

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 875**

51 Int. Cl.:

G01N 21/84 (2006.01)
G01N 21/25 (2006.01)
C08G 63/78 (2006.01)
C08G 63/16 (2006.01)
C07C 51/50 (2006.01)
G01N 21/29 (2006.01)
G01N 21/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2013 PCT/FR2013/050438**
87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144471**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2013 E 13712876 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2820396**

54 Título: **Método de medición de la estabilidad térmica de un ácido succínico cristalino destinado a la fabricación de polímeros**

30 Prioridad:

02.03.2012 FR 1251924

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

06.03.2019

73 Titular/es:

**ROQUETTE FRERES (100.0%)
62136 Lestrem, FR**

72 Inventor/es:

**FIÉY, GUILLAUME;
GUILLEMANT, MARILYNE;
ROTURIER, JEAN-MICHEL y
JACQUEL, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 702 875 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

Método de medición de la estabilidad térmica de un ácido succínico cristalino destinado a la fabricación de polímeros

La presente invención se refiere a un método colorimétrico que permite cualificar el ácido succínico cristalino que se destina a la fabricación de polímeros, en particular de tipo polibutilensuccinado (o PBS).

- 5 Cuando se utiliza como material de partida para la fabricación de polímeros, el ácido succínico debe ser de alta pureza a fin de mantener el grado de polimerización y sobretodo impedir los fenómenos de coloración que pueden aparecer a altas temperaturas utilizadas para la reacción de polimerización.

La presente invención presenta así un ensayo colorimétrico que permite determinar la estabilidad térmica del ácido succínico utilizado para la fabricación de polímeros.

- 10 La presente invención permite para este fin establecer una correlación entre la estabilidad térmica del ácido succínico cristalino y el color del polímero producido.

Este método colorimétrico puede, finalmente, aprovecharse para identificar las impurezas implicadas en los fenómenos de coloración.

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

Pero, encuentra sobretodo numerosas aplicaciones en los campos cosméticos, agroalimentarios, farmacéuticos, textiles y en los plásticos. Así, se utiliza por ejemplo como intermedio de síntesis de los plásticos para la fabricación de 1,4-butanodiol, de tetrahidrofurano y de gammabutirolactona.

- 20 Por otro lado, los ésteres del ácido succínico tienen el potencial de ser nuevos disolventes "verdes" que pueden sustituir los disolventes más perjudiciales para el hombre y el medio ambiente.

Hasta hace poco, el ácido succínico se producía esencialmente por medio de procedimientos basados en la petroquímica, pero considerados como perjudiciales para el medioambiente. Por lo tanto, se han desarrollado unas alternativas a estos procedimientos.

- 25 La producción de ácido succínico se realiza así actualmente a partir de materias primas renovables (en este caso por medio de procesos de fermentación).

De este modo, incluso si el origen del ácido succínico importa poco aquí, el método de cualificación del ácido succínico cristalino según la invención se ha desarrollado sobre todo para caracterizar el ácido succínico de origen biológico.

- 30 Diversas bacterias son en efecto conocidas por su capacidad para producir ácido succínico por fermentación, tales como *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens* y *Escherichia coli*, así como hongos tales como *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Diversos procedimientos de fermentación se describen también para asegurar la producción eficaz de ácido succínico y para la recuperación/purificación del ácido succínico del medio de fermentación.

- 35 A este respecto, el experto en la materia busca constantemente nuevos procedimientos mejorados de purificación de ácido succínico producido por fermentación.

En efecto, los productos de fermentación contienen generalmente unas cantidades sustanciales de impurezas (restos de biomasa, azúcares, aminoácidos, oligoelementos, sales, etc.) que son tantos precursores de coloración susceptibles por su presencia, incluso en el estado de trazas en el producto final, de influir sobre la cualidad del ácido succínico purificado, y por consiguiente, sobre la cualidad del polímero sintetizado a partir de dicho ácido succínico purificado.

- 40 Se han propuesto por lo tanto un cierto número de procedimientos de eliminación de dichos precursores de coloración:

- para eliminar las impurezas nitrogenadas, se propone en la patente US 5.143.834 un procedimiento de purificación que consiste en someter en particular el medio de fermentación que contiene el succinato a una electrodiálisis convencional, permitiendo esta también concentrar el succinato en fase acuosa.

- 45 - para eliminar las sustancias ionizadas, se describe en el documento US 5.132.456 la puesta en contacto de una materia prima líquida que contiene una sal de ácido succínico con una resina intercambiadora de aniones, para permitir a la resina adsorber el ácido succínico, y así liberarse de sus aniones.

La elución del ácido succínico se realiza después mediante un disolvente orgánico (amoníaco o análogos);

- se describe en el documento JP62.238.232, un método que comprende una resina intercambiadora de cationes para

adsorber el contraión del ácido succínico y que recoge el ácido succínico como tal;

- en cuanto al documento EP 1.669.459, se describe la utilización de una resina intercambiadora de cationes fuertemente ácida de tipo H⁺ para eliminar las impurezas de tipo ion sodio, ion potasio, ion magnesio e ion amonio.

5 Asimismo, esta resina permite la eliminación de aminoácidos tales como la serina, el ácido glutámico, la alanina, la valina, la metionina y la torisona, que son difíciles de eliminar por simple cristalización.

La concentración en cationes diferente de H⁺ en el efluente es entonces $\leq 1,0\%$, preferentemente $\leq 0,5\%$;

- En la patente EP 0 405 707, el nivel de pureza del ácido succínico preparado para aplicaciones comerciales se indica por su contenido en impurezas nitrogenadas ($< 1\%$) y en sulfatos u otros iones contaminantes (< 5 a 10 ppm).

- En la patente EP 1.882.712, se reivindica por otro lado:

10 * un contenido de átomo de nitrógeno de $0,01$ ppm o superior, pero como máximo de 2000 ppm con respecto a la cantidad total de las materias primas,

* un contenido de átomo de azufre de $0,01$ ppm o superior, pero como máximo de 100 ppm con respecto a la cantidad total de las materias primas.

15 Parece así que existe tantos umbrales a respetar en ciertas impurezas precursoras de coloración que existen métodos de purificación concebidos para eliminarlas.

Sin embargo, los métodos clásicos de cuantificación de las impurezas precursoras de coloración no son lo bastante precisos para permitir la categorización de las muestras de ácido succínico frente a su cualidad respectiva para la fabricación de polímeros.

20 De este modo, en conocimiento de la compañía solicitante, no se describe en la bibliografía ningún método colorimétrico fiable que permita discriminar los lotes de ácido succínico producido.

De todo lo anterior, resulta que sigue habiendo una necesidad no satisfecha de disponer de un método eficaz, rápido y simple que permite cualificar el ácido succínico cristalino destinado a la fabricación de polímeros, en particular de tipo polibutilensuccinato (o PBS).

25 La compañía solicitante ha encontrado así que esta necesidad podía satisfacerse mediante la realización de un método colorimétrico rápido de determinación de la estabilidad térmica del ácido succínico producido, que consigue, por otro lado, en distanciarse del conocimiento de la naturaleza de las impurezas precursoras implicadas.

Este método consiste entonces en la medición de la coloración generada después del tratamiento térmico del ácido succínico cristalizado.

30 Esta medición colorimétrica del ácido succínico cristalino se realiza sobre un espectrocolorímetro (por ejemplo el aparato Dataflash 100 comercializado por la compañía DATACOLOR), determinando la media de balance de los blancos (L), de los rojos (a) y de los amarillos (b) de una muestra de ácido succínico cristalizado.

Como se presentará a continuación, la estabilidad térmica del ácido succínico se expresará más particularmente por su valor de balance de los amarillos (denominado "índice b").

35 El procedimiento de medición de la estabilidad térmica del ácido succínico comprende entonces las etapas según la reivindicación 1.

La primera etapa del procedimiento conforme a la invención consiste en preparar un polvo cristalino de ácido succínico que presenta menos del 1% de contenido en agua residual.

La producción del ácido succínico propiamente dicho puede realizarse mediante cualquier medio conocido, por otro lado, por el experto en la materia: por vía química, pero sobre todo por vía de fermentación.

40 De manera ventajosa, el ácido succínico se puede preparar a partir de levaduras recombinantes, tal como se enseña en las solicitudes de patente WO 2009/011974, WO 2009/065780, WO 2009/065779, WO 2010/085731 o WO 2010/118932.

El ácido succínico se puede extraer del medio de fermentación mediante diferentes métodos, como por ejemplo el descrito por la compañía solicitante en su solicitud de patente internacional WO 2011/064151.

45 El procedimiento permite así obtener unos cristales de ácido succínico de alta pureza ($> 99,5\%/s$) – con un rendimiento global de recuperación $> 90\%$.

La segunda etapa del procedimiento conforme a la invención consiste en colocar una muestra de dicho polvo cristalino en un horno a 220°C durante 2h o $2\text{h}15$.

El procedimiento consiste más particularmente en preparar una muestra de exactamente 10 g de ácido succínico cristalino, colocar en un tubo resistente a alta temperatura, y disponer a 220°C en un horno ventilado durante 2h o 2h15.

5 La tercera etapa del procedimiento conforme a la invención consiste en triturar y tamizar el polvo cristalino así tratado, de manera que su distribución granulométrica esté:

* comprendida entre el 0 y el 10%, preferentemente comprendida entre el 4 y el 6%, para las partículas de tamaño superior a 500 µm,

* comprendida entre el 20 y el 40%, preferentemente comprendida entre el 25 y el 35%, para las partículas de tamaño comprendido entre 200 y 500 µm,

10 * comprendida entre el 50 y el 75%, preferentemente comprendida entre el 55 y el 70% para las partículas de tamaño inferior a 200 µm.

Se recomienda dejar reposar el tubo que contiene el ácido succínico así térmicamente tratado como mínimo tres horas antes de proceder a la fabricación de la pastilla que se leerá sobre el colorímetro.

15 La fabricación de dicha pastilla no se puede realizar sobre el polvo como tal, dados los fenómenos de apelmazamiento subsiguientes al tratamiento térmico.

Por lo tanto, se necesita proceder a una trituration fina de los aglomerados así obtenidos.

La trituration se realiza así mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia, es decir de manera manual, en un mortero, o de manera mecánica, con el fin de obtener la distribución granulométrica del polvo tal como se presenta.

20 Esta distribución granulométrica se determina por tamizado en fase seca sobre tamizador vibrante clásicamente accesible al experto en la materia, siguiendo las prescripciones de utilización recomendada por el constructor del tamiz vibrante seleccionado.

Esta conformación facilita la fabricación de la pastilla, según las especificaciones del constructor de espectrocolorímetro.

25 La cuarta etapa del procedimiento conforme a la invención consiste en realizar la medición del color en un espectrocolorímetro y determinar el valor medio de los amarillos (índice "b").

30 La medición colorimétrica se basa en la teoría de los colores opuestos que especifica que las respuestas de los conos (células de la retina del ojo humano responsables de la visión de los colores) a los colores rojo, verde y azul se recombinan en señales opuestas "negro-blanco", "rojo-verde" y "amarillo-azul", cuando se transmite al cerebro por el nervio óptico.

Esta medición se basa en las escalas de color ampliamente utilizadas en las industrias alimentarias y las industrias de los polímeros, denominadas escalas L, a, b de HUNTER.

Son unas escalas tridimensionales.

Las escalas de tipo L, a y b se definen de la manera siguiente:

35 - eje "L" (luminosidad): 0 corresponde al negro, 100 corresponde al blanco

- eje "a" (rojo-verde): los valores positivos se atribuyen al rojo; los valores negativos se atribuyen al verde; el 0 es la neutralidad

- eje "b" (amarillo-azul): los valores positivos se atribuyen al amarillo; los valores negativos se atribuyen al azul; 0 es la neutralidad.

40 El índice "L" tiene por lo tanto un valor comprendido entre 0 y 100, mientras que los índices "b" y "a" no tienen limitaciones numéricas.

El aparato de medición es clásicamente un espectrocolorímetro (que permite la medición de reflexión a longitudes de onda comprendidas entre 400 y 700 nm), tal como Dataflash 100 comercializado por la compañía DATACOLOR (apertura de medición: 9 mm de diámetro"; iluminante de lectura: "C2 Deg").

45 Para el ácido succínico cristalino, la medición del índice "b" permite él solo cualificarlo para su aplicación polimérica, como se demostrará a continuación.

El método colorimétrico según la invención permite categorizar el ácido succínico cristalino producido.

- Así, la presente invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de un polímero del ácido succínico, preferentemente de polibutilensuccinato (o PBS), que implica, como materia prima, un ácido succínico seleccionado con la ayuda del procedimiento de medición de estabilidad térmica descrito anteriormente. Este procedimiento de preparación de un polímero del ácido succínico se caracteriza en particular por que el ácido succínico presenta un valor medio de amarillos inferior o igual a 2.
- 5
- Para demostrarlo, la compañía solicitante ha empezado dos series de experimentaciones que tienen como objetivo ensayar el impacto de la coloración del monómero sobre el nivel de coloración de polímeros producidos a partir de los diferentes lotes de ácido succínico, de origen químico y sobretodo de fermentación, siendo la cualidad química considerada aquí control positivo:
- 10 - determinar el índice "b" para diferentes lotes de ácido succínico producidos por vía de fermentación a partir de cepas de microorganismos recombinantes de tipo *E. coli* o *S. cerevisiae*, y medir la coloración del polímero correspondiente.
- Este primer experimento ha permitido así definir un valor umbral del índice "b" de 1,9, por debajo de lo cual el ácido succínico cristalino puede retenerse para la aplicación polímero PBS en particular.
- 15 - determinar cualitativa y cuantitativamente unas impurezas susceptibles de actuar como precursores de coloración del ácido succínico producido por vía de fermentación.
- En cuanto a la coloración del polímero producido a partir del ácidosuccínico (en este caso aquí el PBS), ésta se determina clásicamente sobre un espectrofotómetro (por ejemplo DYK Gardner TCS II – ángulo de observación de 10°, iluminación D65), determinando también el medio de balance de los blancos (L), de los rojos (a) y de los amarillos (b).
- 20 La coloración del polímero se expresará entonces por su valor de balance de los amarillos (denominados aquí "Yellow index").
- Ejemplo 1: producción por vía de fermentación, extracción y purificación del ácido succínico
- Se realiza una primera serie de fermentaciones mediante un *E. coli* recombinante (aquí la cepa SBS550MG - pHL413 descrita en Sanchez *et al.*, Metabolic Engineering, 7 (2005) 229-239, y en los documentos US 7.223.567 y US 2005/0042736).
- 25 Una segunda serie de fermentaciones lo es también, mediante una cepa recombinante de *S. cerevisiae* (aquí aquella descrita en la solicitud de patente WO 2009/065778).
- La extracción de los succinatos y la purificación del ácido succínico se realizan a partir de estos medios de fermentaciones por la sucesión de las etapas siguientes:
- 30 - Eliminación de las impurezas orgánicas insolubles (biomasa y restos celulares)
- La eliminación se realiza por filtración tangencial de flujo tangencial sobre membrana que presenta un diámetro de poro de 100 nm, entre 40 y 80°C (membrana de tipo cerámica de 3,5 mm de diámetro de canal).
- La temperatura se mantiene preferiblemente a 60°C con una presión transmembranaria de 1 bar y una diafiltración con el 20% de agua desmineralizada.
- 35 En estas condiciones, el flujo es de aproximadamente 90 l/h/m² y el permeado obtenido es límpido y brillante. El permeado contiene todavía más de 6000 ppm de impurezas orgánicas solubles, aquí el nitrógeno orgánico soluble.
- Eliminación de las impurezas orgánicas solubles (proteínas solubles residuales)
- Esta eliminación consiste en absorber el nitrógeno orgánico sobre carbón activo o desnaturalizarlo antes de eliminarlo por filtración. En el caso de la desnaturalización, ésta puede ser térmica u osmótica.
- 40 Se utiliza una zona de contacto a 80°C que permite flocular las proteínas durante 10-15 minutos. La solución se filtra después a través de un filtro de diámetro de poro de 0,22 µm.
- Esta etapa de eliminación de nitrógeno orgánico se vuelve opcional en el caso en el que la microfiltración se realiza a 80°C. En efecto, existe entonces simultáneamente desnaturalización del nitrógeno orgánico y retención sobre la membrana de microfiltración.
- 45 - Quelación y acidificación
- La concentración máxima admisible de alimentación de la electrodiálisis bipolar (EDB) en términos de cationes divalentes (Ca²⁺, Mg²⁺, etc.) es de 5 ppm. En efecto, los cationes divalentes presentes reaccionarán con los iones hidróxilos a nivel de las membranas de electrólisis del agua para formar sales muy poco solubles, que cristalizan en las membranas y las hacen permeables.

ES 2 702 875 T3

A fin de proteger la integridad de las membranas de EDB, se realiza una etapa de quelación para alcanzar el umbral de seguridad de 5 ppm.

5 Esta etapa consiste en complejar los cationes divalentes con la ayuda de funciones aminofosfónicas (Purolite S940, Amberlite IRC747, etc.) o diacéticas (Purolite S930, Lewatit TP208) injertadas sobre resina intercambiadora de cationes.

Para ello, la solución se alimenta a 60°C, con un caudal de 2 BV/h. En estas condiciones, el volumen de solución tratada puede alcanzar 30 a 40 veces el volumen del lecho de resina.

Una vez liberada de estos cationes divalentes, la solución puede acidificarse por EDB. El módulo utilizado es un *stack* de la compañía EURODIA: EUR6.

10 Este stack está constituido de dos tipos de membranas:

- las membranas bipolares que permiten la electrolisis del agua ($H_2O \rightarrow H^+ + OH^-$) y la acidificación de los succinatos,
- las membranas catiónicas, que permiten la transferencia selectiva de los cationes monovalentes.

La electrolisis y la transferencia de los cationes se aseguran por una diferencia de potencial aplicada al sistema gracias a un generador.

15 La sal de succinato se acidifica entonces por una diferencia de potencial aplicada al sistema gracias a un generador.

La sal de succinato se acidifica entonces a lo largo del tiempo por los iones H^+ liberados por la electrolisis del agua. De la misma manera, los cationes monovalentes se alcalinizan por los iones hidroxilos después de la migración a través de las membranas catiónicas para volver a dar una base reciclable en fermentación.

20 El flujo de cationes transferidos es de aproximadamente 22 eq/h/m² para un porcentaje de conversión del 90%, lo que equivale a un pH de aproximadamente 3,5.

El acabado de la acidificación se efectúa sobre resina catiónica fuerte (PUROLITE C150). En efecto, los últimos equivalentes son muy difíciles de transferir y el consumo energético de la operación se incrementa entonces en gran medida (limitación principalmente debida a la presión osmótica).

25 El tratamiento se efectúa preferiblemente a 40°C y a 2 BV/h. El volumen de solución tratada es entonces de aproximadamente 10-15 BV.

El pH de la solución después del tratamiento sobre resina catiónica es igual a 2 y contiene el ácido succínico en su forma poco soluble (ácido libre).

- Cristalización

30 La solución acidificada se concentra por evaporación del agua sobre un evaporador de película que cae de tipo WIEGAND®. El factor de concentración es del orden de 5 a 10 según la concentración inicial de ácido succínico.

Es aquí igual a 8 para alcanzar la sobresaturación.

La concentración de la solución es entonces de 420 g/l a 80°C, lo que corresponde a la sobresaturación de la solución.

La solución se enfría después por contacto directo de 80 a 20°C con una velocidad de 5°C/h.

35 La cristalización empieza espontáneamente a partir del inicio del enfriamiento pero se puede realizar una inoculación para control mejor las propiedades físicas del ácido succínico cristalizado.

Después de la separación sobre una centrifugadora ROUSSELET® y un lavado con un volumen de agua desmineralizada por volumen de torta, se secan los cristales.

En esta etapa, el rendimiento de cristalización es > 85% para una pureza de ácido succínico del 99,7%/s.

- Recuperación en solución

40 La recuperación en solución de los cristales se efectúa en agua desmineralizada a 60°C en lugar de 20°C, a fin de reducir el consumo de agua desmineralizada.

Con el mismo objetivo, el licor madre y/o las aguas de lavado de los cristales de alta pureza pueden también reciclarse en esta etapa. Se optimiza entonces el rendimiento global de ácido succínico.

- Tratamiento de acabado

Esta etapa está constituida de un tratamiento de decoloración y de una etapa de desmineralización. La decoloración puede efectuarse por carbón activo u ozonación.

El tratamiento con carbón activo presenta el mayor interés de fijar el ácido orótico, impureza nitrogenada muy poco soluble y que cristaliza con el ácido succínico.

- 5 En lotes, la dosis de carbón activo NORIT SX⁺ es del 1% con respecto al ácido succínico. Después de 1h de reacción a 60°C, la solución se filtra sobre un filtro de bujías de 3 µm.

La solución se trata después en desmineralización a 2BV/h a 60°C.

- 10 Realizado sucesivamente sobre resina catiónica fuerte PUROLITE[®] C150 y después aniónica débil DAION[®] WA30, el tratamiento permite eliminar las trazas de aniones y cationes minerales por un lado y el ácido fumárico por otro lado. Además, la resina aniónica débil permite una descoloración suplementaria.

Después del tratamiento sobre resina aniónica débil, el contenido en ácido fumárico puede disminuirse en un factor 20 y la coloración residual es nula.

- Cristalización

La solución purificada puede entonces cristalizarse en las mismas condiciones que en la etapa anterior.

- 15 El rendimiento de esta etapa de cristalización es también > 85%. El licor madre y las aguas de lavado se reciclan a nivel de la disolución de los cristales de cualidad técnica. El rendimiento global de esta etapa puede así acercarse al 100%. La pureza de los cristales es de más del 99,8%.

Ejemplo 2: Medición colorimétrica del ácido succínico producido por fermentación de microorganismos recombinantes

- 20 Se han realizado 3 fermentaciones sucesivas para la cepa de *E. coli* (Ensayos "A" a "C"); 6 para la cepa de *S. cerevisiae* (Ensayos "D" a "I") y el ácido succínico extraído y purificado en las condiciones del ejemplo 1.

Las 9 muestras de polvo cristalino de ácido succínico se analizan después siguiendo el método conforme a la invención.

Se han colocado 10 g de cada una de estas muestras en un horno a 220°C durante 2h15; el polvo recuperado se ha triturado y analizado en espectrocolorimetría conforme al método de la invención.

- 25 La tabla 1 siguiente presenta los valores de los índices "L", "a" y "b" tales como se han obtenido.

Tabla 1

Muestras	"L"	"a"	"b"
Ácido succínico «químico»	98,0	0,00	1,3
"A"	91,1	0,99	6,2
"B"	97,3	0,19	1,8
"C"	97,1	0,14	1,9
"D"	96,9	0,00	2,1
"E"	96,5	0,29	2,3
"F"	97,4	0,16	1,7
"G"	97,3	0,14	1,7
"H"	98,1	0,11	1,1
"I"	97,3	0,23	1,9

Con respecto a la muestra de ácido succínico químico de referencia (comercializado por la compañía SIGMA), aparece aquí como que sólo la muestra "H" tendría la cualidad colorimétrica requerida.

- 30 Para demostrarlo, se han llevado a cabo ensayos de polimerización con estas diferentes cualidades.

Se sintetizan unas muestras de PBS por medio de una reacción de policondensación en dos etapas, en un reactor de acero inoxidable de 7,5 l equipado de un sistema de calentamiento, de un agitador mecánico, de una columna de destilación, de una línea de vaciado y de una entrada de nitrógeno gaseoso.

Se carga el reactor con 1889 g (16 moles de ácidos succínico) y 1513,7 g (16,8 moles) de 1,4-butanodiol (BDO).

- 5 La mezcla de reacción se calienta después a 225°C bajo 2 bares de presión de nitrógeno y se agita a una velocidad constante de 150 rpm.

Una mezcla de agua y de tetrahidrofurano (1 a 2,5 moles% de THF) producto la esterificación y la ciclación del BDO se elimina del reactor por la columna a destilar.

El porcentaje de esterificación se estima por la cantidad del destilado recogido.

- 10 En una segunda etapa, la presión se reduce a 0,7 mbares en 120 minutos.

La reacción se cataliza por 3,914 g de Ti(OBu)₄ (Ti = 200 ppm), que se añaden al reactor durante la etapa de descompresión (aproximadamente 20 mbares) para evitar lo más posible el contacto con el agua residual.

Se mantienen durante 3,8 horas las condiciones de presión.

- 15 El polímero se retira del reactor y se sumerge en agua. Aproximadamente 15 mg de granulados de PBS se obtienen después de la granulación.

El grado de coloración del polímero se determina después sobre unas placas polimerizadas que presentan el mismo grosor (del orden de 3 mm) con la ayuda de un espectrofotómetro DYK GARDNER TCS II (ángulo de observación de 10°, iluminante D65).

- 20 Los resultados se expresan también por los índices "L", "a" y "b", y más particularmente por la medición del índice del amarillo (también denominado "yellow index" – abreviatura; YI).

El YI se calcula en realidad a partir de la ecuación siguiente (ASTM D1925):

$$YI = \frac{100 \times (1.28 X_{CIE} - 1.06 Z_{CIE})}{Y_{CIE}}$$

- 25 La tabla 2 siguiente informa sobre los YI de los polímeros producidos a partir de dos diferentes muestras de ácido succínico de origen biológico de índice "b" conocido, a ambos lados del umbral del valor del índice "b" establecido a continuación, es decir índice "b" = 2.

Tabla 2

PBS preparado a partir de:	Índice "b"	YI
2 lotes de ácido succínico producido por vía química	1,3	7,8
	1,3	6,1
"H"	1,1	6,5
"F"	1,7	9,8
"D"	2,1	11

Un PBS se considera correcto por el experto en la materia si son YI es < 10.

- 30 Estos resultados permiten confirmar la buena calidad del ácido succínico "H" y mostrar que se puede ir hasta el valor de índice "b" de 1,7 para producir una calidad colorimétrica de PBS aceptable.

Ejemplo 3: Confirmación del valor umbral del índice "b" del ácido succínico de origen biológico: enriquecimiento de un ácido succínico de referencia con diversas impurezas de naturaleza y cantidad definidas

- 35 Las impurezas susceptibles de actuar como precursores de coloración clásicamente identificadas en los medios de fermentación son en particular unas sustancias residuales de tipo hidratos de carbono, nitrógeno mineral u orgánico, azufre mineral y algunos ácidos orgánicos coproducidos por las cepas.

A fin de ensayar la solidez del método de cualificación del ácido succínico cristalino de la invención, y el uso predictivo que se podrá hacer de él, se enriquece artificialmente un ácido succínico de origen químico (índice "b" de referencia

= 1,3) o de origen biológico (ácido succínico que corresponde al lote "H" del ejemplo 1 – índice "b" de referencia = 1,1) con unas impurezas representativas de lo que se encuentra en dichos medios de fermentación antes de realizar el tratamiento en horno a 200°C.

Los contaminantes seleccionados son los siguientes (ensayados a las dosis indicadas):

- 5 - hidrato de carbono: glucosa a concentraciones del orden de 100 ppm;
- nitrógeno orgánico: valina a una concentración de 200 ppm para el ácido succínico de origen químico; 1000 ppm para el de origen biológico;
- nitrógeno: Na₂SO₄ a la concentración de 200 ppm para el ácido succínico de origen químico; 1000 ppm para el de origen biológico;
- 10 - ácidos orgánicos: ácido fumárico, ácido málico a la concentración de 1000 ppm, ensayados únicamente con el ácido succínico de origen químico;
- ácido orgánico azufrado: ácido orótico a la concentración de 1000 ppm, ensayado únicamente con el ácido succínico de origen químico;
- azufre y nitrógeno: sulfato de amonio a 1200 ppm, ensayado únicamente con el ácido succínico de origen biológico.
- 15 Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3 siguiente.

Tabla 3

Muestras	Índice "b"	Δ (b - b.ref)
AS químico + 100 ppm de glucosa	3,3	2
Ensayos "H" + 100 ppm de glucosa	3,2	2,1
AS químico + 200 ppm de valina	1,5	0,2
Ensayos "H" + 1000 ppm de valina	1,3	0,2
AS químico + 100 ppm de glucosa + 200 ppm de valina	> 5	> 4
AS químico + 200 ppm de Na ₂ SO ₄	1,3	0
Ensayos "H" + 1000 ppm Na ₂ SO ₄	1,2	0,1
AS químico + 1000 ppm de ácido fumárico	1,7	0,5
AS químico + 1000 ppm de ácido málico	1,5	0,2
AS químico + 1000 ppm de ácido orótico	2	0,7
Ensayos "H" + 1200 ppm de sulfato de amonio	2	0,9

Estos resultados demuestran:

- la importancia de la glucosa sola en la estabilidad térmica del ácido succínico de origen biológico;
- 20 - los contaminantes nitrogenados provocan sólo una ligera alteración de la estabilidad térmica del ácido succínico;
- la combinación de los contaminantes nitrogenados y azufrados amplifican el fenómeno de coloración.

La compañía solicitante va, en este sentido, en contra de un prejuicio técnico que quiere que sólo las impurezas nitrogenadas y azufradas deben controlarse (véase la patente EP 1.882.712 citada antes);

- 25 - los derivaos del ácido succínico (ácido málico y fumárico) así como el azufre (Na₂SO₄) no tienen impacto significativo sobre la coloración del ácido succínico químico tomado como referencia,
- los contaminantes nitrogenados provocan sólo una ligera alteración de la estabilidad térmica del ácido succínico.

Para complementar este trabajo, se ha procedido a la fabricación del PBS a partir de diferentes lotes de ácido succínico químico enriquecido en impurezas (aquellos anteriores y otras muestras preparadas especialmente para esta segunda serie de ensayos).

La tabla 4 siguiente presenta los resultados de YI medidos para cada uno de los polímeros producidos.

Tabla 4

PBS producido con	N (ppm)	S (ppm)	índice "b" del monómero	"Yellow index" del PBS
Un primer ácido succínico químico de referencia	0	0	1,3	7,8
Un segundo ácido succínico químico de referencia	0	0	1,3	6,1
+ 1000 ppm de ácido fumárico	0	0	1,7	9,8
+ 1000 ppm de ácido málico	0	0	1,5	4,6
+ 1000 ppm de ácido orótico	179	0	2	15,7
+ 200 ppm de Na ₂ SO ₄	0	45	1,3	2,8
+ 200 ppm de valina	24	0	1,5	3,9
+ 20 ppm de glucosa	0	0	2,5	11,3
+ 100 ppm de glucosa	0	0	3,3	18,1
+ 100 ppm de glucosa + 200 ppm de valina	24	0	4	15,5

5 Estos primeros resultados confirman la influencia de las impurezas glucosa y ácido orótico sobre la cualidad del polímero, como sobre la del monómero.

Por otro lado, estableciendo la curva que traza los valores del índice "b" del monómero en función del YI del polímero, y tomando siempre como referencia un PBS de coloración correcta cuando son YI es ≤ 10 , se encuentra un valor umbral para el índice "b" próximo de 2.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de medición de la estabilidad térmica del ácido succínico, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- 1) preparar un polvo cristalino de ácido succínico que presenta menos del 1% de contenido en agua residual,
- 5 2) colocar 10 g de dicho polvo cristalino en un horno a 220°C durante 2h o 2h15,
- 3) triturar y tamizar el polvo cristalino así tratado, de manera que su distribución granulométrica esté:
- * comprendida entre el 0 y el 10%, preferentemente comprendida entre el 4 y el 6% para las partículas de tamaño superior a 500 μm ,
- 10 * comprendida entre el 20 y el 40%, preferentemente comprendida entre el 25 y el 35% para las partículas de tamaño comprendido entre 200 y 500 μm ,
- * comprendida entre el 50 y el 75%, preferentemente comprendida entre el 55 y el 70% para las partículas de tamaño inferior a 200 μm ,
- 4) realizar la medición del color en un espectrocolorímetro de una pastilla fabricada sobre el polvo triturado y tamizado y determinar el valor medio de los amarillos (índice "b").
- 15 2. Procedimiento de preparación de un polímero del ácido succínico, preferentemente de polibutilensuccinato (o PBS), que utiliza, como materia prima, un ácido succínico seleccionado con la ayuda del procedimiento según la reivindicación 1.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que el ácido succínico presenta un valor medio de los amarillos inferior o igual a 2.

20