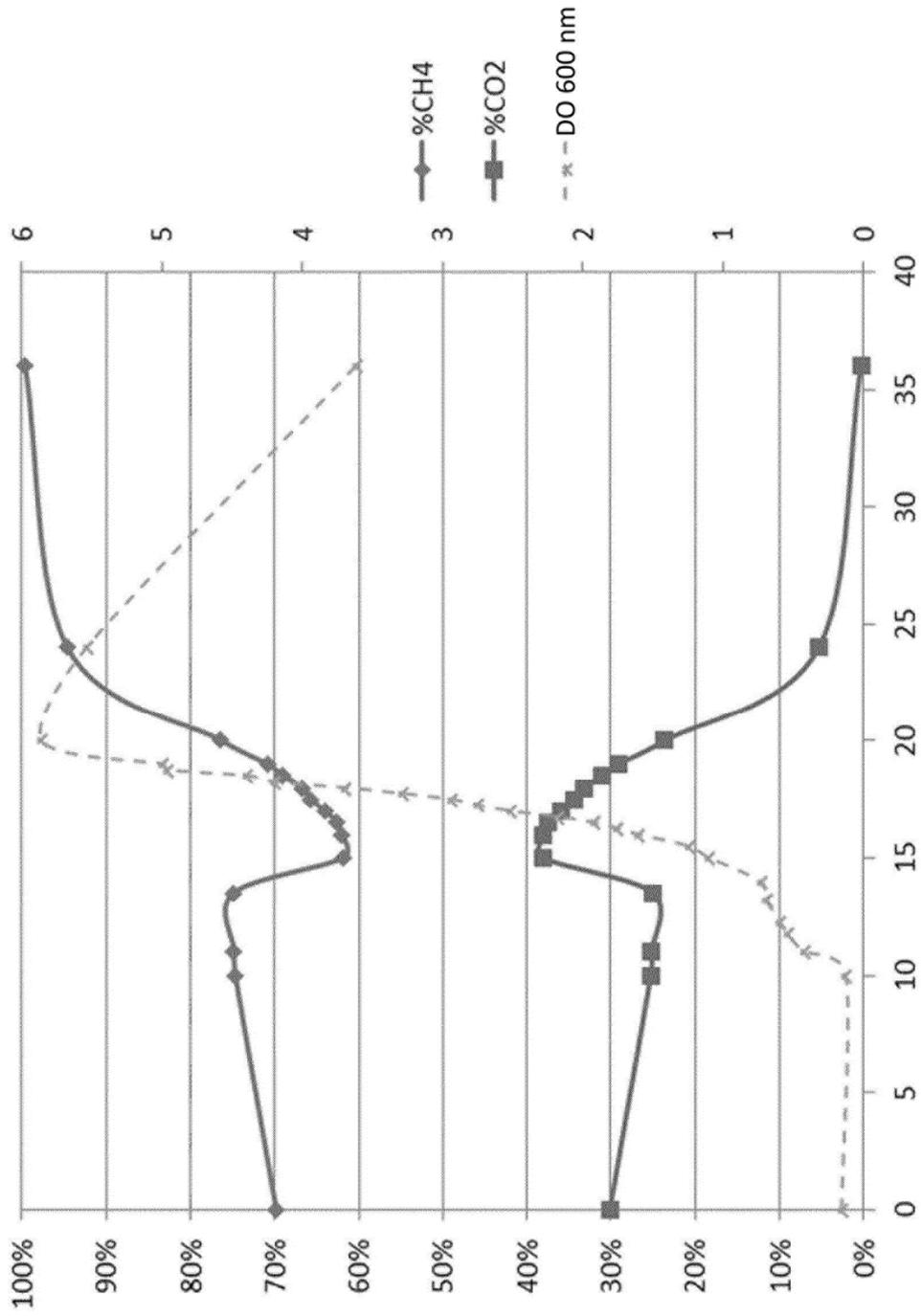


Figura 5

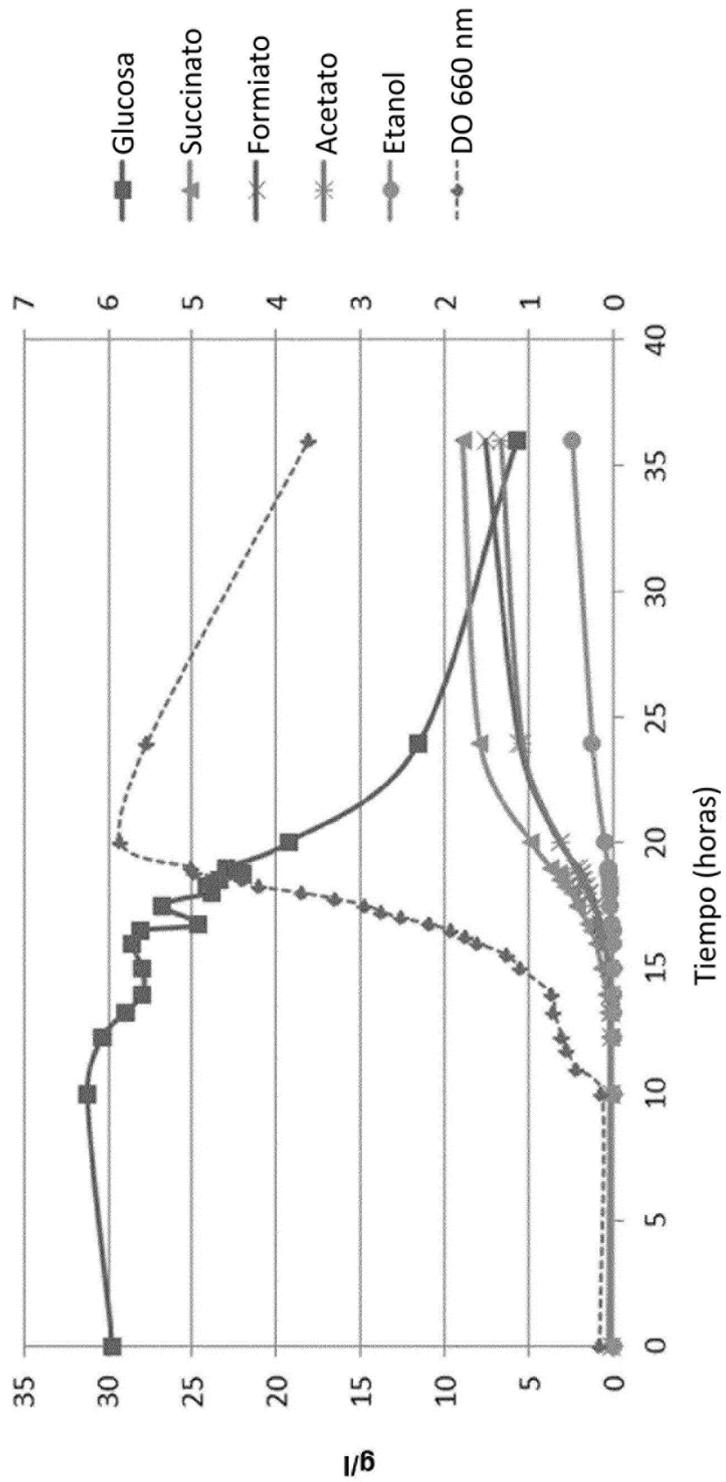


Figura 6

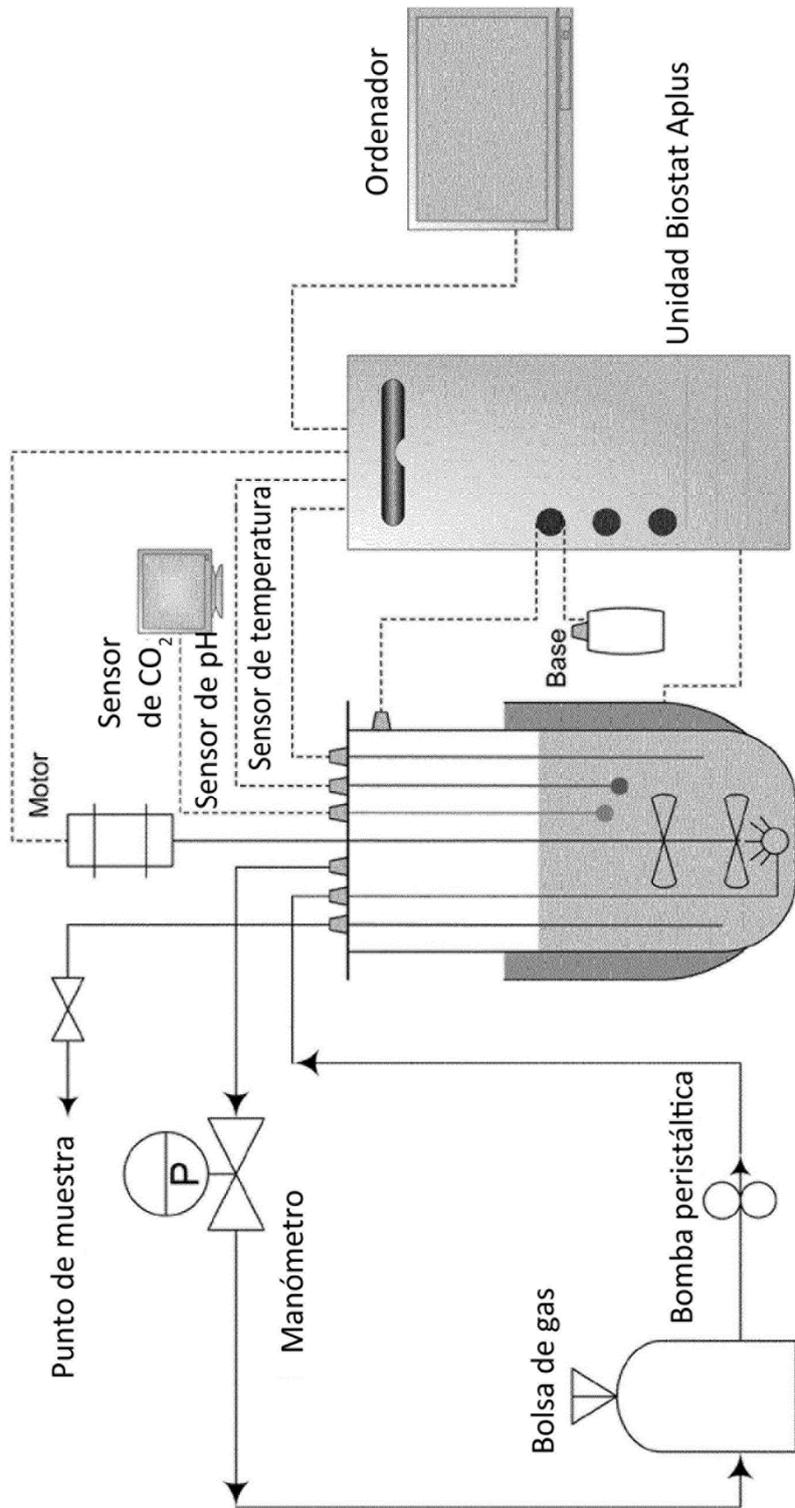


Figura 7

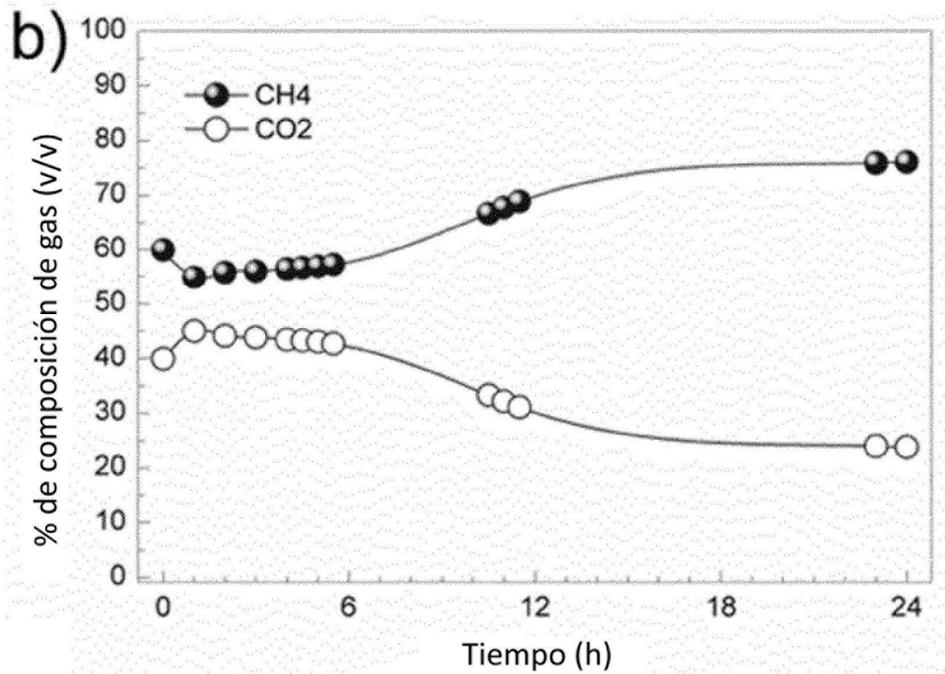
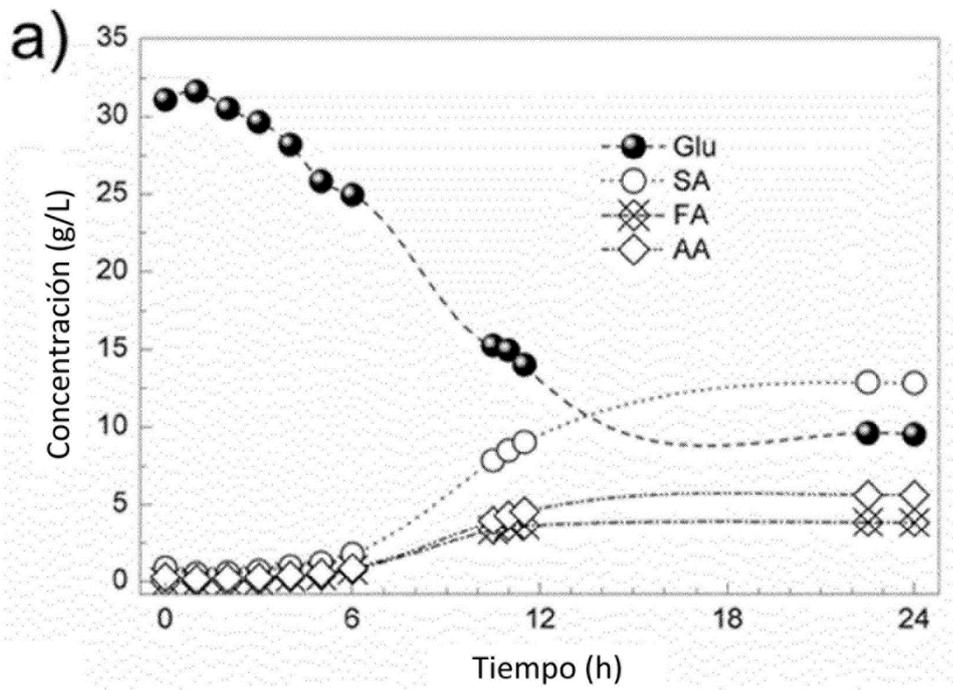


Figura 8

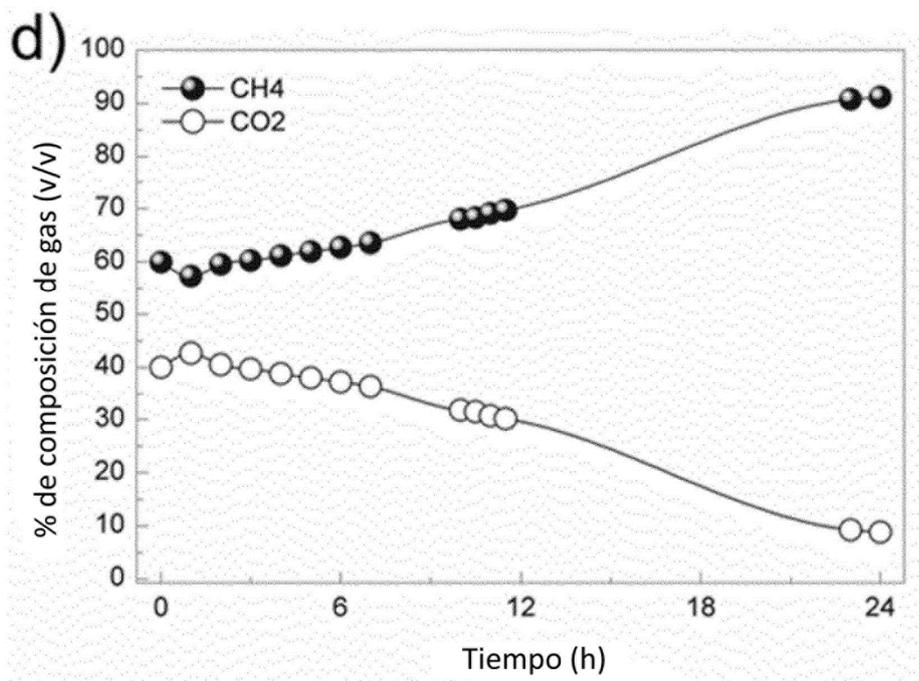
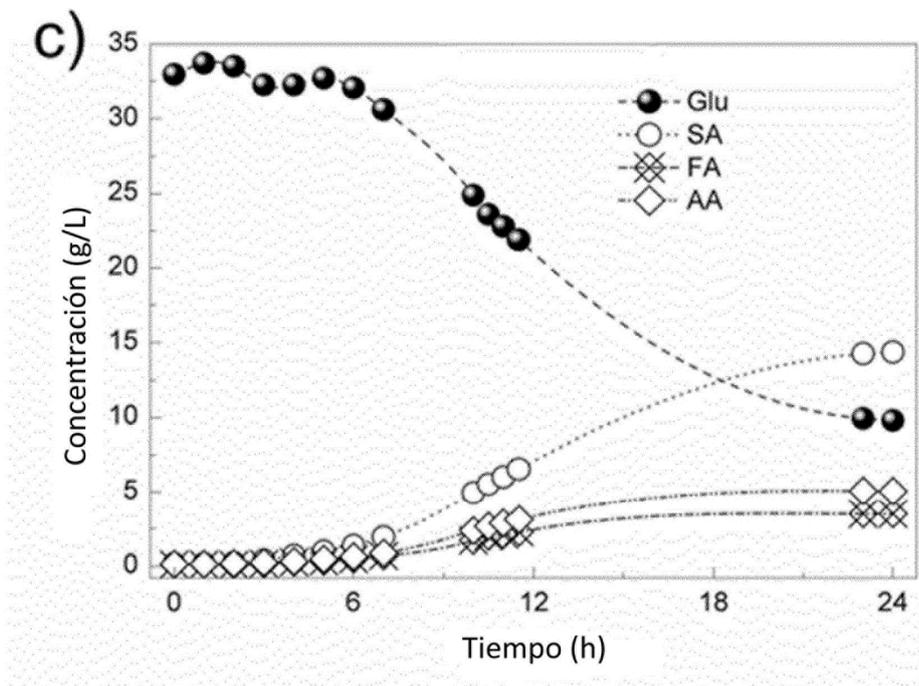


Figura 8 - continuación

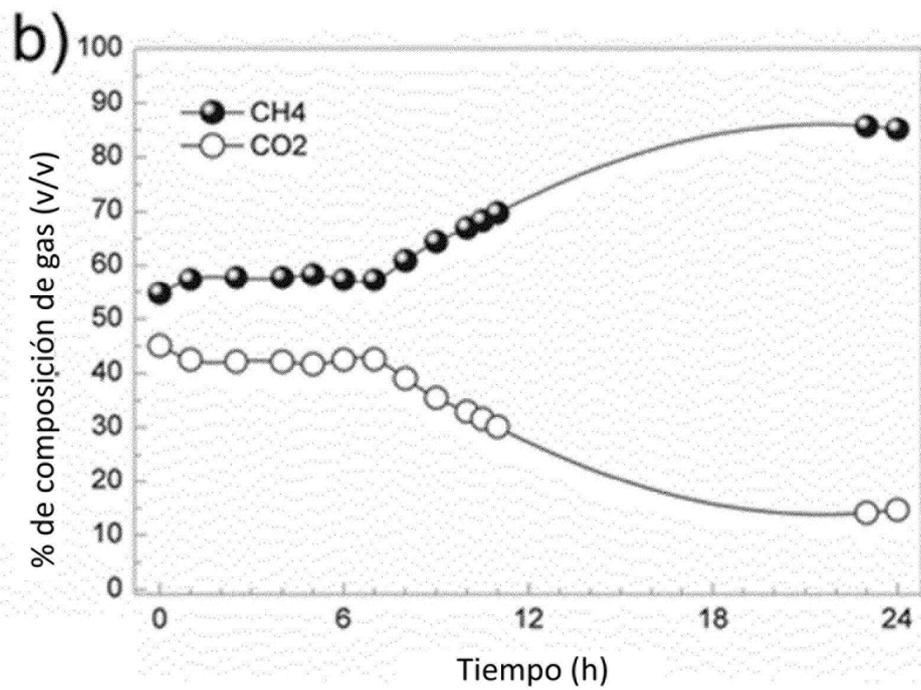
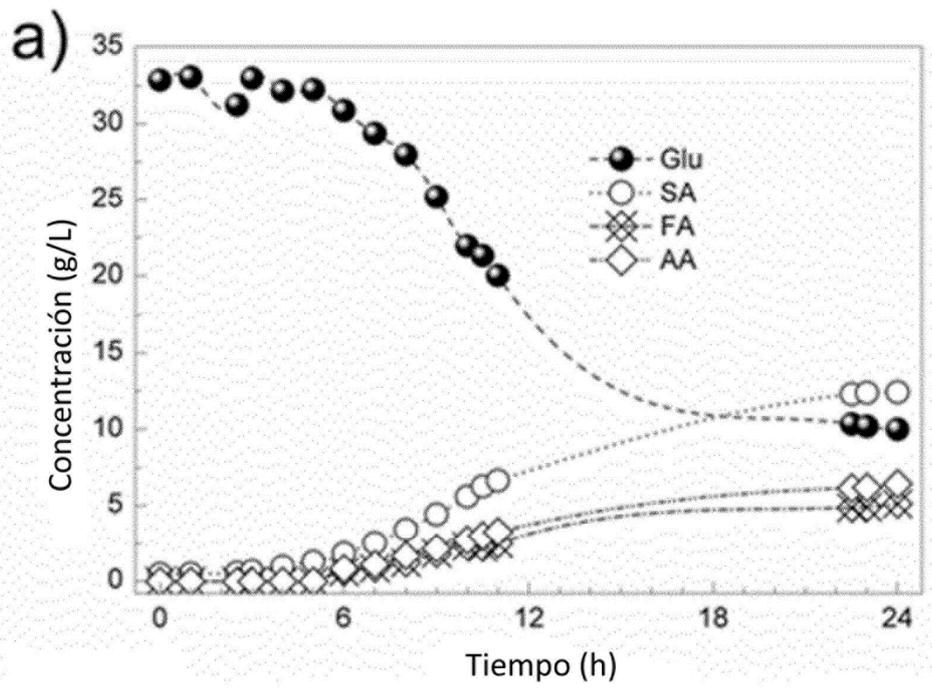


Figura 9

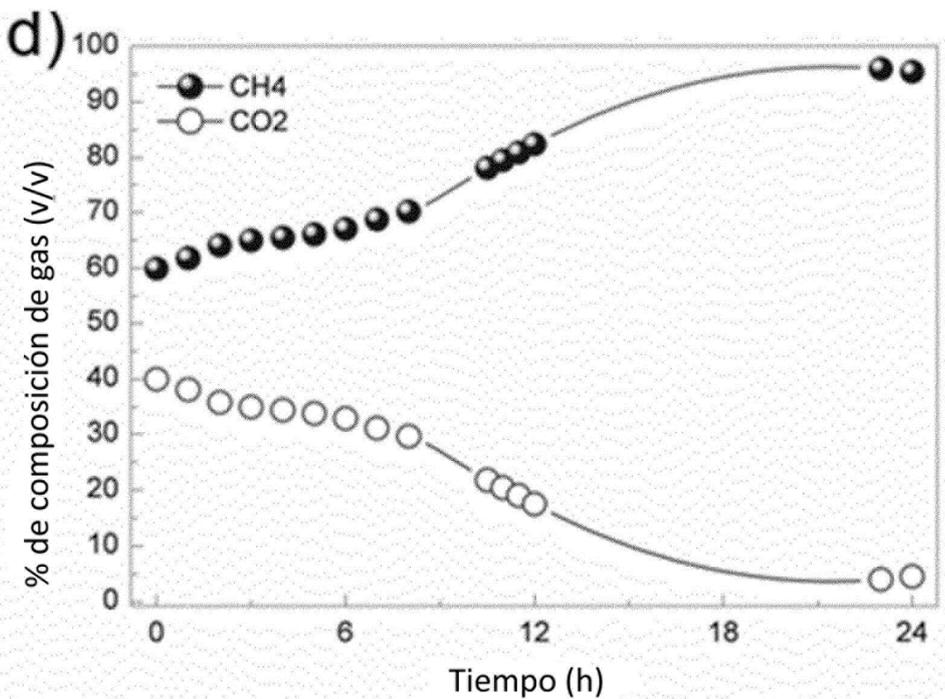
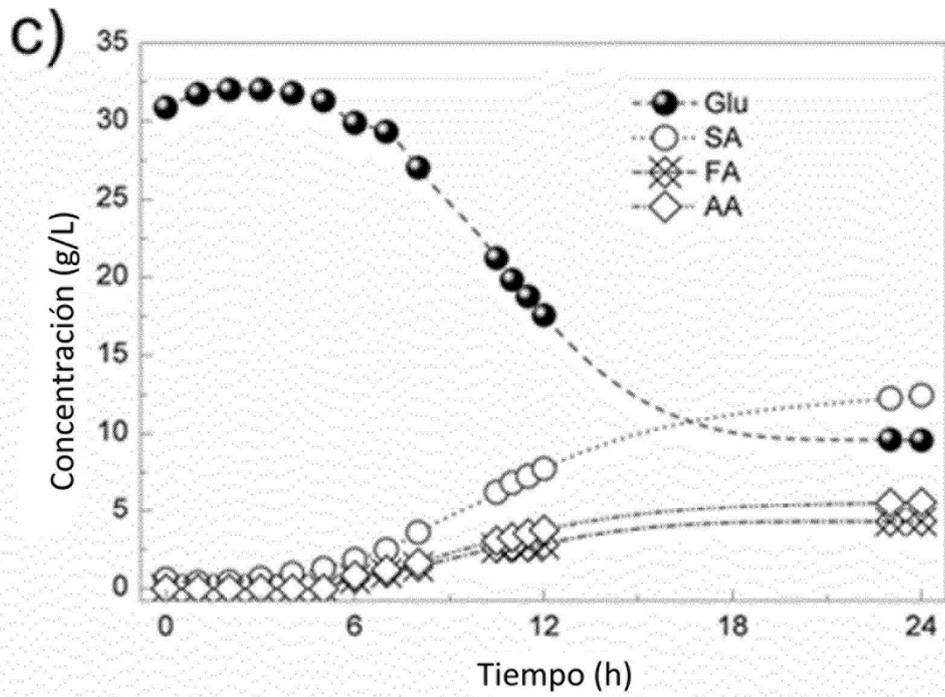


Figura 9 - continuación