

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 334**

51 Int. Cl.:

C12P 5/02 (2006.01)

C12P 7/64 (2012.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2008** **E 08171701 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.02.2022** **EP 2196539**

54 Título: **Procedimiento para la producción biológica continua de lípidos, hidrocarburos o mezclas de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.04.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

VAN DER WIELEN, LUCAS ANTONIUS MARIA y
HEIJNEN, JOHANNES JOSEPH

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 908 334 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 producción biológica continua de lípidos, hidrocarburos o mezclas de los mismos

La invención se refiere a un procedimiento para la producción biológica continua de un producto seleccionado del grupo de lípidos, hidrocarburos, ácidos orgánicos, polialcanoatos y mezclas de los mismos por medio de la conversión de un sustrato adecuado utilizando microorganismos; en tal procedimiento dicho sustrato es fermentado anaeróbicamente de manera continua para producir el producto y el gas de fermentación en presencia de microorganismos, opcionalmente soportados.

La producción fermentativa directa de lípidos, biocombustibles de hidrocarburos (en lo sucesivo también denominados BHC) en lugar de alcoholes como el etanol y el butanol, tiene un tremendo beneficio potencial en términos de costes de purificación de combustible (tanto de capital como de energía), así como propiedades del combustible (mezcla, corrosión, higroscopia, etc.). Ambos se basan en las características de baja miscibilidad con agua de los lípidos o moléculas de hidrocarburos o similares. La producción de lípidos y ácidos grasos de cadena larga es bien conocida en los organismos vivos como un mecanismo común de almacenamiento de energía y varias industrias nuevas reivindican un rápido progreso en el desarrollo comercial de "productos similares a los combustibles refinados convencionales" (Amyris) o "productos similares al petróleo crudo" (LS9). Aunque se publican pocos detalles, la excreción directa de estos productos parece ser clave en su desarrollo. Estos desarrollos todavía están dirigidos a los principios de la producción de BHC a escala de laboratorio y la selección o generación de los microorganismos que pueden usarse en la misma. En general, la fermentación se realiza en fermentadores agitados y el producto se separa de las células microbianas o del caldo mediante centrifugas de separación sólido-líquido convencionales.

En la publicación WO2007/139924, Amyris describe además un sistema de producción para hacer compuestos bioorgánicos, por ejemplo, para un biocombustible. El sistema puede incluir un recipiente, una primera fase que comprende un medio acuoso que incluye células huésped capaces de producir un compuesto bioorgánico, donde el compuesto bioorgánico comprende una segunda fase en contacto con el medio acuoso.

La publicación US 4,127,447 se refiere a un procedimiento para llevar a cabo una reacción catalizada biológicamente que comprende las etapas de: introducir una solución afluente que contiene reactivos en una columna de lecho empacado de flujo ascendente empacada con un soporte que tiene adheridos al mismo microorganismos anaerobios para catalizar la reacción de dichos reactivos; introducir con dicho afluente un detergente disruptivo de membranas para lisar los microorganismos muertos de dicho soporte y poner a disposición del resto de microorganismos vivos el nutriente esencial de dichos microorganismos muertos. El procedimiento es en particular para su uso en el tratamiento de desechos orgánicos industriales y aguas residuales domésticas. La publicación WO2003/050274 se refiere a un procedimiento para producir una suspensión de metabolitos cristalinos y/o amorfos a partir de un caldo de fermentación que comprende tratar el caldo de fermentación con uno o más coagulantes y/o uno o más floculantes; y separar la biomasa del caldo de fermentación del caldo de fermentación coagulado y/o floculado mediante el uso de un equipo de separación por lo cual se obtiene una suspensión de metabolitos cristalinos y/o amorfos.

La publicación WO2007/104551 se refiere a un procedimiento para la depuración de aguas residuales, en particular para la depuración continua de aguas residuales en la fabricación de papel, en donde las aguas residuales a depurar se tratan con microorganismos anaerobios para degradar los contaminantes presentes en las aguas residuales. El procedimiento comprende además someter el agua residual a una etapa de flotación con liberación de presión antes de ser suministrada al reactor anaeróbico o después de ser descargada del reactor anaeróbico, para eliminar calcificaciones del agua al menos en cierta medida.

Por razones de rendimiento y costes, se desea un procedimiento biológico sin aceptor de electrones externos (como el oxígeno). La fermentación anaeróbica también conduce (estequiométricamente) a tasas de producción de dióxido de carbono (u otros gases de fermentación como metano e hidrógeno) sustanciales, suficientes para la mezcla turbulenta y la dispersión en el reactor sin requerir un dispositivo de mezcla separado.

Esto da como resultado una mezcla de cuatro fases (S-G-L-L): células microbianas, gas de fermentación, medio acuoso y BHC (líquido). El BHC puede estar presente como gotas pequeñas (<10 µm), medianas (10-100 µm), grandes (>100 µm) o una combinación de las mismas.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento comercial y técnicamente factible a una escala que pueda competir con la recuperación de petróleo crudo, utilizando fuentes renovables, en general materias primas de base biológica como azúcares, o en términos más generales, carbohidratos, almidón, hidrolizados de celulosa y similares. Otras materias primas adecuadas pueden derivarse de glicerol, biocombustibles de bajo coste (metanol, etanol y similares), residuos agroforestales, hidrolizados de residuos agroforestales y formas gasificadas de los mismos (por ejemplo, gas de síntesis).

El gas de fermentación suele estar compuesto principalmente de dióxido de carbono y algo de vapor de agua, pero puede contener cantidades sustanciales de metano. El medio de fermentación también puede contener otros productos oxidados junto al BHC, como ácidos orgánicos y polímeros de los mismos (por ejemplo, polialcanoatos). Tal presencia no limita la invención.

También es un objeto de la invención proporcionar un bioprocedimiento integrado para biocombustibles avanzados. La presente invención tiene como objetivo proporcionar un biorreactor integrado de bajo coste con varias opciones tecnológicas para la producción directa de una corriente de BHC a partir de fuentes renovables.

Estos y otros objetos se obtienen mediante el procedimiento para la producción biológica continua de un producto seleccionado del grupo de lípidos, hidrocarburos, ácidos orgánicos, polialcanoatos y mezclas de los mismos por conversión de un sustrato adecuado usando microorganismos; en tal procedimiento dicho sustrato se fermenta anaeróbicamente de forma continua para producir el producto y el gas de fermentación, en presencia de microorganismos opcionalmente soportados, en un medio acuoso, en un reactor de tipo columna; en tal reactor al menos parte del medio acuoso fluye hacia arriba, y el producto se recupera separando uno de otro el gas de fermentación, los microorganismos en el medio acuoso y el producto en condiciones que fomenten la coalescencia del producto,

en donde el gas de fermentación se separa al menos parcialmente del medio acuoso antes de separar el producto de la fase acuosa en donde se utilizan técnicas de separación SLL (es decir, sólido-líquido-líquido) para promover la coalescencia de las gotas de producto con el fin de mejorar la separación; dichas técnicas de separación SLL incluyen sedimentación por gravedad, flotación o una combinación de las mismas, en donde la separación del producto se realiza usando un separador de placa inclinada o en donde el producto se separa del medio acuoso por flotación usando gas de fermentación disuelto en el medio acuoso, en donde el dióxido de gas de la fermentación se genera para la flotación por una disminución de la presión del medio acuoso.

La presente invención se basa en el uso combinado e integrado de un reactor, las propiedades específicas de los productos principales (gas de fermentación y BHC) y diversas operaciones de unidades de procesamiento posteriores de una manera inventiva, para una configuración de procedimiento específica.

Un aspecto importante del procedimiento es la fermentación anaerobia del sustrato, utilizando el microorganismo adecuado que opcionalmente puede ser soportado. Los microorganismos adecuados son conocidos en la técnica, por ejemplo, por la publicación WO 2008/113041 (LS9), Kalscheuer R, Stölting T y Steinbüchel A. 2006. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production (Microdiesel: *Escherichia coli* diseñada para la producción de combustible). Microbiology 152: 2529-2536 o en la publicación de Li Q, Du W y Liu D. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production (Perspectivas de los aceites microbianos para la producción de biodiesel). Applied Microbiology and Biotechnology 80: 749-756.

Los microorganismos pueden suspenderse libremente, inmovilizarse, formar gránulos, formar flóculos y similares. De esta forma se puede optimizar la concentración de células en el reactor y se produce menos masa celular sobrante. Además, se puede mejorar la separación de la masa celular. El procedimiento es básicamente de flujo ascendente con recirculación sobre el reactor de columna. Esto puede ser una recirculación interna, por ejemplo, utilizando un tubo de aspiración, o una recirculación externa.

En el procedimiento se genera una gran cantidad de gas de fermentación, lo que genera una mezcla turbulenta y dispersión en el reactor y proporciona una útil función de elevación a gas en el reactor. En formas de realización específicas, el gas de fermentación también tiene una función útil en la separación del BHC del caldo de reacción.

La extracción de líquido se puede realizar desde la parte superior o desde la parte inferior del reactor. En formas de realización específicas de la invención se prefiere la extracción de líquido desde el fondo del reactor, ya que mejora las etapas de separación posteriores haciendo uso del cabezal de presión del reactor. La presión del reactor se puede controlar aún más regulando el flujo de gas de fermentación que sale del reactor.

En combinación con el aspecto anterior de la generación y el uso de dióxido de carbono, existe el aspecto de la separación de las diversas fases en la mezcla o caldo de reacción, a saber, gas (gas de fermentación), dos fases líquidas (medio acuoso y los lípidos apolares, hidrocarburo, ácido orgánico o polialcanoato) y una fase sólida opcional (microorganismos soportados opcionalmente). Para recuperar el producto del procedimiento de la invención, es importante que las etapas de separación incluyan una en la que las condiciones sean tales que se promueva o estimule la coalescencia del BHC.

Las gotas del producto que se produce en el procedimiento de la invención pueden tener tamaños variables, que van desde pequeñas (<10 µm), medianas (10-100 µm) o grandes (>100 µm).

El BHC generalmente está presente en forma emulsionada que puede estabilizarse por la presencia de microorganismos y otras moléculas y partículas biológicas. Esto requiere medidas adicionales para garantizar que el BHC se una y pueda recuperarse como una fase líquida separada. En algunos casos, una parte (generalmente pequeña) del producto puede ser gaseosa, lo que requeriría una etapa separada para recuperarlos de la fase gaseosa basada en dióxido de carbono.

Las técnicas de separación para separar el aceite del agua son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la publicación de Veenstra et al., Refinery wastewater management using multiple angle oil water separators (Gestión de aguas residuales de refinería utilizando separadores de agua y aceite de múltiples ángulos) (1998), p1-22, Mohr Separations

Research) está dirigido al campo de la gestión de aguas residuales de la producción de petróleo fósil y la refinería de petróleo fósil.

La separación de SSL incluye el uso de una técnica de separación de SSL seleccionada entre decantación por gravedad, flotación, combinaciones de las mismas, donde la separación del producto se realiza mediante un separador de placa inclinada o donde el producto se separa del medio acuoso mediante flotación utilizando gas de fermentación disuelto en el medio acuoso.

Pueden utilizarse varias técnicas de separación para separar el producto y/o promover la coalescencia del producto (separación sólido-líquido-líquido, abreviado separación SLL). La selección de la técnica de separación depende de las propiedades de la mezcla y de las propiedades de coalescencia de las gotas del producto. Dichas técnicas de separación SLL se usan para separar el BHC y/o para promover la coalescencia de las gotas de BHC para mejorar la separación. Otros ejemplos de técnicas de separación SLL adecuadas que pueden usarse adicionalmente incluyen centrifugación, uso de hidrociclones, filtración, filtración por membrana o una combinación de las mismas.

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 tipo venturi (u otros dispositivos de reducción de presión) o el uso de hidrociclones. Estas técnicas se pueden utilizar cuando hay pequeñas gotas del producto en la mezcla. En formas de realización específicas, estas etapas también pueden combinarse entre sí, o pueden combinarse con otros sistemas de separación, como un separador de placa inclinada. Se puede usar un separador de placa inclinada cuando hay gotas grandes del producto en la mezcla. Es posible, por ejemplo, separar al menos una parte del gas de fermentación, los sólidos y el producto de la fase acuosa en un separador de este tipo.

Como se ha indicado, el procedimiento requiere una recirculación sobre el reactor. Esto puede hacerse mediante una recirculación interna de parte del caldo de reacción, utilizando un tubo de aspiración interno, posiblemente después de separar el dióxido de carbono y parte del BHC producido. También es posible recircular los sólidos con parte del medio acuoso, pero con cantidades relativamente bajas de BHC y dióxido de carbono, a través de una recirculación externa, después de la separación de la mayor parte del dióxido de carbono y BHC del mismo.

Aunque la fermentación generalmente tiene una tasa de producción volumétrica relativamente baja, el procedimiento de la presente invención supera esta desventaja mediante la posibilidad de usar grandes cantidades de masa celular y la separación directa del producto del caldo de reacción. Además, el procedimiento de la invención tiene la ventaja de un número limitado de operaciones unitarias y solo aquellas que no tienen partes móviles, en lugar de centrifugas. Además, la naturaleza de los materiales implicados permite el uso de materiales de construcción relativamente baratos, en comparación con los fermentadores convencionales; es decir, no es necesario utilizar fermentadores de acero, sino que basta con hormigón o plástico. También hay poca posibilidad de erosión, lo que también hace posible el uso de materiales de menor coste. Estas ventajas dan como resultado reducciones considerables en los costes de inversión y de operación en comparación con las tecnologías convencionales.

El procedimiento se basa en la bioconversión de sustratos renovables, principalmente carbohidratos, pero también otros materiales, tal como se han definido anteriormente. Estos sustratos generalmente se introducen en el reactor como solución acuosa, ya sea directamente en el reactor o en el flujo de reciclado, si está presente.

El reactor se puede operar a presión ambiental, pero en caso de que se utilice el procedimiento de flotación de gas de fermentación, discutido anteriormente, se prefiere que el reactor se opere a una presión ligeramente más alta, como entre 0.11 MPa y 2.0 MPa (abs) (1.1 y 20 bar (abs)), lo que permite la flotación mediante una simple reducción de presión después del reactor. También es posible hacer funcionar el reactor a presión ambiente y extraer el líquido del fondo. Debido al cabezal de presión del contenido del reactor, hasta 10 metros de columna de agua o más, hay suficiente dióxido de carbono disuelto en el líquido para la flotación requerida por medio de dióxido de carbono. Como alternativa, también es posible utilizar esta presión para accionar los hidrociclones. La presión del reactor se puede controlar aún más regulando el flujo de dióxido de carbono que sale del reactor.

En las figuras se proporcionan tres diagramas de flujo diferentes de formas de realización de la invención. En la Figura 1 se da un esquema de flujo general basado en flotación, en la Figura 2 se da un esquema de flujo usando hidrociclones y en la Figura 3 se da un esquema de flujo que combina hidrociclones y flotación.

En la Figura 1, el puerto de efluentes líquidos se coloca en la parte inferior del reactor. Debido a la presión estática en el fondo del reactor, el caldo absorbe una cantidad sustancial de gas de fermentación. Eventualmente, la cantidad de gas de fermentación absorbida en el caldo puede incrementarse aumentando la presión en el reactor, por ejemplo, controlando el flujo de gas de fermentación que sale del reactor. La suspensión de caldo de BHC sale del reactor con una alta presión de gas de fermentación. Liberar la presión en el tanque de flotación da como resultado pequeñas burbujas que acumulan selectivamente pequeñas gotas de BHC. Luego, el BHC se recupera de las burbujas en un decantador, mientras que el caldo (y eventualmente el BHC restante) puede reciclarse (parcialmente) hacia el reactor.

En la Figura 2, el efluente líquido se coloca en el fondo del reactor. La presión hidrostática del reactor puede ser suficiente para impulsar los hidrociclones sin costes operativos adicionales (energía). Eventualmente, la presión en el reactor se puede aumentar, por ejemplo, controlando el flujo de gas de fermentación que sale del reactor. El campo

centrífugo en los hidrociclones puede ser suficiente para asegurar la separación del BHC con el desbordamiento, mientras que el caldo (y eventualmente el BHC restante) puede reciclarse (parcialmente) hacia el reactor.

El campo centrífugo en los hidrociclones puede concentrar pequeñas gotas de BHC hacia el centro del hidrociclón y promover la coalescencia. Por lo tanto, se puede lograr una mejor recuperación de BHC combinando el uso de hidrociclones y flotación, como se muestra en la Figura 3.

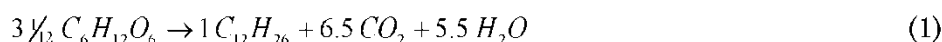
La invención se esclarece ahora sobre la base de ejemplos.

Ejemplos

1. Producción anaeróbica de hidrocarburo a partir de glucosa.

Este ejemplo ilustra flujos típicos sobre el reactor y su impacto en el tamaño del reactor.

- 10 Para dodecano ($C_{12}H_{26}$) como producto de ejemplo y glucosa ($C_6H_{12}O_6$) como sustrato de ejemplo, la reacción catabólica para la formación del producto es:



Esto da como resultado un rendimiento máximo de glucosa de

$$Y_{ps} = \frac{3 \frac{1}{2} \text{ moles de glucosa}}{\text{mol de producto}} = 3.26 \text{ kg de glucosa / kg de producto} \quad (2)$$

- 15 En este ejemplo, una planta que produce 30 millones de galones de hidrocarburo por año (120 000 m³/año o 85 ktoneladas/año). Suponiendo una operación anual de 8000 horas, esto da como resultado una tasa de producción de 11 toneladas/hora (59 kmoles de producto por hora).

De la ecuación (1) se puede ver que esto conduce a una cantidad sustancial de dióxido de carbono (CO₂), tasa de producción (388 284 moles CO₂/hora) que es más que suficiente para la mezcla turbulenta y la dispersión en el reactor y, por lo tanto, no se requiere un dispositivo de mezcla separado.

- 20 A efectos de dimensionamiento del reactor, se considera un microorganismo que crece a una velocidad $\mu = 0.06$ 1/hora. Las tasas típicas de consumo de sustrato y producción de masa celular son $R_s = 198$ kmoles/hora y $R_x = 87$ kmoles/hora respectivamente. Con estos valores se puede calcular la alimentación de sustrato necesaria. Para una concentración de alimentación de glucosa de 180 g/kg, esto da como resultado un flujo de alimentación $F^n = 198$ toneladas/hora. La salida de agua es la suma de la entrada de agua con la alimentación y el agua de reacción estequiométrica, lo que da como resultado una salida $F_w^{fuera} = 168.2$ toneladas/hora. Además, la concentración de masa celular se puede calcular a partir de

$$C_x = \frac{R_x}{F_w^{fuera}} = 516 \text{ moles de C células / m}^3 \quad (3)$$

- 30 En este ejemplo, se supone que la tasa de producción específica del microorganismo es $q_p = 0.041$ moles de producto/mol de células/hora. Para producir 59 kmoles de producto/hora se requieren 1.45×10^6 moles de C células. En base a una composición de peso molecular celular promedio de 24.6 g/mol de C, esto da como resultado una masa celular de aproximadamente 36 toneladas en el reactor. Suponiendo un reactor bien mezclado y a partir del resultado de la Ecuación (3), 2 810 m³ agua están presentes en el reactor. El volumen de producto en el reactor es de 252 m³. Suponiendo una retención de gas CO₂ del 10% de la suspensión líquida, el resultado es un volumen mínimo total del reactor de 3 343 m³. Para asegurar una buena mezcla, el reactor está diseñado para una velocidad superficial del gas de 70 m/hora, lo que da como resultado un área transversal de 143 m² (o un diámetro de 6.7 m) y una altura de 23 m. Claramente, estos valores dependen en gran medida del tipo de producto, la tasa de producción requerida, el microorganismo utilizado y la tasa de crecimiento del microorganismo, entre otros.

2. Separación de productos mediante decantador de placa inclinada

- 40 Este ejemplo ilustra el efecto del tamaño de las gotas de producto en la selección de la técnica de separación.

Considerando el reactor del Ejemplo 1, el reactor se hace funcionar en condiciones atmosféricas. CO₂ se separa primero, después de lo cual la mezcla de producto y caldo ingresa a un decantador de placa inclinada. El sedimentador se puede montar encima del reactor o en el exterior. La velocidad de ascenso de la gota de producto es una función fuerte del diámetro de la gota y se puede calcular con la ecuación de Stokes:

$$u = \frac{1}{18} \cdot \frac{g \cdot \Delta\rho \cdot d^2}{\eta} \quad (4)$$

Para el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, la diferencia de densidad $\Delta\rho$ es de 300 kg/m³ y viscosidad $\eta = 10$ mPa·s. Para comparar diferentes técnicas de separación, se suele utilizar el factor sigma Σ , que corresponde al área de superficie equivalente de un tanque decantador con el mismo rendimiento teórico. La Tabla 1 muestra la velocidad de ascenso de las gotas u y el factor sigma requerido para diferentes tamaños de gotas.

Tabla 1. Factor sigma como una función del tamaño de gota.

d (µm)	u (m/h)	Σ / m ²
0,1	0,0000006	280 833 333
1	0,00006	2 808 333
10	0,006	28 083
100	0,6	281
1000	60	3

A modo de comparación, el valor sigma de las centrifugas de pila de discos se limita aproximadamente a 100 000 m² y para decantadores de placa inclinada hasta 1 000 m². Está claro que este procedimiento de separación solo se puede usar cuando hay gotas de producto suficientemente grandes en la mezcla.

3. Efecto de un microorganismo sobre el tamaño de las gotas y la estabilidad de la mezcla

Este ejemplo ilustra el rango de tamaños de gotas que se pueden obtener y el comportamiento de coalescencia de la mezcla.

Fueron preparadas mezclas de agua, levadura seca de panadería y decano (C₁₀H₂₂) a temperatura ambiente en un recipiente de 2L equipado con una turbina Rushton de cuatro álabes operando a 900 rpm. Después de 3.5 horas, la mezcla se colocó en un cilindro graduado de 1 litro para observar el comportamiento de separación. La Tabla 3 recopila las mezclas evaluadas.

Tabla 3. Composición de la mezcla.

Mezcla	Agua (ml)	Levadura seca (g)	Decano (mL)
A	900	10	93
B	990	10	-
C	910	-	90
D	900	10	90

Mezcla A. Después de 12 minutos de sedimentación, se habían formado dos fases: una capa superior con gotas grandes y unidas de decano y células de levadura y una capa (alrededor de 800 ml) que contenía principalmente células de levadura y gotas de decano de diversos tamaños.

Mezcla B. En esta mezcla no se añadió decano para evaluar el comportamiento de sedimentación de las células en agua sin influencia del producto. Después de 20 horas no había una capa de agua clara, pero se diferenciaban claramente 3 fracciones: una capa superior con baja concentración de células, una capa intermedia con alta concentración de células y una capa inferior (aprox. 0.68 cm) con células sedimentadas. Utilizando la ecuación de Stokes se calculó un diámetro de partícula de 2 µm, que es un diámetro típico para las células de levadura de panadería.

Mezcla C. En esta mezcla no se añadieron células de levadura para evaluar el comportamiento ascendente de las gotas de decano sin influencia del microorganismo. La mezcla era inestable como se esperaba y aproximadamente 84 ml de decano se separaron claramente en 1 minuto.

Mezcla D. Esta mezcla es similar a la Mezcla A. Después de 21 horas de sedimentación, la mayor parte del decano estaba presente en la capa superior. De esta capa se tomaron dos muestras de 40 mL y se centrifugaron durante 30 minutos a 4700 rpm. Las fracciones obtenidas se recopilan en la Tabla 4.

Tabla 4. Fracciones obtenidas después de la centrifugación de dos muestras de la capa superior (después de 21 horas de sedimentación) de la Mezcla D.

Muestra	Volumen total	células de levadura	agua clara	mezcla	decano claro
1	40 ml	aprox. 1ml	7ml	8ml	24ml
2	40 ml	aprox. 0.5 ml	3ml	4 ml	32.5 ml

Estos experimentos indican un amplio rango de gotas, desde gotas pequeñas ($< 10 \mu\text{m}$) hasta gotas grandes ($> 100 \mu\text{m}$), con muchas gotas en el rango pequeño a mediano. La recuperación (casi) completa requiere la centrifugación clásica, que es demasiado costosa dado el uso de combustible del producto BHC. La presente invención utiliza gas de fermentación disuelto que puede hacer flotar pequeñas gotas o hidrociclones que unen pequeñas gotas en gotas más grandes y las separan.

4. Separación de productos mediante flotación a través de gas de fermentación disuelto

Este ejemplo ilustra el efecto del tamaño de las gotas de producto en la selección de la técnica de separación.

La zona del fondo del reactor descrito en el Ejemplo 1 tiene una presión estática de 0.2 MPa (2 bares), donde una cantidad sustancial de CO_2 se absorbe en el caldo. Con una configuración como la que se muestra en la Figura 1, las pequeñas gotas de producto se pueden separar de la mezcla. La eficiencia de flotación depende en gran medida de la relación entre el diámetro de la gota - burbuja, sus velocidades y abundancia. Siguiendo el mismo enfoque que en el Ejemplo 2, en la Tabla 2 se muestra el factor sigma.

Tabla 2. Factor sigma como una función del tamaño de gota.

$d (\mu\text{m})$	$u (\text{m/h})$	Σ / m^2
10	0,02	8425
100	2	84
1000	200	1

Está claro que este procedimiento de separación se puede utilizar cuando hay pequeñas gotas de producto en la mezcla.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción biológica continua de un producto seleccionado del grupo de lípidos, hidrocarburos, ácidos orgánicos, polialcanoatos y mezclas de los mismos, donde dichos productos son capaces de formar gotas en el medio acuoso de fermentación,
- 5 mediante conversión de un sustrato adecuado utilizando microorganismos;
- en tal procedimiento dicho sustrato se fermenta anaeróbicamente de forma continua para producir el producto y el gas de fermentación, en presencia de microorganismos, opcionalmente soportados, en un medio acuoso en un reactor de tipo columna; en tal reactor al menos parte del medio acuoso fluye en dirección ascendente, y recupera el producto separando uno de otro el gas de fermentación, los microorganismos en el medio acuoso y el producto en condiciones
10 que promueven la coalescencia del producto,
- en donde el gas de fermentación se separa al menos parcialmente del medio acuoso antes de separar el producto de la fase acuosa donde se utilizan técnicas de separación de SLL (*es decir* sólido-líquido-líquido) para promover la coalescencia de las gotas de producto con el fin de mejorar la separación; dichas técnicas de separación SLL incluyen sedimentación por gravedad, flotación, o una combinación de las mismas, en donde la separación del producto se
15 realiza utilizando un separador de placa inclinada o en donde el producto se separa del medio acuoso por flotación utilizando gas de fermentación disuelto en el medio acuoso, en donde se genera dióxido de gas de fermentación para la flotación mediante una disminución de la presión del medio acuoso.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los microorganismos pueden suspenderse libremente, inmovilizarse, formar gránulos, formar flóculos y similares.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el sustrato se selecciona de azúcares, almidón, glicerol, metanol, etanol, residuos agrícolas/forestales, hidrolizados de residuos agrícolas/forestales y formas gasificadas de los mismos (por ejemplo, gas de síntesis).
4. Procedimiento según la reivindicación 1-3, en el que el dióxido de carbono se separa primero del medio en la parte superior de la columna, después de lo cual el producto se separa del medio acuoso que contiene los microorganismos,
25 y en el que el medio acuoso que contiene los microorganismos se hace recircular al menos parcialmente hacia la columna.
5. Procedimiento según la reivindicación 1-4, en el que la separación se realiza utilizando un separador de placa inclinada.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 1-4, en el que el producto se separa del medio acuoso por flotación utilizando gas de fermentación disuelto en el medio acuoso, en el que se genera dióxido de gas de fermentación para flotación mediante una disminución de la presión del medio acuoso.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el reactor se hace funcionar a una presión superior a 1 bar abs, preferiblemente regulando la salida de gas de fermentación del reactor.
- 35 8. Procedimiento según la reivindicación 1-7, en el que el reactor es un reactor de flujo ascendente, un reactor de columna con recirculación interna o externa, por ejemplo, utilizando un tubo de aspiración en el reactor.
9. Procedimiento según la reivindicación 1-8, en el que el procedimiento es para la producción biológica continua de hidrocarburos.
10. Procedimiento según la reivindicación 1-9, en el que el procedimiento es para la producción biológica continua de lípidos.
- 40 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1-10, en el que se genera una gran cantidad de gas de fermentación, lo que genera una mezcla turbulenta y dispersión en el reactor y proporciona una función de elevación por gas útil en el reactor.

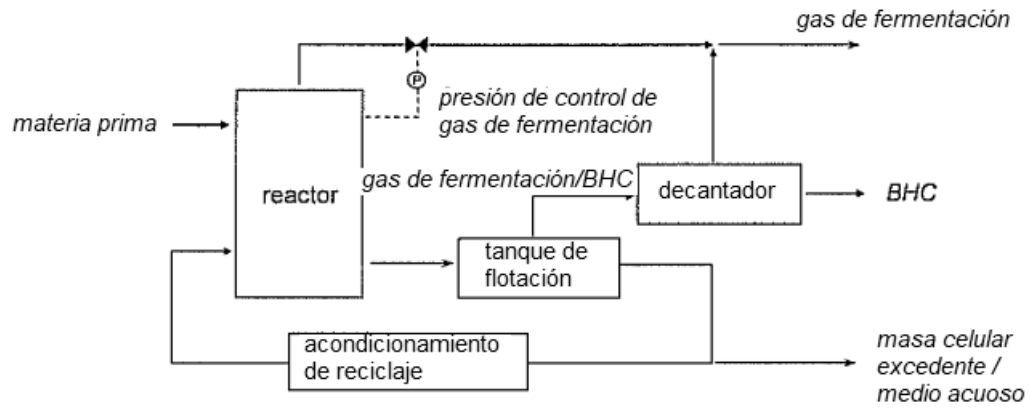


Figura 1

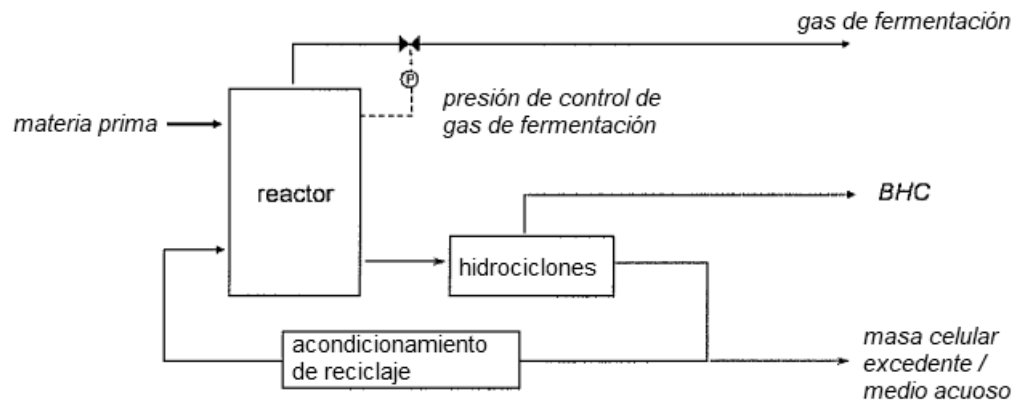


Figura 2

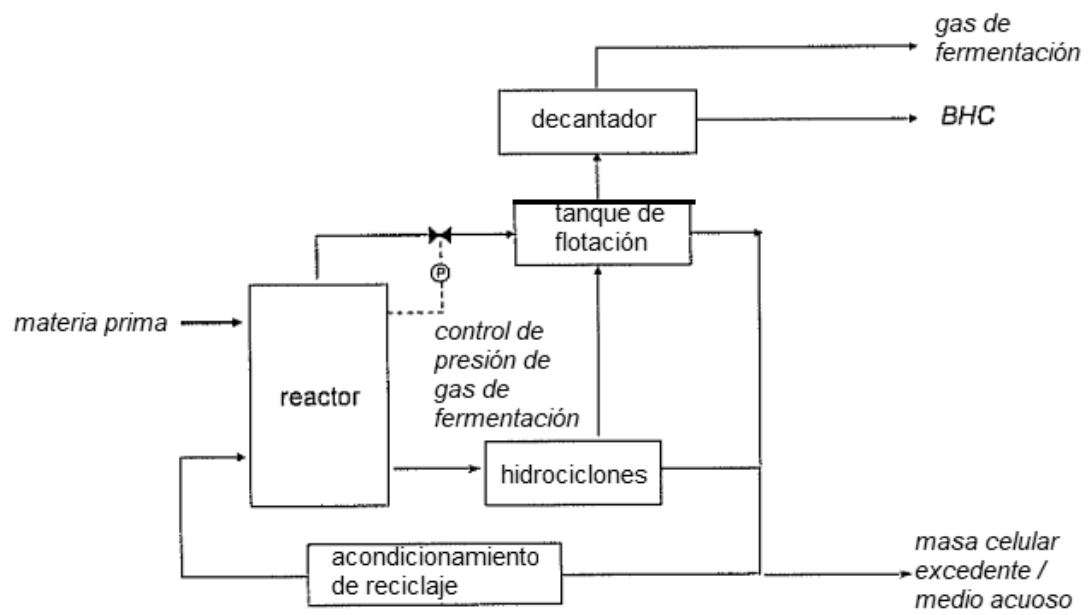


Figura 3