

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 325**

51 Int. Cl.:

**C11B 1/10** (2006.01)

**C11B 1/00** (2006.01)

**B01D 17/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2015 PCT/NL2015/050117**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2015 WO15130167**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2015 E 15710946 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3110930**

54 Título: **Procedimiento para la recuperación de lípidos o hidrocarburos**

30 Prioridad:

**28.02.2014 NL 2012334**

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

**23.11.2020**

73 Titular/es:

**DELFT ADVANCED BIOFUELS B.V. (100.0%)  
Alexander Fleminglaan 1  
2613 AX Delft, NL**

72 Inventor/es:

**CUELLAR SOARES, MARIA CLAUDIA;  
VAN DER WIELEN, LUCAS ANTONIUS MARIA y  
HEERES, ARJAN SEBASTIAAN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 795 325 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 recuperación de lípidos o hidrocarburos

La invención se dirige a un método para recuperar un lípido o hidrocarburo líquido de una mezcla de fermentación.

5 Se sabe en la técnica que producir hidrocarburos líquidos o lípidos por fermentación. En dicho procedimiento de fermentación, se usan microorganismos para convertir un sustrato apropiado en hidrocarburo, lípido o una mezcla de los mismos. Tal producción microbiana de hidrocarburos o lípidos se usa, por ejemplo, para producir biocombustibles. Adicionalmente, los compuestos químicos intermedios y los compuestos de sabor o fragancia se pueden producir de esta manera.

10 La mezcla de fermentación obtenida por el procedimiento de fermentación es una mezcla compleja que comprende microorganismos, sustrato, nutrientes, el producto de fermentación líquido (por ejemplo, hidrocarburo o lípido) y el producto de fermentación gaseosa (esto es, gas de fermentación). La mezcla es una mezcla de cuatro fases (S-G-L-L): células microbianas (sólido), gas de fermentación y/u otros gases (gas), medio acuoso (líquido) y el hidrocarburo o lípido (líquido).

15 Un problema encontrado en la producción microbiana de hidrocarburos o lípidos por fermentación es que es difícil separar los hidrocarburos y lípidos producidos de la mezcla de fermentación compleja.

La separación del hidrocarburo y el lípido generalmente se basa en la baja miscibilidad al agua de los lípidos o hidrocarburos con el medio acuoso, como también se describe en la siguiente técnica anterior.

20 El documento EP 2 196 539 describe el uso de diferentes técnicas de separación sólido-líquido-líquido para separar los biocombustibles de lípidos e hidrocarburos (BHC) de una mezcla de fermentación. Las etapas preferidas para esto incluyen el uso de flotación del BHC usando dióxido de carbono disuelto y otros componentes en el gas de fermentación en combinación con un dispositivo de tipo venturi (u otros dispositivos de reducción de presión) o el uso de hidrociclones. No se inyecta gas activamente en el reactor.

25 El documento WO 2007/139924 está dirigido a un método de producción y separación de compuestos bioorgánicos en un sistema de dos fases, cuyo sistema comprende un medio acuoso con células huésped como una primera capa y una segunda fase orgánica líquida que comprende el compuesto bioorgánico producido por las células huésped. Menciona la producción de gases tal como el dióxido de carbono durante o después del procedimiento de fermentación, que se pueden ventilar mediante una salida de gas. Se describen muchas posibles variantes del método de producción, incluidos los procedimientos de fermentación discontinuos, continuos, alimentados por lotes o semicontinuos y las células huésped aerobias o anaerobias.

30 El documento WO 2012/024186 se dirige a un procedimiento de purificación más específico en el que una composición que comprende un surfactante, células huésped y un compuesto bioorgánico se calienta desde abajo a arriba una temperatura de inversión de fase de la composición, desestabilizando así la emulsión.

35 Los documentos WO 2010/123903, US 2009/029445 y US 2012/129244 describen procedimientos para recolectar los componentes intracelulares de una solución acuosa que comprende microorganismos, en particular algas. Estos procedimientos incluyen la ruptura de las paredes celulares de los microorganismos para liberar los componentes intracelulares en la solución acuosa. Los componentes intracelulares se pueden separar de la solución aplicando microburbujas y formando una capa de espuma, de modo que los componentes intracelulares se unen a las microburbujas y flotan hacia arriba hacia la superficie de la solución acuosa. Los componentes intracelulares se recuperan separando la espuma de la solución acuosa.

40 El documento US 7,960.574 describe un método de separación de aceite de semillas que contienen aceite, que comprende airear una dispersión acuosa de partículas germinales de semillas que contienen aceite. La aireación produce burbujas a las que se adhiere el aceite y las burbujas forman una espuma en la superficie superior de la dispersión. El aceite se recupera separando la espuma de la dispersión.

45 Una desventaja de los documentos WO 2010/123903, US 2009/029445, US 2012/129244 y US 7,960.574 es que el producto se obtiene como parte de una espuma, de modo que aún se requiere una separación de fases adicional (por ejemplo, decantación, centrifugación) para aislar el producto.

Es un objeto de la invención recuperar el producto de fermentación líquido de la mezcla de fermentación de una manera más eficiente mejorando la separación del producto líquido y el medio acuoso de la mezcla de fermentación.

50 Este objetivo se cumple proporcionando un método para recuperar un lípido o hidrocarburo de una mezcla de fermentación, que comprende las etapas de

- proporcionar una mezcla de fermentación en la que el lípido o el hidrocarburo se produce por fermentación microbiana en un recipiente de fermentación o un primer compartimento de un reactor de fermentación, en el que el lípido o el

hidrocarburo se secreta en la mezcla de fermentación por microorganismos vivos, y cuya mezcla comprende una fase acuosa y una fase de producto líquido, en la que la fase de producto líquido comprende el lípido o el hidrocarburo; y

- alimentar al menos parte de la fase acuosa y parte de la fase del producto líquido a un segundo recipiente o a un segundo compartimento del reactor de fermentación, formando así una segunda mezcla; y

5 - promover la separación de fases de la fase acuosa y del producto inyectando un gas en la segunda mezcla, separando así la fase del producto de la fase acuosa; y

10 - recoger la fase del producto que comprende el lípido o el hidrocarburo. Preferiblemente, el recipiente de fermentación y el segundo recipiente son compartimentos separados en un reactor de fermentación (preferiblemente un reactor por inyección de gas). En este caso, el recipiente de fermentación se denomina el primer compartimento y el segundo recipiente como el segundo compartimento. Alternativamente, el recipiente de fermentación y el segundo recipiente pueden ser reactores separados. Las condiciones en el recipiente de fermentación son apropiadas para la fermentación. Las condiciones en el segundo recipiente son apropiadas para la separación de fases (y generalmente son diferentes de las condiciones de fermentación).

15 Los inventores descubrieron que al inyectar gas en la segunda mezcla, se mejora la separación de fases del medio acuoso y la fase del producto líquido. Por inyección activa del gas, las fases se pueden separar de una manera más controlada. Esto permite una separación de fases más eficiente, por ejemplo evitando o reduciendo la formación de crema en el recipiente de fermentación y/o desestabilizando una emulsión si se forma. En particular, controlando el caudal de gas y/o el tamaño de las burbujas de gas del gas inyectado, la fase de producto líquido se puede separar y recuperar más eficientemente de la mezcla de fermentación.

20 Sin desear limitarse a ninguna teoría, los inventores esperan que ciertos compuestos producidos por el microorganismo durante la fermentación actúen como surfactantes. Estos surfactantes se eliminan posiblemente inyectando gas en la mezcla líquida (esto es, en la mezcla de la fase acuosa y la fase líquida del producto), lo que da como resultado la separación de la fase del producto y la fase acuosa. Un mecanismo alternativo a través del cual puede funcionar la invención es que las gotas de producto líquido se unan a las burbujas de gas inyectadas de tal manera que se mejore la fusión de la fase del producto.

25 Como se mencionó anteriormente, una ventaja adicional de la invención es que la formación de una capa de crema en el segundo recipiente se puede reducir o incluso prevenir.

30 Cuando se realiza la fermentación en un recipiente o reactor de tipo columna, generalmente se formarán diferentes capas. Como generalmente se realiza una mezcla vigorosa en el recipiente de fermentación, tales capas generalmente solo se formarán en el segundo recipiente. De este modo, la segunda mezcla puede comprender una o más capas, como se describe a continuación. Primero, se puede formar una capa de espuma en la parte superior de la columna, causada por uno o más de la mezcla vigorosa de la mezcla de fermentación, la inyección de gas que contiene oxígeno (en caso de fermentación aerobia) y la producción de gas de fermentación. Dicha capa de espuma comprende una gran cantidad de burbujas, de modo que la densidad es generalmente inferior a  $500 \text{ kg/m}^3$ . Adicionalmente, se puede formar una capa de crema. La capa de crema es una emulsión del producto de fermentación líquido (lípido o hidrocarburo) y agua. Esta capa tendrá una densidad mayor que la capa de espuma, por lo general de aproximadamente  $600$  a  $980 \text{ kg/m}^3$ . La capa de espuma y la capa de crema generalmente se formarán en la parte superior de la fase acuosa, que se puede considerar la capa inferior. La capa acuosa por lo general tiene una densidad de aproximadamente  $1000 \text{ kg/m}^3$ , por ejemplo, por encima de  $990 \text{ kg/m}^3$ )

40 Se puede formar una capa de crema, por ejemplo, cuando se sedimenta (parte de) la mezcla de fermentación, por ejemplo, después de la sedimentación por gravedad o centrifugación. A veces también se puede formar espontáneamente en condiciones de fermentación. Normalmente se forma una capa de crema entre la capa acuosa (capa inferior - fase acuosa) y la capa de aceite (capa superior - fase del producto). Cuando se forma, la capa de crema generalmente tendrá una cantidad relativamente alta de producto líquido en comparación con el contenido del resto de la mezcla de fermentación. Sin embargo, la crema comprende grandes gotas de producto líquido que no se pueden unir más. Para obtener el producto de la capa de crema, la crema debe "romperse", de modo que pueda producirse una mayor fusión. Los inventores descubrieron que esto se puede lograr inyectando gas según el método de la invención. De acuerdo con lo anterior, se formará una cuarta capa: la capa del producto. La composición de la capa del producto generalmente corresponde a la composición de la fase del producto en la mezcla de fermentación. Esta capa puede comprender al menos 90% en peso, más preferiblemente al menos 95% en peso del producto líquido (hidrocarburo o lípido). En caso de que esté presente un disolvente orgánico en la fase del producto para extraer el producto de fermentación líquido, al menos el 90% en peso, preferiblemente al menos el 95% en peso de la capa del producto consistirá en una solución orgánica que comprende el producto de fermentación líquido y posibles hidrocarburos no producidos en la fermentación. Debido a la alta cantidad de producto líquido, la densidad de esta capa será menor que la de la capa de crema (si se forma), pero aún mayor que la de la capa de espuma.

Adicionalmente, las diferentes capas se pueden distinguir por su fracción de volumen de aceite. La fracción de volumen de aceite será más alta en la fase del producto. La capa del producto puede tener una fracción de volumen de aceite que se encuentra entre 0.9 y 1.0. La capa de crema puede tener una fracción de volumen de aceite que se encuentra

entre 0.5 y 0.9. La capa de espuma puede tener una fracción de volumen de aceite que se encuentra entre 0.01 y 0.4. El término "fracción de volumen de aceite" se refiere a la cantidad total de producto de fermentación líquido presente en la capa (en particular, la cantidad total de lípidos e hidrocarburos producidos por los microorganismos presentes en la capa), dividido por el volumen total de la capa.

- 5 La separación de fases según la invención se puede promover por flotación de gas inducida (IGF). Usando esta técnica, las burbujas de gas se inyectan activamente en el líquido.

En particular, la separación de fases se puede promover controlando la velocidad del gas superficial.

- 10 La velocidad del gas superficial se define como el volumen total de gas (por ejemplo, en  $\text{cm}^3$ ) que pasa a través de un área de la sección transversal del recipiente (por ejemplo, en  $\text{cm}^2$ ) durante un cierto período de tiempo (por ejemplo, por segundo). Preferiblemente, el gas se inyecta para obtener una velocidad del gas superficial en el segundo recipiente en el intervalo de 0.01-2.0  $\text{cm/s}$ , más preferiblemente 0.05-1.5  $\text{cm/s}$ , incluso más preferiblemente 0.1-1.0  $\text{cm/s}$ . Tales valores para la velocidad del gas superficial son considerablemente más bajos que los valores por lo general usados en la fermentación aerobia. En caso de fermentación aerobia, el gas oxidante se alimenta a una velocidad de gas más alta para proporcionar adecuadamente a los microorganismos con oxígeno suficiente.

- 15 La velocidad del gas superficial se mide en el punto de inyección del gas. Esto significa que el área de la sección transversal del recipiente se determina a la altura del recipiente donde se inyecta el gas. En caso de múltiples puntos de inyección, la velocidad del gas superficial debe estar dentro del intervalo especificado anteriormente al menos uno de los múltiples puntos de inyección. El área de la sección transversal se mide por lo general perpendicular a la dirección del flujo de gas. En caso de que el recipiente sea un recipiente de tipo columna o columna, el área de la sección transversal se mide por lo general perpendicular a la longitud de la columna. En caso de que el área de la sección transversal del recipiente sea aproximadamente uniforme (por ejemplo, en un recipiente tipo columna), la velocidad del gas superficial puede ser aproximadamente la misma en todo el recipiente. Se puede lograr una cierta velocidad del gas superficial ajustando el caudal del gas a la geometría del recipiente. Por ejemplo, primero se puede determinar el área de la sección transversal del recipiente usado y luego ajustar el caudal del gas (esto es, el volumen de gas inyectado por unidad de tiempo) para lograr la velocidad superficial deseada del gas.

El gas usado en la invención se inyecta por lo general en forma de burbujas de gas. Los inventores esperan que el tamaño de las burbujas pueda mejorar aún más la eficiencia y/o la velocidad de separación de fases. Por ejemplo, se puede lograr una separación de fases más fuerte bajo ciertas condiciones usando un tamaño de burbuja más grande.

- 30 El gas se puede inyectar en la segunda mezcla de cualquier manera apropiada conocida en la técnica. Por lo general, se inyectan burbujas de gas en la mezcla líquida. El gas se puede distribuir ventajosamente a través de un inyector y/o placa sinterizada para obtener el tamaño de burbuja y/o caudal deseados. Para inyectar el gas eficientemente a la mezcla líquida, el gas se alimenta por lo general al recipiente de reacción o, en caso de que se use un segundo recipiente, al segundo recipiente.

- 35 Según la invención, el gas se inyecta en la mezcla líquida, esto es, en una mezcla de la fase acuosa y la fase del producto líquido. La mezcla líquida corresponde a la segunda mezcla. La mezcla líquida puede ser una emulsión, en la que la fase del producto líquido se dispersa en la fase acuosa. La mezcla líquida también puede comprender una crema que comprende un producto líquido.

- 40 El gas puede ser un gas no oxidante, tal como un gas inerte o un gas de fermentación. El gas inerte puede ser, por ejemplo, un gas noble, nitrógeno o  $\text{CO}_2$ . El gas también puede ser un gas de fermentación. Por ejemplo, el gas de fermentación formado por fermentación se puede recoger e inyectar en la segunda mezcla. En este caso, el gas de fermentación generalmente se separa primero de la mezcla de fermentación y luego se recicla al alimentarlo al segundo recipiente.

- 45 Como alternativa, el gas puede ser un gas oxidante, tal como el aire. Por ejemplo, se puede usar aire enriquecido en oxígeno. Tal aire enriquecido también se usa en la fermentación aerobia para proporcionar oxígeno a los microorganismos.

- 50 Según el procedimiento de la invención, se inyecta gas en la segunda mezcla. Sin embargo, también se puede introducir gas en la mezcla de fermentación. Por ejemplo, la mezcla de fermentación se puede mezclar con un mezclador estático. Adicionalmente, en caso de fermentación aerobia, se puede introducir gas que contenga oxígeno (tal como el aire) en la mezcla de fermentación para proporcionar oxígeno a los microorganismos. Adicionalmente, los microorganismos pueden producir gas en la mezcla de fermentación como un producto de fermentación (por ejemplo, gas de fermentación). A pesar de la introducción de dicho gas en la mezcla de fermentación, esto generalmente no dará como resultado la separación de fases de la fase del producto, y mucho menos mejorará la fusión de las gotas de lípidos e hidrocarburos en la mezcla de fermentación. Las condiciones en el recipiente de fermentación simplemente no son apropiadas para dicha separación de fases. Más bien, las condiciones son apropiadas u optimizadas para la fermentación. Por ejemplo, la velocidad del gas superficial del gas inyectado o producido en el primer recipiente generalmente será mayor en el recipiente de fermentación que en el segundo recipiente (por lo general por encima de 1.5  $\text{cm/s}$  o incluso por encima de 2.0  $\text{cm/s}$ ). En vista de las condiciones en el recipiente de fermentación, al menos parte de la fase acuosa y parte de la

fase del producto líquido se transfieren a un segundo recipiente, en el que las condiciones se pueden elegir para que sean apropiadas para la separación de fases.

De acuerdo con lo anterior, al menos parte de la fase acuosa y parte de la fase del producto líquido se alimentan a un segundo recipiente, formando así una segunda mezcla. Esto se puede hacer simplemente alimentando al menos parte de la mezcla de fermentación al segundo recipiente. Cualquier materia sólida que termine en el segundo recipiente se puede reciclar al recipiente de fermentación. Por ejemplo, los microorganismos en el segundo recipiente se pueden reciclar al recipiente de fermentación. En particular, al menos parte de la mezcla líquida (como se definió anteriormente) se puede alimentar al segundo recipiente y formar la segunda mezcla. La segunda mezcla comprende de este modo una mezcla de una fase acuosa y la fase del producto líquido (por ejemplo, en forma de una emulsión). La segunda mezcla puede comprender además una crema (que se puede formar, por ejemplo, en el recipiente de fermentación o en el segundo recipiente). Cuando se usa una etapa de alimentación como se describe anteriormente, el gas se inyectará en la segunda mezcla, en su lugar o además de la inyección de gas en la mezcla de fermentación.

Las condiciones en el segundo recipiente deberían ser apropiadas para promover la separación de fases. Generalmente no se producirá fermentación en el segundo recipiente. De acuerdo con lo anterior, las condiciones en el segundo recipiente pueden ser diferentes de las condiciones en el recipiente de fermentación. Primero, la velocidad del gas superficial en el segundo recipiente puede elegirse de manera diferente. También, se puede usar una temperatura y/o presión diferente en el segundo recipiente. Además, es deseable que no se realice la mezcla en el segundo recipiente, ya que esto puede influir negativamente en la fusión y la separación de fases.

Aunque las condiciones en el segundo recipiente pueden no estar optimizadas para la fermentación, aún no es deseable cuando los microorganismos se alteran en esta etapa. Se encontró que la presencia de productos intracelulares de los microorganismos (en particular, restos celulares) en la segunda mezcla interfiere con la separación de fases y la formación de la capa del producto, como se muestra en el ejemplo 5. Por lo tanto, no es deseable si tales productos intracelulares están presentes en la segunda mezcla. Los productos intracelulares, como se usan en este documento, se pueden referir al material obtenido por la interrupción de microorganismos, en particular por la interrupción de los microorganismos que producen el producto de fermentación. La interrupción se puede referir a la interrupción por lisis celular o disrupción física, química y/o enzimática. Los productos intracelulares incluyen restos celulares, que incluyen los productos intracelulares sólidos, tales como los fragmentos de la pared celular. De acuerdo con lo anterior, la segunda mezcla comprende preferiblemente menos del 5 % en peso de productos intracelulares, más preferiblemente menos del 1% en peso, incluso más preferiblemente menos del 0.1% en peso, incluso más preferiblemente ningún producto intracelular. En particular, la segunda mezcla comprende una cantidad de restos celulares que está por debajo de estos valores.

Preferiblemente, los microorganismos en el segundo recipiente se reciclan alimentándolos de nuevo al recipiente de fermentación. De acuerdo con lo anterior, preferiblemente al menos 50% en peso, más preferiblemente al menos 75% en peso, incluso más preferiblemente al menos 90% en peso, incluso más preferiblemente al menos 95% en peso de la biomasa presente en el segundo recipiente corresponde a la masa de microorganismos intactos. La biomasa, como se usa en este documento, se refiere a la biomasa que se origina de los microorganismos en la mezcla de fermentación distintos de los lípidos o hidrocarburos producidos por los microorganismos, expresados en peso seco. La retroalimentación de los microorganismos intactos se puede lograr configurando el recipiente de fermentación y el segundo recipiente de modo que los microorganismos se puedan retroalimentar rápidamente al recipiente de fermentación y solo permanezcan en el segundo recipiente durante una corta duración. Esto se puede lograr integrando el recipiente de fermentación y el segundo recipiente. Un ejemplo de dicho sistema integrado es un reactor de fermentación con dos compartimentos, en el que la fermentación se realiza en el primer compartimento y la separación de fases en el segundo compartimento.

Después de la fermentación (pero antes de inyectar el gas), al menos parte de la mezcla de fermentación se puede someter a una etapa de sedimentación, por ejemplo, una etapa de sedimentación o centrifugación por gravedad. Dicha etapa se puede usar para aumentar el contenido de producto líquido en la mezcla de fermentación. Debido a la diferencia de densidad entre el producto líquido y el agua, se puede separar parte de la mezcla de fermentación con un mayor contenido de producto líquido. De acuerdo con lo anterior, se obtiene una mezcla líquida enriquecida, esto es, una mezcla líquida que se enriquece en el producto líquido. Por ejemplo, la mezcla de fermentación enriquecida se puede usar como la segunda mezcla y alimentarse al segundo recipiente donde tendrá lugar la inyección de gas. En caso de que la etapa de sedimentación se realice solo en una parte de la mezcla de fermentación (por ejemplo, la segunda mezcla), generalmente se realiza en un recipiente que no sea el recipiente de fermentación (esto es, en un sedimentador). Por ejemplo, la segunda mezcla se puede someter a sedimentación, antes o después de alimentarla al segundo recipiente. Dado que cualquier formación de crema que pueda surgir se puede procesar fácilmente con la inyección de gas como se describió anteriormente, una etapa de sedimentación se puede usar adecuadamente como una etapa de procedimiento para obtener el producto líquido de una mezcla de fermentación.

La materia sólida, tal como los microorganismos, puede transferirse desde el recipiente de fermentación (por ejemplo, el primer compartimento del reactor de fermentación) al segundo recipiente (por ejemplo, el segundo compartimento del reactor de fermentación). En el caso de un procedimiento continuo, la materia sólida se retroalimenta por lo general al recipiente de fermentación. Además, en el segundo recipiente, la segunda mezcla se puede formar dejando que se asiente la parte de la fase líquida del producto y parte de la fase acuosa. Esto puede provocar la formación de crema o

una emulsión. Como la mezcla de fermentación generalmente necesita mezclarse (por ejemplo, mediante agitación o mediante la adición de gas), tal formación no siempre se produce en la mezcla de fermentación.

5 El segundo recipiente y el recipiente de fermentación pueden estar conectados opcionalmente, de modo que la mezcla de fermentación y la segunda mezcla estén en contacto directo entre sí. De acuerdo con lo anterior, parte de la mezcla líquida puede alimentarse continuamente al segundo recipiente.

El recipiente de fermentación y el segundo recipiente pueden ser compartimentos separados en un reactor de fermentación. Alternativamente, el recipiente de fermentación y el segundo recipiente son reactores separados.

A continuación se describen detalles más específicos sobre la configuración general del recipiente de fermentación y las condiciones bajo las cuales se realiza el procedimiento.

10 El recipiente de fermentación comprende una salida a través de la cual la al menos parte de la fase acuosa y parte de la fase del producto líquido se pueden transferir al segundo recipiente. Preferiblemente, no hay burbujas de gas presentes en la al menos parte de la fase acuosa y parte del producto líquido.

15 El recipiente de fermentación puede comprender además una salida de gas, que permite que las burbujas de gas salgan del recipiente de fermentación. Dicha salida de gas puede garantizar que las burbujas de gas introducidas (por ejemplo, inyectadas o formadas (por ejemplo, gas de fermentación) en la mezcla de fermentación no entren directamente en el segundo recipiente. Esto sería indeseable, ya que pueden tener un efecto negativo sobre la fusión y la separación de fases.

El segundo recipiente puede comprender además una salida a través de la cual los microorganismos pueden reciclarse al recipiente de fermentación.

20 En caso de que el recipiente de fermentación y el segundo recipiente sean compartimentos separados en un reactor de fermentación. El primer compartimento en el reactor de fermentación es el compartimento en el que tiene lugar la fermentación. El primer compartimento comprende la mayoría de los microorganismos (más del 50% en peso, por lo general más del 80% en peso). El segundo compartimento es el compartimento del reactor de fermentación en el que se promueve la separación de fases. El reactor de fermentación puede ser un reactor por inyección de gas o un reactor de columna de burbujas con dos compartimentos. Preferiblemente, el reactor de fermentación es un reactor por inyección de gas. El reactor por inyección de gas puede tener una recirculación interna, por ejemplo usando un tubo de aspiración, o una recirculación externa.

25 En el caso de dos reactores separados, el recipiente de fermentación puede ser, por ejemplo, un reactor de fermentación (por ejemplo, un reactor de columna de burbujas o un reactor por inyección de gas), mientras que el segundo recipiente es un reactor de separación, como un reactor de gas líquido (por ejemplo, un reactor de columna de burbujas) o un reactor de flotación de gas inducido (por ejemplo, un separador de flotación de gas inducido).

30 Preferiblemente, el recipiente de fermentación y/o el segundo recipiente es un recipiente o reactor de tipo columna, por ejemplo, un reactor de fermentación de tipo columna. El procedimiento se realiza por lo general en flujo ascendente, lo que significa que al menos parte de la fase acuosa de la mezcla de fermentación se mueve hacia arriba en el recipiente de fermentación. En caso de que el recipiente de fermentación y el segundo recipiente sean compartimentos separados en un reactor de fermentación, el reactor de fermentación se configurará de modo que la fase acuosa y la fase del producto fluyan desde el primer compartimento (recipiente de fermentación) al segundo compartimento (segundo recipiente). Además, puede haber recirculación sobre el recipiente de fermentación. Esto puede ser una recirculación interna, por ejemplo, usando un tubo de aspiración, o una recirculación externa.

40 El método de la invención se puede realizar por lotes, alimentados por lotes o de forma continua.

45 El recipiente de fermentación y el segundo recipiente se pueden hacer funcionar a una presión de entre 1.0-1.2 bar, preferiblemente a presión ambiente (aproximadamente 1.0 bar). Se puede usar una temperatura entre 5 y 60 °C, por lo general entre 20 y 40 °C. Se pueden usar bajas temperaturas siempre que el agua y el producto líquido no se solidifiquen. Como se describió anteriormente, la temperatura y la presión en el recipiente de fermentación y el segundo recipiente pueden ser diferentes, pero generalmente se eligen (independientemente la una de la otra) dentro de los intervalos anteriores.

Como se describió anteriormente, la mezcla de fermentación comprende microorganismos, un sustrato y los productos de fermentación (hidrocarburos y/o lípidos, gas de fermentación).

50 Los microorganismos en el recipiente de fermentación son microorganismos capaces de producir hidrocarburos o lípidos por fermentación. Por lo tanto, la mezcla de fermentación se mantiene en condiciones apropiadas para que los microorganismos produzcan lípidos o hidrocarburos. Las condiciones en el recipiente de fermentación pueden ser además apropiadas para que los microorganismos en la mezcla de fermentación crezcan y/o se reproduzcan. De este modo, será evidente que las condiciones se eligen de modo que no se interrumpa, dañe o inactive una gran cantidad de microorganismos en el recipiente de fermentación de ninguna otra manera, de modo que ya no puedan fermentarse.

55 Preferiblemente, la mezcla de fermentación se mezcla. La mezcla se puede realizar, por ejemplo, mediante un mezclador

y/o mediante la adición de gas. La mezcla de gas se puede lograr inyectando gas a una velocidad de gas superficial relativamente alta. Para producir una mezcla heterogénea, el gas se agrega preferiblemente con una velocidad de gas superficial superior a 1.5 cm/s o incluso superior a 2.0 cm/s.

5 El producto líquido (lípidos o hidrocarburos) es secretado en la mezcla de fermentación por microorganismos vivos. Los microorganismos no tienen que ser cosechados para obtener los lípidos y los hidrocarburos.

10 Los microorganismos apropiados para la fermentación son conocidos en la técnica. Se pueden usar microorganismos tanto anaerobios como aerobios. El microorganismo puede ser soportado opcionalmente. Actualmente se pueden producir por microorganismos muchos de los posibles hidrocarburos y lípidos, que se han desarrollado específicamente para la producción de biocombustibles. Los grupos más comunes de microorganismos usados son *Saccharomyces cerevisiae* y *E. coli*. Se conocen otros ejemplos de microorganismos apropiados de los documentos WO 2008/113041 (LS9), WO 2012/024186, WO 2007/139924, US7659097B2 y de Kalscheuer R, Stölting T and Steinbüchel A. 2006. Microdiesel: Escherichia coli engineered for fuel production. Microbiology 152: 2529-2536 or in Li Q, Du W and Liu D. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. Applied Microbiology and Biotechnology 80: 749-756 o en Schirmer et al. 2010. Microbial biosynthesis of alkanes. Science 329: 559-562 o en Ladygina et al. 2006. Process Biochemistry 41: 1001-1014. Las bacterias aerobias y anaerobias específicas para la producción de productos orgánicos líquidos (por ejemplo, hidrocarburos o biocombustibles) mencionados en estos documentos se incorporan en la presente memoria como referencia.

20 Los microorganismos se pueden suspender libremente, inmovilizar, formando gránulos, formando flóculos y similares. De esta manera, la concentración celular en el reactor se puede optimizar y se produce menos masa celular excedente. Adicionalmente, se puede mejorar la separación de la masa celular.

La fermentación microbiana se realiza en condiciones aerobias o anaerobias.

25 El sustrato presente en la mezcla de fermentación es en general una materia prima de base biológica, tal como carbohidratos (por ejemplo, azúcares), almidón y celulosa (o hidrolizados de los mismos). Otras materias primas apropiadas se pueden derivar de glicerol, biocombustibles de bajo costo (metanol, etanol y similares), residuos agrícolas/forestales, hidrolizados de residuos agrícolas/forestales y formas gasificadas de los mismos (por ejemplo, gas de síntesis).

Estos sustratos se introducen generalmente en el recipiente de fermentación como una solución acuosa, directamente ya sea en el recipiente o en el flujo de reciclaje, si está presente.

30 La mezcla de fermentación también puede contener otros productos (por ejemplo, oxidados) junto al producto de fermentación líquido, tales como ácidos orgánicos y polímeros de los mismos (por ejemplo, polialcanoatos).

35 El lípido o el hidrocarburo recuperado en el método de la invención puede ser cualquier lípido o hidrocarburo que se pueda producir por fermentación aerobia o anaeróbica usando microorganismos. Por ejemplo, el lípido o el hidrocarburo puede ser un lípido o ácido graso de cadena larga que tiene por ejemplo, al menos ocho átomos de carbono. El lípido o el hidrocarburo es en particular un líquido (por ejemplo, un aceite) en las condiciones de fermentación bajo las cuales se produce. El lípido o el hidrocarburo también se denomina en este documento producto de fermentación líquido o simplemente producto líquido. Este producto formado también puede ser una mezcla de uno o más lípidos y/o uno o más hidrocarburos. Cuando se produce el producto de fermentación líquido, formará una fase de producto líquido en la mezcla de fermentación. La fase del producto líquido puede consistir principalmente en el producto de fermentación líquido (por ejemplo, consiste en al menos 75% en peso, preferiblemente al menos 90% en peso o incluso al menos 95% en peso del producto). Sin embargo, la fase líquida del producto también puede comprender un disolvente orgánico o solución (por ejemplo, para más del 50% en peso), como se explica para la realización de extracción del producto a continuación.

45 La fase del producto de la mezcla de fermentación puede comprender además uno o más disolventes orgánicos, por ejemplo alcanos o alquenos, preferiblemente alcanos o alquenos que tienen desde 10 a 20 átomos de carbono, tales como dodecano, hexadecano o farneseno. La fase del producto también puede comprender una mezcla de múltiples disolventes orgánicos, por ejemplo, combustibles tales como el diésel o el queroseno. La fase del producto de la mezcla de fermentación también puede comprender uno o más hidrocarburos que no se producen en la fermentación, que se pueden disolver en el disolvente orgánico. Se pueden usar disolventes orgánicos para la extracción del producto durante la fermentación. En dicha realización, el producto de fermentación líquido se extrae en el disolvente orgánico, formando así un extracto (por lo general en forma de gotas), que es una solución orgánica que comprende el producto de fermentación líquido y el disolvente orgánico. Tal extracción de producto es bien conocida en la técnica y se puede usar, por ejemplo, para prevenir la inhibición del producto o para enriquecer un disolvente orgánico con un producto de fermentación líquido. La persona experta sabrá cómo llevar a cabo esta técnica de extracción. Ejemplos de productos de fermentación líquidos que se pueden extraer de tal manera son mono y sesquiterpenos.

55 Las gotitas del producto de fermentación líquido que se produce en el procedimiento de la invención pueden tener tamaños variables, que varían desde pequeño (<10 µm), mediano (10-100 µm) o grande (> 100 µm). En caso de

extracción del producto, estos tamaños de gota corresponden al tamaño de gota del extracto (esto es, la solución orgánica que comprende el producto de fermentación líquido y el disolvente orgánico).

5 El lípido o el hidrocarburo está generalmente presente en forma emulsionada, que se puede estabilizar por la presencia de microorganismos y otras partículas y moléculas biológicas. De acuerdo con lo anterior, la fermentación puede comprender una emulsión de hidrocarburo y/o lípido en agua.

La mezcla de fermentación en el recipiente de fermentación se mezcla por lo general, por ejemplo, por agitación y/o por inyección de gas. En caso de que la mezcla de fermentación se sedimenta en el recipiente de fermentación, dicha mezcla, por supuesto, ya no se realizará.

10 En el método de la invención, se puede generar una gran cantidad de gas de fermentación. El gas de fermentación por lo general genera una mezcla y dispersión turbulenta en el recipiente de fermentación y puede proporcionar una función útil por inyección de gas en el recipiente. El gas de fermentación se compone comúnmente de dióxido de carbono principalmente (como el principal componente del gas, por ejemplo, al menos 50% en volumen). Por lo general, el gas de fermentación comprende además vapor de agua. También puede comprender cantidades sustanciales de metano.

15 El gas de fermentación puede, bajo ciertas condiciones, también tener una función útil en la separación del producto de fermentación líquido de la mezcla de fermentación. Sin embargo, una desventaja de usar gas de fermentación para mejorar la separación de la fase acuosa y la fase del producto líquido es que no puede controlarse con precisión. En particular, el tamaño de la burbuja y el caudal de la fermentación no se pueden controlar. Generalmente, el gas de fermentación se disuelve en la mezcla de fermentación y tiene un tamaño de burbuja que es demasiado pequeño para separar eficientemente las dos fases líquidas en la mezcla de fermentación. Por el contrario, la presente invención  
20 proporciona el uso indirecto del gas de fermentación recogiendo primero el gas y luego inyectándolo en las condiciones y velocidad correctas.

25 El producto de fermentación líquido se puede recoger del segundo recipiente mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo por decantación. La capa del producto simplemente se puede extraer o bombear fuera del segundo recipiente. En caso de que el producto se extrajera en un disolvente orgánico en la mezcla de fermentación, el producto de fermentación líquido se recogerá como una solución orgánica.

La invención se ilustra además en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: recuperación de aceite por lotes

30 Primero, se preparó la mezcla de fermentación. Por lote se prepararon 1.6 litros de hexadecano al 10% v/v en dispersión de agua. Todos los componentes se pesaron antes de la adición y se agregaron a un recipiente de 2 L que contenía una turbina Rushton de cuatro palas y dos deflectores. Los componentes se agregaron en el siguiente orden:

1. Agua Milli-Q 1402.67 g
2. Levadura de panadería húmeda 53.33 g
3. Hexadecano 123.68 g

35 La velocidad del agitador se ajustó a  $N = 900$  RPM durante  $t = 180$  minutos para mezclar la biomasa y romper la capa de aceite en pequeñas gotas de aceite. Se adjuntó un criostato para mantener la temperatura constante a  $T = 23$  °C. Se usó un termómetro para medir la temperatura, colocado en el puerto designado de la tapa del fermentador.

En  $t = 180$  minutos, se detuvo el agitador, después de lo cual se retiró la tapa inmediatamente y la dispersión se vertió en las columnas de vidrio.

40 Después de preparar la dispersión, cada columna se llenó con 300 mL de dispersión a través de un embudo. Las columnas de vidrio tenían una placa sinterizada en el fondo (diámetro de burbuja estimado = 2-3 mm), diámetro interno = 37 mm y altura (por encima de la placa sinterizada) = 645 mm. Se usó una columna para un experimento de sedimentación por gravedad (Columna I - sedimentador) y una columna para una separación mejorada del aceite por la fase gaseosa (Columna II - segundo recipiente).

45 La columna II se conectó al controlador de flujo másico 0-10 L de aire/min. El suministro de aire se conectó después de llenar las columnas con una dispersión de 300 mL. La velocidad del gas superficial en la columna fue el intervalo de 0.01-2 cm/s.

50 Los volúmenes de la capa de crema y la capa de aceite transparente se midieron a tiempo sin cortar el suministro de aire. La retención de gas en la columna se midió al final de cada experimento midiendo la diferencia en volumen de la capa de crema y aceite con y sin suministro de gas. Los volúmenes medidos en el tiempo se corrigieron para esta retención de gas.

Las figuras 1 y 2 muestran el desarrollo de crema y aceite a tiempo en ambas columnas (izquierda: columna I, separación por sedimentación por gravedad; derecha: columna II, separación mejorada por fase gaseosa). Claramente, la fase

gaseosa permite recuperar directamente la mayor parte del aceite como una capa de aceite separada (línea azul en los gráficos), en contraste con la separación por gravedad, que produce gotas de aceite estabilizadas en una capa de crema (línea roja en los gráficos). Sorprendentemente, no hubo formación de crema en la columna II.

#### Ejemplo 2: recuperación continua de aceite

5 La disposición continua consistió en una columna de burbujas de 8 L de 10 cm de diámetro para la preparación de la mezcla de fermentación, un embudo cónico de 0.5 L como sedimentador para obtener una mezcla con fracción de aceite concentrada (crema), una columna de burbujas de 0.5 L (tal como columna II en el ejemplo anterior - segundo recipiente) para separación de aceite y un recipiente para recuperación de aceite. Todos los flujos entre los recipientes se controlaron usando bombas Masterflex, excepto el desbordamiento de la columna de burbujas de 8L al embudo cónico.

10 Una representación esquemática de la configuración se muestra en la figura 3.

La fase de inicio consistió en preparar una mezcla de fermentación de composición similar a la anterior con 700 mL de hexadecano en la columna de burbujas de 8 L (recipiente de fermentación) inyectando aire comprimido a una velocidad de gas superficial de 3 cm/s durante 6 horas. Posteriormente, se llenó el embudo cónico (sedimentador), y después de 5 minutos de sedimentación, la columna de burbujas de 0.5 L (segundo recipiente) se llenó en 1 hora y se activó el flujo de reciclado. Se inyectó aire en la columna de burbujas de 0.5 L con una velocidad de gas superficial en el intervalo de 0.01-2 cm/s. Después de aproximadamente 2 horas, ya se recuperó algo de aceite transparente en el recipiente para la recuperación del aceite y se inició el modo de operación continua activando la entrada de aceite fresco.

15

Se alimentaron 300 mL de aceite nuevo al sistema en aproximadamente 6 horas, mientras que se recuperaron 285 mL de aceite transparente en el recipiente para la recuperación de aceite, dando como resultado un rendimiento de recuperación de aceite del 95% en volumen bajo operación continua.

20

#### Ejemplo 3: Efecto de la velocidad del gas superficial en la recuperación de aceite por lotes

Primero, la mezcla de fermentación se preparó según el ejemplo 1. Después de preparar la dispersión, cinco columnas de vidrio con las mismas dimensiones que en el ejemplo 1 se llenaron con 300 mL de dispersión cada una. Las cinco columnas se operaron con diferente velocidad de gas superficial (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 cm/s) durante 2 horas. La figura 4 muestra la recuperación de aceite en la capa de aceite continua a lo largo del tiempo para las cuatro columnas diferentes.

25 Después de las dos horas de separación, se determinó la distribución del aceite sobre las diferentes fases en las columnas, como se muestra en la figura 5. Esto muestra que al aumentar la velocidad del gas superficial se produce una disminución en la cantidad de crema, que inicialmente están presentes las gotas de aceite en la dispersión. Solo se formó una capa continua de aceite en las columnas con una velocidad de gas superficial de 0.1 y 0.2 cm/s. A 0.5 y 1.0 cm/s, el aceite se recupera como una capa de crema gruesa, que es una capa de gotas de aceite con un tamaño del orden de milímetros que no forman una capa de aceite continua.

30

#### Ejemplo 4: efecto de la disrupción celular en la recuperación de aceite por lotes

Se prepararon dos dispersiones según el procedimiento del ejemplo 1, con la diferencia de que en una dispersión la suspensión celular acuosa se trató con un dispositivo de disrupción celular de alta presión (Constant Cell Disruption Systems, Low March, Daventry, Northants) antes de preparar la dispersión (1 pase a 2.7 kbar). La figura 6 muestra las células de levadura antes del tratamiento, ya que se usan en la preparación de la dispersión estándar. La figura 7 muestra la suspensión de restos celulares que se formó por el tratamiento. Con estos restos celulares, se siguió la misma preparación de dispersión. La dispersión preparada se transfirió a columnas de vidrio similares a las del ejemplo 1 y el procedimiento de separación se llevó a cabo durante 2 horas a una velocidad de gas superficial de 0.1 cm/s. En estas condiciones, no se pudo recuperar aceite continuo como se muestra en la figura 8. Se puede concluir que la presencia de restos celulares tiene un efecto negativo en la separación de la fase del producto de la fase acuosa y, en particular, la formación de la capa del producto.

35

40

**REIVINDICACIONES**

1. Método de recuperación de un lípido o hidrocarburo a partir de una mezcla de fermentación, que comprende las etapas de:
- 5 - proporcionar una mezcla de fermentación en la que el lípido o hidrocarburo se produce por fermentación microbiana en un recipiente de fermentación o en un primer compartimento de un reactor de fermentación, en el que el lípido o el hidrocarburo es secretado en la mezcla de fermentación por microorganismos vivos, y cuya mezcla comprende una fase acuosa y una fase de producto líquido, en la que la fase de producto líquido comprende el lípido o el hidrocarburo; y
- alimentar al menos parte de la fase acuosa y parte de la fase del producto líquido a un segundo recipiente o a un segundo compartimento del reactor de fermentación, formando así una segunda mezcla; y
- 10 - promover la separación de fases de la fase acuosa y del producto inyectando un gas en la segunda mezcla, separando así la fase del producto de la fase acuosa; y
- recoger la fase del producto que comprende el lípido o el hidrocarburo.
2. Método según la reivindicación 1, en el que se promueve la separación de fases controlando la velocidad del gas superficial del gas, en el que el gas tiene una velocidad del gas superficial en el recipiente en el intervalo de 0.01-2 cm/s, preferiblemente 0.05-1.5 cm/s, más preferiblemente en el intervalo de 0.1-1 cm/s.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que al menos parte de la mezcla de fermentación o segunda mezcla se somete a una etapa de sedimentación antes de inyectar el gas.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la separación de fases se promueve por flotación de gas inducida.
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el gas se alimenta activamente al segundo recipiente o segundo compartimento del reactor de fermentación, en el que el gas es aire o un gas no oxidante seleccionado del grupo que consiste en CO<sub>2</sub>, gas inerte y gas de fermentación.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que además del lípido o hidrocarburo, también se produce un gas de fermentación por fermentación microbiana, que se separa del gas de fermentación de la mezcla de fermentación y posteriormente se inyecta en la segunda mezcla en la etapa de promover la separación por fases.
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el gas se distribuye a través de un inyector y/o placa sinterizada para obtener el tamaño de burbuja y/o caudal deseados.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el recipiente de fermentación y el segundo recipiente son compartimentos separados en un reactor de fermentación, y en el que el reactor de fermentación es un reactor de levantamiento de gas, cuyo reactor tiene una recirculación interna o una recirculación externa.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la materia sólida que termina en el segundo recipiente se recicla al recipiente de fermentación.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la segunda mezcla comprende menos del 5% en peso de restos celulares, más preferiblemente menos del 1% en peso, incluso más preferiblemente menos del 0.1% en peso, en base al peso total de la segunda mezcla.
- 35 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se introduce gas en el recipiente de fermentación, en el que el gas tiene una velocidad del gas superficial superior a 1.5 cm/s, preferiblemente superior a 2 cm/s.
- 40 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la promoción de la separación de fases da como resultado una capa del producto que tiene una fracción en volumen de lípidos e hidrocarburos que se encuentra entre 0.9 y 1.0.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el recipiente de fermentación comprende una salida de gas para que las burbujas de gas salgan del recipiente de fermentación, de modo que las burbujas de gas introducidas o formadas en la mezcla de fermentación no entren directamente en el segundo recipiente.
- 45 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fase del producto líquido comprende además un disolvente orgánico, en el que el producto de fermentación líquido se extrae después de la producción por los microorganismos.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el reactor de fermentación es un reactor por inyección de gas que tiene una recirculación interna o externa.

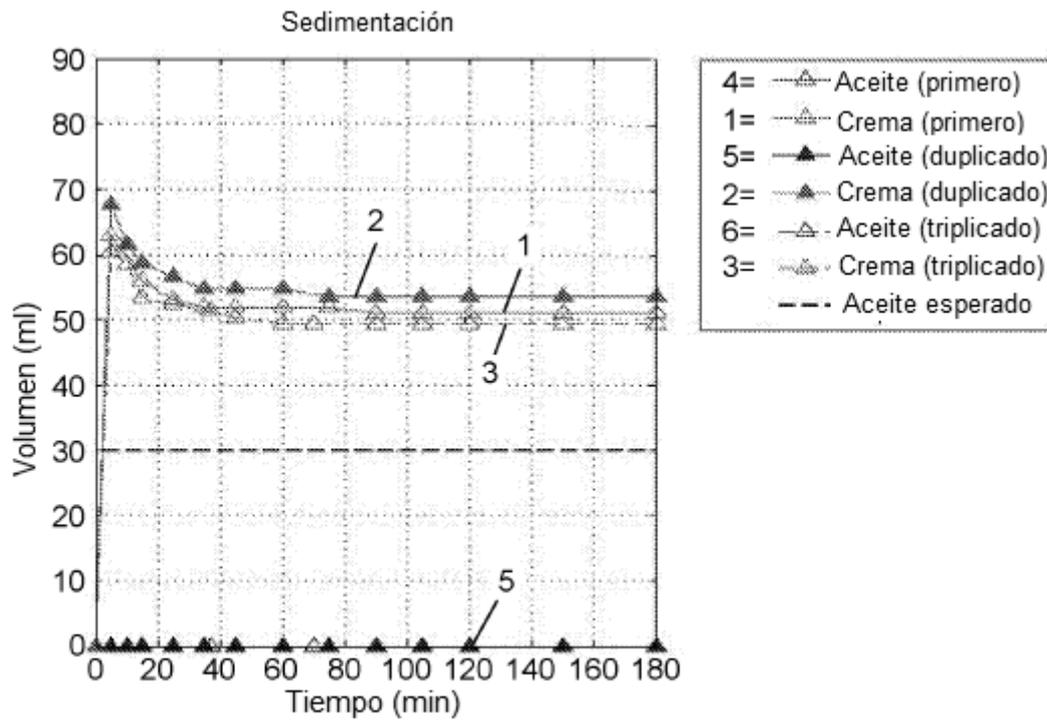


FIG. 1

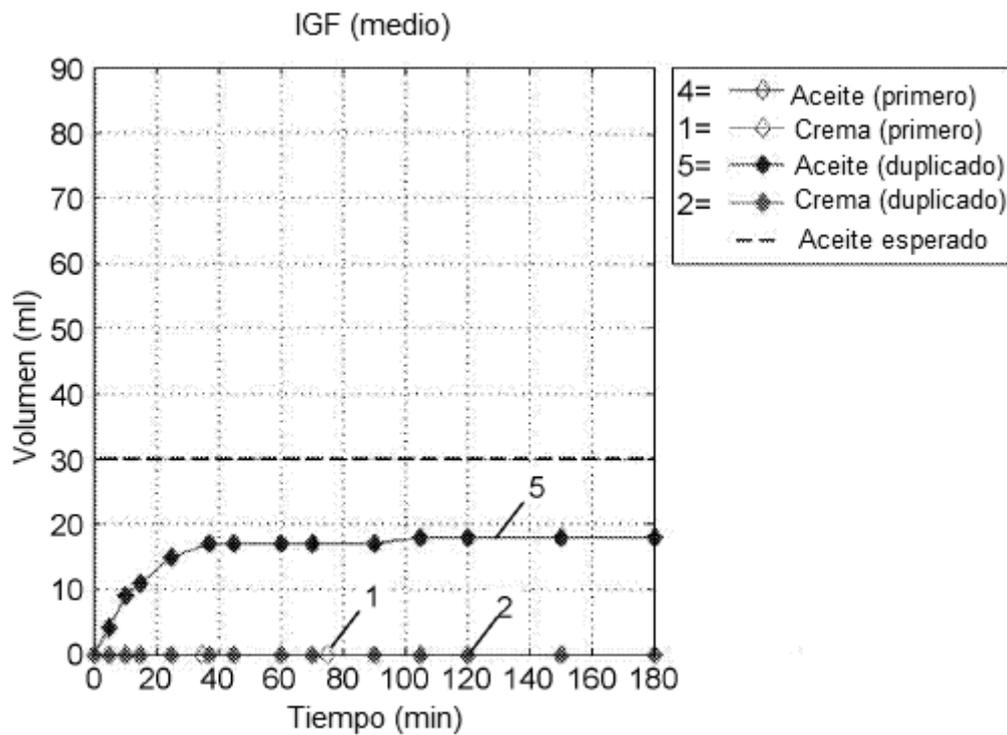


FIG. 2

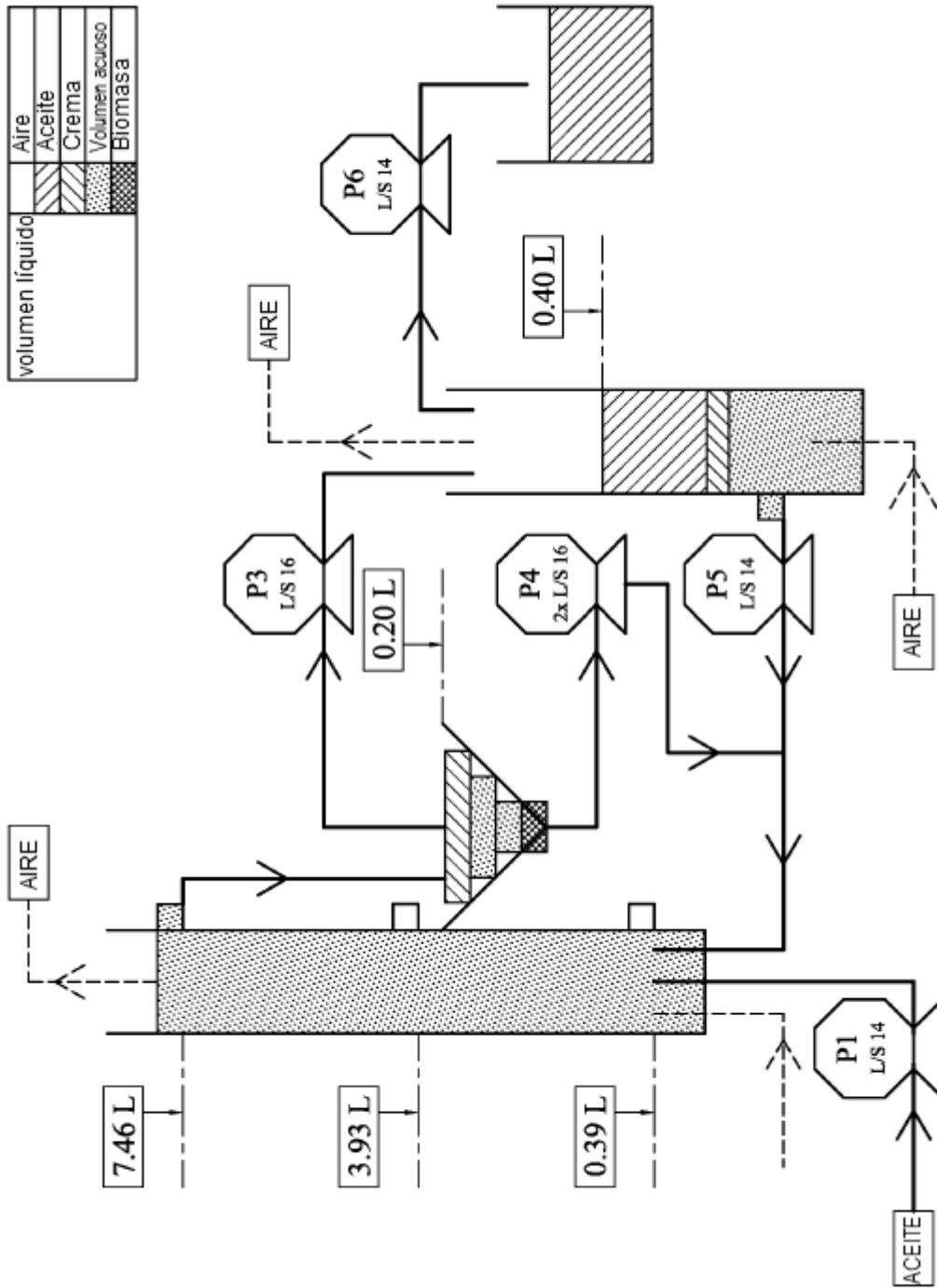


FIG. 3

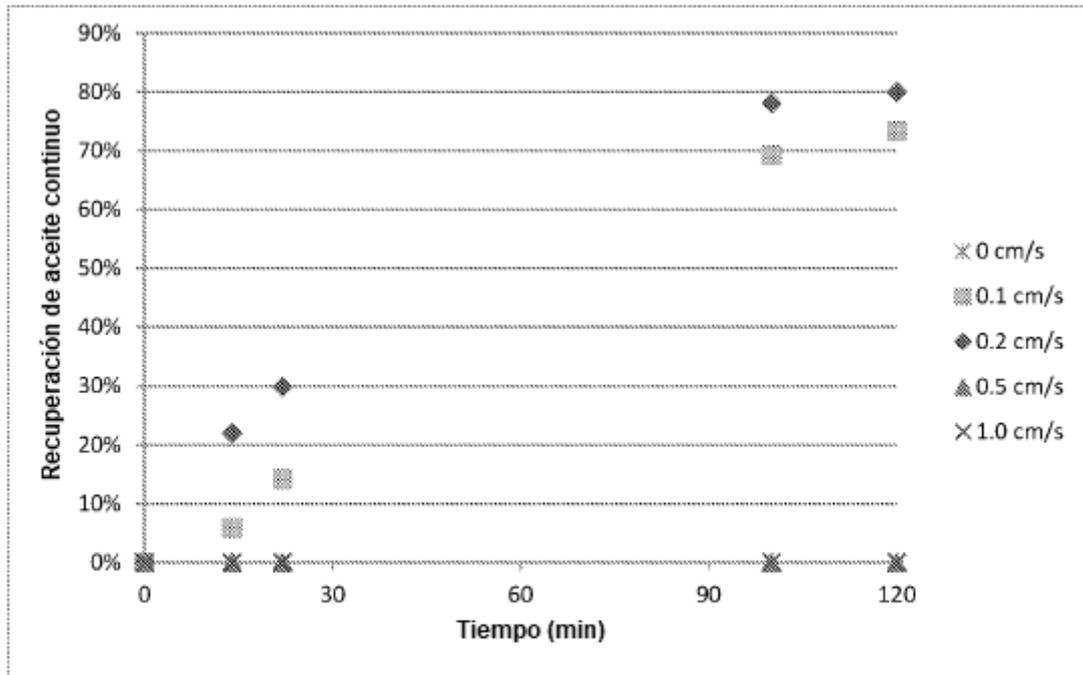


FIG. 4

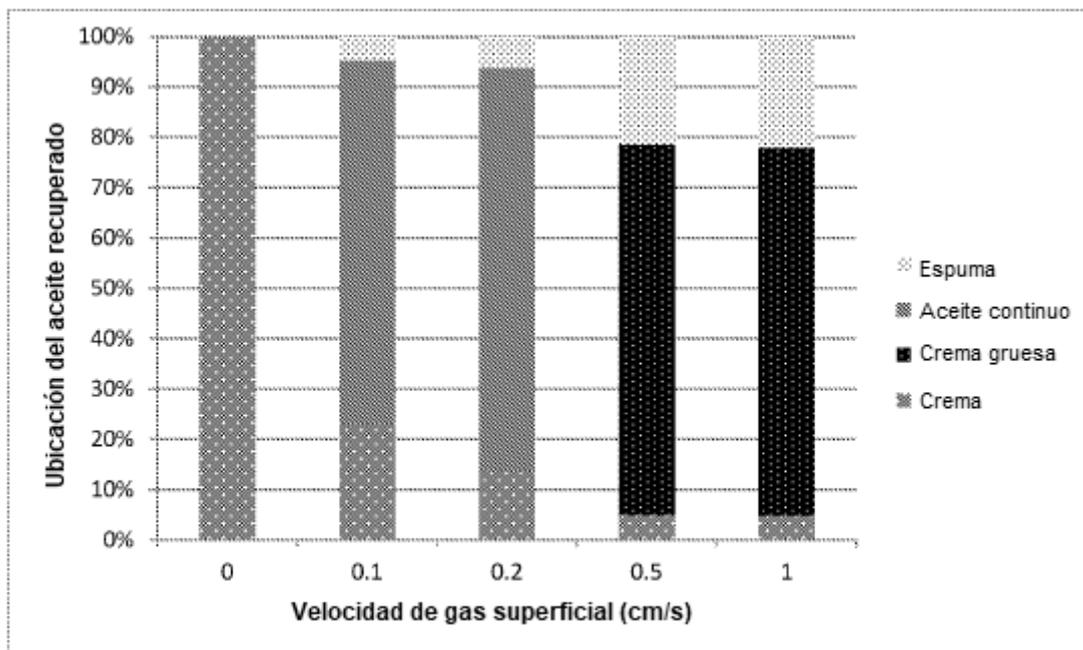


FIG. 5

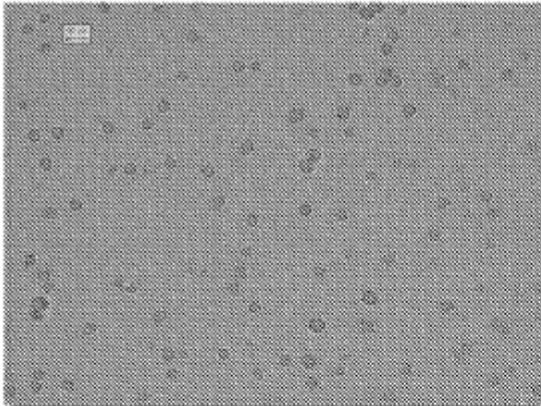


FIG. 6

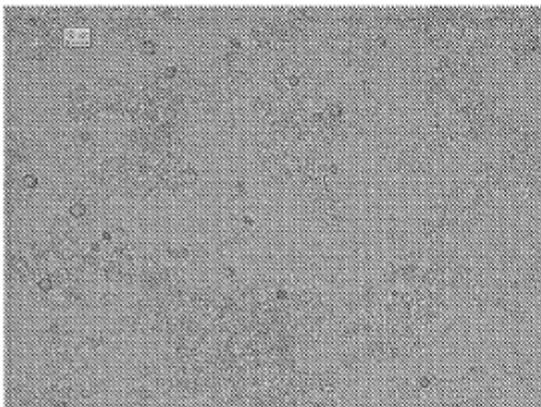


FIG. 7

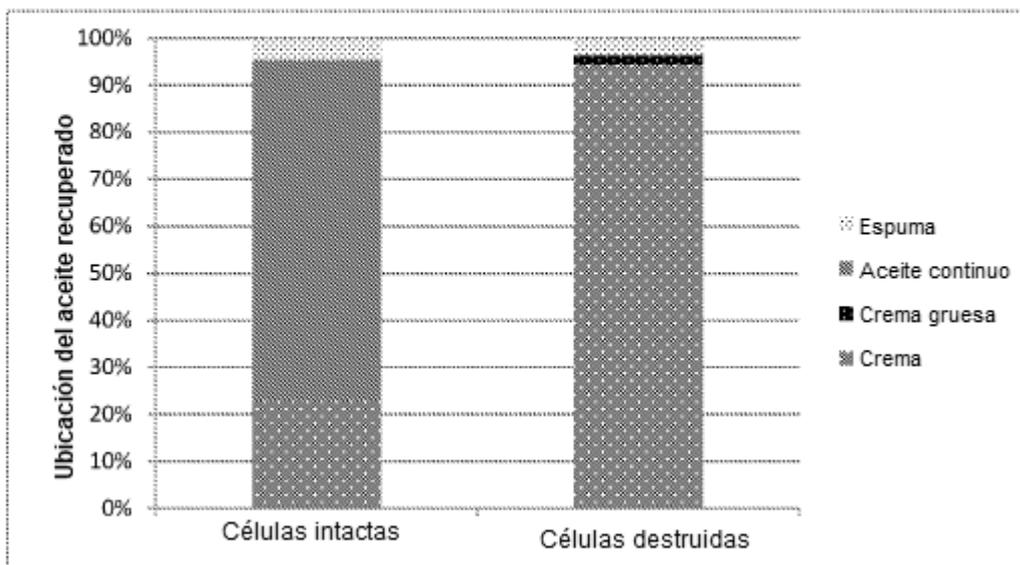


FIG. 8