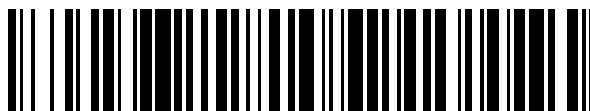


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 873**

51 Int. Cl.:

C07D 307/33 (2006.01)

C07D 207/267 (2006.01)

C07C 51/41 (2006.01)

C07C 51/42 (2006.01)

C07C 55/02 (2006.01)

C07C 55/10 (2006.01)

C07C 57/15 (2006.01)

C07C 59/245 (2006.01)

C12P 7/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2012 PCT/US2012/045937**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13012590**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2012 E 12815444 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2734509**

54 Título: **Métodos para preparación de sales de amonio de diácidos C4 por fermentación y métodos integrados para producción de derivados C4 de los mismos**

30 Prioridad:

21.07.2011 US 201161510204 P

21.07.2011 US 201161510209 P

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

26.06.2019

73 Titular/es:

ARCHER DANIELS MIDLAND COMPANY (100.0%)

4666 Faries Parkway

Decatur, IL 62526, US

72 Inventor/es:

MA, CHI-CHENG y

WERPY, TODD

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 717 873 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

Métodos para preparación de sales de amonio de diácidos C4 por fermentación y métodos integrados para producción de derivados C4 de los mismos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Ordinariamente, la producción de diácidos tales como los ácidos succínico, málico, maleico y fumárico por fermentación de azúcares por un microorganismo implica recuperación del diácido a partir del caldo de fermentación por formación de la sal de calcio del diácido, que no es soluble en el caldo acuoso. En el caso de la fermentación por hongos tales como *Rhizopus oryzae* o *Aspergillus oryzae*, que producen respectivamente con preferencia ácido fumárico y ácido málico, el calcio se introduce típicamente en el caldo en forma de CaCO_3 , que forma $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ en solución. El bicarbonato es eficaz para mantener el pH del caldo, dado que el diácido que se produce tiende a rebajar el pH. El diácido se recupera en la forma de la sal de calcio. Las sales de calcio de tales diácidos C4 tienen una solubilidad muy baja en soluciones acuosas (típicamente menor que 3 g/litro a la temperatura ambiente), y no son adecuadas para muchas aplicaciones para las cuales se necesita el ácido libre, tales como conversión química en productos derivados como butanodiol y análogos. Por ello, la sal de calcio se disuelve típicamente en ácido sulfúrico, formando sulfato de calcio insoluble, que puede separarse fácilmente del diácido libre. El sulfato de calcio es un producto que tiene pocas aplicaciones comerciales, y de acuerdo con ello se desecha típicamente como un residuo sólido en vertederos u otros sitios de eliminación de residuos sólidos.

En un proceso alternativo descrito por ejemplo en WO 2010/147,920, en lugar de utilizar carbonato de calcio, el pH del medio para crecimiento fúngico se mantenía utilizando un compuesto de magnesio que contiene oxígeno, tal como MgO , $\text{Mg}(\text{OH})_2$, MgCO_3 , o $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$, todos los cuales forman la sal bicarbonato en solución acuosa. Se encontró que el uso de magnesio en lugar de calcio aumenta la producción del ácido por fermentación. La fermentación se condujo a un pH de 5-8 y más preferiblemente 6,0-7,0. El pH se mantuvo por la adición del compuesto oxigenado de magnesio, y se introdujo CO_2 en el medio en combinación con el compuesto oxigenado de magnesio para mantener una fracción molar de bicarbonato (HCO_3^-) de al menos 0,1 y muy preferiblemente al menos 0,3 basada en los moles totales de HCO_3^- , CO_3^{2-} , and CO_2 en el medio. Al final de la fermentación, la porción líquida del medio contenía una mayor parte de diácido como una sal soluble de magnesio, que se separaba de una porción de sólidos del medio que contenía sales precipitadas y/u otro material insoluble. La sal ácida del diácido disuelta se convertía en la forma de ácido libre por reducción del pH hasta por debajo del punto isoeléctrico del diácido utilizando un ácido mineral tal como ácido sulfúrico, y reduciendo la temperatura del medio hasta (muy preferiblemente) no más de 5°C , lo cual precipitaba el ácido libre de la solución.

Si bien son útiles para producir un ácido libre, las técnicas descritas para utilización de los resultados de las sales de magnesio son caras, en primer lugar, debido a que los compuestos oxigenados de magnesio cuestan considerablemente más que los compuestos de calcio análogos, y la mayor parte del magnesio permanece en el medio de fermentación en la forma de sal de magnesio del ácido inorgánico que no es útil económicamente para fermentación u otros propósitos ulteriores. En segundo lugar, la necesidad de reducir la temperatura de las sales solubles recuperadas para precipitar el ácido libre añade costes energéticos adicionales.

WO 2009/024,294 y WO 2010/092,155 dan a conocer un método para preparación de derivados de ácidos C4 tales como GBL, BDO y compuestos de pirrolidona a partir de ácido succínico o sales de amonio del mismo por una reacción de hidrogenación catalítica. Se describe también el uso de cromito de cromo como catalizador.

WO 02/102,772 da a conocer un método para preparación de derivados de pirrolidona como NMP a partir de sales de ácido succínico, en particular succinato de diamonio, que pueden obtenerse por fermentación. El método implica un paso de hidrogenación catalítica realizado en presencia de metanol.

CAA 2,625,511 da a conocer un método de preparación de derivados de ácidos C4 tales como GBL y BDO a partir de succinato de diamonio preparado por fermentación por una secuencia esterificación/ hidrogenación.

EP 1,686,183 da a conocer una solución amónica de ácido orgánico producida por los pasos de obtención de un caldo de fermentación que contiene ácido orgánico y magnesio por utilización de un microorganismo productor de ácido orgánico en presencia de un compuesto de magnesio, producción de ácido orgánico y amonio y un compuesto de magnesio sometiendo el compuesto ácido orgánico-magnesio contenido en el caldo de fermentación a intercambio de sal utilizando un compuesto de amonio, y separación del compuesto de magnesio producido para obtener una solución del compuesto ácido orgánico-amonio.

Por tanto, existe en la técnica necesidad de idear otros métodos para recuperación de diácidos a partir de un medio de fermentación que pueda producir un producto diácido adecuado para uso en reacciones químicas subsiguientes, evitando también al mismo tiempo la producción de productos residuales de calcio y/o magnesio que contribuyen al extra coste para la producción de los diácidos.

65 SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto, se describen métodos de recuperación de diácidos orgánicos por un proceso de fermentación en una forma comercialmente útil en tanto que se reduce la acumulación de productos residuales no utilizables tales como sulfato de calcio. El método de recuperación implica formación y separación de sales carbonato del catión metálico divalente de calcio, se precipitan y se filtran a partir de un caldo de fermentación mientras que se forman simultáneamente sales de amonio del diácido, que permanecen solubles. El precipitado de carbonato metálico recuperado puede reutilizarse en el proceso de fermentación en lugar de desecharse como residuo no utilizable. El filtrado recuperado que contiene las sales de amonio solubilizadas del diácido puede procesarse subsiguientemente en diácidos libres o utilizarse directamente para fabricar productos derivados en reacciones de un solo reactor o reacciones de un solo reactor con intervención de la eliminación de amonio.

La presente invención se refiere a un método de producción de un método de producción de un compuesto derivado de ácidos C4, que comprende obtener un caldo de fermentación clarificado a partir del cultivo de un microorganismo para producir al menos una sal diamónica de un diácido C4 seleccionado del grupo constituido por ácido succínico, málico, maleico y fumárico y en donde el caldo de fermentación clarificado que contiene la sal diamónica de un diácido C4 se obtiene por:

- cultivo de un microorganismo en un medio de fermentación para producir un caldo de fermentación que contiene el diácido C4;
- puesta en contacto del caldo de fermentación que contiene el diácido C4 con un compuesto de calcio para formar una sal de calcio del diácido;
- puesta en contacto del caldo de fermentación con una fuente de amonio y con una fuente decarbonato en una primera condición que incluye una temperatura de al menos 100°C y una presión de al menos 1480,28 kPa [200 psig] durante un tiempo suficiente para formar una sal carbonato de al menos 90% del calcio y una sal diamónica de al menos 90% del diácido C4 en el caldo de fermentación;
- disminución de la temperatura y la presión del caldo de fermentación contactado a una segunda condición eficaz para formar un precipitado de la sal carbonato de calcio en tanto que se mantiene la sal diamónica del diácido en solución; y
- separación de la sal carbonato de calcio precipitada y la masa de células en el caldo de fermentación de la solución de la sal diamónica del diácido para formar el caldo de fermentación clarificado que contiene la sal de amonio de un diácido C4; y

puesta en contacto del caldo de fermentación clarificado que contiene la sal diamónica del diácido C4 con un catalizador de hidrogenación y H2 en una mezcla de reacción en condiciones de temperatura, presión y tiempo suficientes para hidrogenar la sal diamónica del diácido C4 a fin de formar un compuesto derivado seleccionado del grupo constituido por gamma-butirolactona (GBL) y 1,4-butano-diol (BDO).

Realizaciones preferidas son evidentes a partir de la materia que constituye el objeto de las reivindicaciones subordinadas.

Se dan a conocer también métodos integrados de hidrogenación química en un solo reactor para la síntesis del disolvente comercialmente valioso N-metil-2-pirrolidona (NMP) (no de acuerdo con la invención) y los reactivos gamma-butirolactona (GBL) y 1,4-butano-diol (BDO) que están basados en la hidrogenación de los diácidos C4 presentes en un caldo de fermentación, recuperación de las sales solubles de amonio de los mismos, y reducción de las sales de amonio o los diácidos libres obtenidos a partir de ellas a los compuestos deseados. La descripción proporciona por tanto una alternativa basada en biomasa a la síntesis de NMP, GBL y BDO a partir de recursos renovables que no está basada en reactivos producidos a partir de fuentes petroquímicas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 ilustra una realización de un proceso para la sustitución de sales parcialmente solubles de diácidos de calcio con sales de amonio solubles de los diácidos formando carbonato de calcio insoluble y el reciclado de las mismas en un proceso de fermentación de acuerdo con un aspecto de la invención.

Figura 2 ilustra una secuencia de reacción para la producción de NMP a partir de succinato de amonio de acuerdo con otro aspecto de la descripción.

Figura 3 ilustra una secuencia de reacción para la reducción de sales de diácidos de diamonio C4 mixtas a succinato de amonio.

Figura 4 ilustra una secuencia de reacción para la deshidratación catalizada por bases de malato a fumarato

Figura 5a ilustra una secuencia de reacción para la producción de 1,4-butanodiol a partir de diácidos C4 mixtos.

Figura 5b ilustra la producción de dimetil-ésteres de diácidos C4 de acuerdo con una reacción para producir BDO a partir de fumarato o malato. Figura 5c ilustra la reducción directa de ácido succínico a butanodiol.

Figura 6 ilustra una secuencia de reacción para la producción de gamma-butirolactona a partir de fumarato y succinato.

Figura 7 resume diversas realizaciones de la combinación de la formación de sales de amonio sustituidas a partir de sales de calcio o magnesio (no de acuerdo con la invención) de diácidos C4 con separación de los carbonatos, y la

hidrogenación de las mismas para formar los derivados 1,4-butanodiol, N-metil-2-pirrolidona (no de acuerdo con la invención), y gamma-butilolactona.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

5 **Producción y Recuperación de Sales Amónicas de Diácidos a partir de Medios de Fermentación.** La presente descripción proporciona, en un aspecto, métodos de producción y recuperación de diácidos orgánicos producidos por un proceso de fermentación en la forma comercialmente útil de sales de amonio, en tanto que se reduce la acumulación de productos residuales inutilizables tales como sulfato de calcio o formas inutilizables de magnesio (no de acuerdo con la invención).

10 Los diácidos orgánicos más adecuados para uso en los métodos de la presente descripción son los diácidos C4 succínico, málico, maleico y fumárico. (Dado que el ácido maleico es el isómero cid del ácido fumárico, cualesquiera afirmaciones en esta memoria concernientes al ácido fumárico son igualmente aplicables al ácido maleico).

15 Pueden utilizarse una diversidad de microorganismos para producir diácidos por fermentación. Para la producción de los diácidos C4, se sabe que diversas especies de los hongos *Aspergillus*, especialmente *A. flavus*, *A. oryzae*, y *A. sojae* producen títulos relativamente altos de diácidos C4 enriquecidos con ácido málico. Se sabe también que diversas especies de los hongos *Rhizopus*, particularmente *R. oryzae*, producen títulos relativamente altos de diácidos C4 enriquecidos con ácido fumárico. De éstos, los métodos descritos en esta memoria se han empleado para fines demostrativos, pero no limitantes, con medios de fermentación preparados a partir de *A. oryzae* y *R. oryzae*.

20 Se conocen también especies bacterianas para producción de diácidos C4, especialmente bacterias de diversos géneros a las que se ha dado una designación de especie "succinogenes", así designadas por que se sabe que las mismas producen diácidos enriquecidos en ácido succínico. Éstas incluyen, por ejemplo, *Wolinella succinogenes*, *Fibrobacter succinogenes*, y *Actinobacillus succinogenes*. De éstas, los métodos descritos en esta memoria se han ilustrado con medios de fermentación de *Actinobacillus succinogenes* que producen una mezcla de diácidos C4 enriquecidos con ácido succínico.

30 Dado que todos los medios de fermentación, sea de hongos o fermentaciones bacterianas contienen composiciones similares de nutrientes en solución acuosa (v.g., una fuente de carbono de azúcares, trazas de sales y vitaminas junto con cationes divalentes) y producen composiciones similares de diácidos C4, los métodos proporcionados en esta memoria son aplicables a cualquier proceso que produzca diácidos C4 por fermentación por cualquier microorganismo aun cuando las mezclas exactas de diácidos C4 producidas pueden diferir. Algunas fermentaciones, por ejemplo, fermentaciones con *Rhizopus* o *Aspergillus* producen pequeñas cantidades de subproductos indeseables tales como ácido acético, glicerol, ácido glutárico, etanol y ácido cítrico, sin embargo, estos materiales subproducto no interfieren con la recuperación del producto diácido C4 de amonio o con el uso directo del medio clarificado entero recuperado como reactivo de alimentación para reacciones subsiguientes.

40 Ventajosamente, las técnicas descritas en esta memoria pueden practicarse para recuperación de diácidos a partir de medios de fermentación enteros (no de acuerdo con la invención), medios de fermentación clarificados, y medios de fermentación purificados. "Medio de fermentación entero" significa el caldo de fermentación completo con inclusión de biomasa de células y constituyentes nutrientes, suplementos y subproductos de fermentación. El Ejemplo 4 muestra que un caldo de fermentación entero de este tipo puede procesarse para convertir una mezcla de sales malato, fumarato y succinato en una mezcla que ha convertido al menos 96% del malato y fumarato en succinato de diamonio en una serie de pasos de un solo reactor. Es preferible utilizar medios de fermentación enteros por razones de coste y rendimiento dado que la sal carbonato del metal divalente precipitada es un material sólido que es difícil de separar de la biomasa particulada del medio de fermentación. "Medio de fermentación clarificado", es la fracción líquida del medio de fermentación bruto que queda después que la biomasa de células y otros sólidos suspendidos ha sido separada por filtración, centrifugación u otra técnica adecuada. El Ejemplo 3 muestra la recuperación de diácidos de amonio de un medio de fermentación clarificado. Medio de fermentación "purificado" es un medio de fermentación clarificado que se ha sometido a al menos un paso para separar una fracción que contiene componentes indeseables de una fracción enriquecida con diácidos. Técnicas típicas que pueden utilizarse para obtener un medio de fermentación purificado incluyen, por ejemplo, destilación, cromatografía de intercambio iónico, electrodiálisis, electrodesionización y ultrafiltración.

55 Los métodos están basados en una primera parte en la introducción de carbonato suficiente en la fermentación en una primera serie de condiciones de temperatura y presión elevadas para formar una sal carbonato parcialmente insoluble de un catión metálico divalente que libera el metal divalente del diácido. En una segunda parte, el método está basado en la formación simultánea de una sal amónica del diácido que es más soluble que la sal del metal divalente del diácido y mucho más soluble que la sal carbonato del metal divalente. La sal amónica disolverá las sales metálicas divalentes precipitadas de los diácidos. Las condiciones de temperatura y presión se rebajan luego a una segunda condición (típicamente son suficientes temperatura y presión estándar (STP), es decir 25°C, 101,35 kPa (14,7 psi)), con lo cual la sal carbonato del metal precipita cuantitativamente del medio dejando atrás una fracción solubilizada que contiene la sal amónica del diácido. La fracción solubilizada se separa de la fracción

precipitada por filtración u otros medios, y puede utilizarse directamente como material de alimentación reactivo para formar productos derivados de los diácidos C4.

5 Si bien los métodos son muy adecuados para los diácidos C4 (y únicamente éstos están de acuerdo con la invención) y la sal soluble es una sal de amonio, los métodos son aplicables también a la separación de cualquier ácido o diácido orgánico producido por fermentación utilizando una sal sustituto, donde pueden aplicarse unas primeras condiciones físicas tales como temperatura y presión de tal modo que (i) la sal carbonato del ion metálico divalente es menos soluble en un medio acuoso que la sal del diácido correspondiente del mismo catión metálico; (ii) 10 la sal sustituto del ácido o diácido es al menos 10 veces más soluble que la sal del metal divalente del diácido en las primeras condiciones; y (iii) la sal sustituto del diácido permanece soluble en una segunda serie de condiciones en las que la sal carbonato del catión metálico divalente es insoluble.

15 Cationes metálicos divalentes adecuados para el proceso incluyen cualquiera en donde la sal carbonato del mismo tenga una solubilidad en agua menor que 0,5 g por litro a 25°C y un pH de 2 a 4. En prácticas preferidas, el catión metálico divalente más adecuado es calcio o magnesio, cuyas sales carbonato tienen una solubilidad de aproximadamente 0,02 y 0,4 g/litro, respectivamente. Únicamente calcio está de acuerdo con la presente invención.

20 Otros cationes metálicos divalentes funcionales pueden incluir manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre y zinc. Otros cationes metálicos divalentes funcionales, pero menos adecuados, pueden incluir molibdeno, plata y cadmio. Se prefieren calcio y magnesio (no de acuerdo con la invención) debido a su abundancia y su idoneidad particular para uso en formas alcalinas como suplementos de control del pH en un medio de fermentación que se utiliza para producir el diácido en primer lugar. Además, las sales carbonato de calcio y magnesio (no de acuerdo con la invención) son alcalinas y/o pueden convertirse fácilmente en otras formas alcalinas para reutilización en el control del pH de la fermentación.

25 En prácticas típicas, la cantidad de catión metálico divalente recuperada del medio de fermentación es al menos 90% del catión metálico divalente que podría formar en caso contrario una sal del diácido mientras que la cantidad de sal amónica recuperada del diácido es al menos 90% de la cantidad de diácido presente en el medio de fermentación. La sal carbonato metálico recuperada puede convertirse subsiguientemente en un compuesto alcalino soluble del metal que puede reciclarse para uso continuado en el proceso de producción del diácido por introducción en un nuevo medio de fermentación para contrarrestar la disminución del pH que ocurre durante la producción del diácido.

35 En los métodos proporcionados en esta memoria, la separación de diácidos a partir de un medio de fermentación está basada, en parte, en el hecho de que en una primera condición en la que se infunde una fuente de carbonato en un medio acuoso a temperatura y presión elevadas, un catión metálico divalente, que en caso contrario podría formar una sal parcial o completamente insoluble del diácido, se compleja preferentemente con el carbonato para formar la sal carbonato del metal divalente, mientras que el diácido forma una sal de un catión sustituto que permanece soluble en el medio acuoso en la primera condición. Esta primera condición ocurre a una temperatura de 40 al menos 100°C y una presión de al menos 1480,28 kPa (200 psig). En una práctica ilustrativa, la temperatura era 120°C y la presión era 1480,28 a 1687,12 kPa (200-230 psig). Sin embargo, temperaturas superiores mejoran la solubilidad de las sales sustituto del diácido y de CO₂ sin aumentar sustancialmente la solubilidad del carbonato metálico divalente que se forma. En ciertas prácticas ilustrativas, se utilizó un intervalo de temperatura de 120°C-230°C y el carbonato se infundió por introducción de CO₂ a una presión de 1480,28 a 3548,70 kPa (200-500 psig).

45 En un paso, se introduce carbonato en un medio de fermentación que contiene el diácido. La manera más eficaz para introducir el carbonato es por infusión con CO₂ a una presión de al menos 1480,28 kPa (200 psig) a una temperatura de al menos 120°C. El carbonato puede introducirse también utilizando una suspensión de papilla de carbonato parcialmente solubilizada que se disolverá después por dilución en el medio o por el uso de una sal bicarbonato solubilizada a un pH que formará el carbonato. Por ejemplo, pueden utilizarse también soluciones de bicarbonato de magnesio o calcio o NH₄HCO₃, Na₂CO₃, o NaHCO₃ con el medio a un pH mayor que 6. La cantidad de carbonato a introducir debería ser al menos un equivalente molar de la cantidad de catión metálico divalente que está presente en el medio en el momento en que se desea recuperar los diácidos producidos. Más típicamente, la cantidad de carbonato debería estar comprendida entre uno y dos equivalentes molares de la cantidad de catión 50 metálico divalente.

55 A su vez, la cantidad de catión metálico divalente se basará en la cantidad de diácido producida, o que se espera producir, por el proceso de fermentación. Típicamente, la cantidad de catión metálico divalente debería ser aproximadamente medio equivalente hasta dos equivalentes molares de la cantidad de diácido producida o que se espera producir. En prácticas ilustrativas, la cantidad de catión metálico divalente utilizada era 1,2 a 1,6 equivalentes molares de la cantidad de diácido producida. Es preferible introducir el catión metálico divalente como una sal soluble, por ejemplo, como bicarbonato de calcio, o sulfato de magnesio. Únicamente las sales de calcio están de acuerdo con la invención. Sin embargo, algunas sales de cationes metálicos divalentes de calcio y magnesio, tales como carbonato de calcio, 60

carbonato de magnesio, e hidróxido de magnesio son sólo parcialmente solubles a pH neutro. Estos materiales pueden introducirse en el medio como una papilla parcialmente solubilizada en agua o como un material seco que se disolverá una vez diluido en el volumen mayor del medio de fermentación al pH apropiado.

5 Por ejemplo, en una práctica ilustrativa, cuando se utilizó $Mg(OH)_2$ (no de acuerdo con la invención) para controlar el pH de la fermentación a fin de producir ácido succínico a partir de *Actinobacillus succinogenes*, cuando el medio de fermentación comenzó a disminuir por debajo de pH 6,9, se añadió una papilla de $Mg(OH)_2$ para ajustar el pH siendo la cantidad total de magnesio añadida al final de la fermentación aproximadamente 1,6 equivalentes molares de la cantidad de succinato producida. En otras prácticas ilustrativas utilizando *Rhizopus oryzae* para producir primariamente fumarato a un pH óptimo de aproximadamente 5,8 o utilizando *Aspergillus oryzae* para producir primariamente malato a un pH óptimo comprendido entre 6 y 7, se añadió una papilla de $CaCO_3$ al medio de fermentación cuando el pH comenzó a disminuir por debajo de estos intervalos óptimos, siendo la cantidad total de calcio añadida al final de la fermentación aproximadamente 1,2 a 1,3 equivalentes molares de la cantidad de los diácidos totales producidos.

15 Dependiendo de la tolerancia del organismo productor del diácido a pH bajo, el catión metálico divalente puede introducirse en el medio antes, durante o después del proceso de fermentación que produce el diácido. En la presente invención, el caldo de fermentación que contiene el diácido C4 se pone en contacto con el compuesto de calcio para formar una sal de calcio del diácido.

20 Si el organismo productor del diácido tiene tolerancia elevada a pH bajo de tal modo que la producción del diácido no inhibe la fermentación por el microorganismo, el catión metálico divalente puede introducirse después que se ha completado la fermentación. En este caso, el catión metálico divalente puede introducirse en cualquier forma de sal adecuada o como un óxido. Formas de sal adecuadas incluyen las sales carbonato, bicarbonato, hidróxido o haluro del catión metálico divalente. Si el microorganismo productor del diácido es inhibido en el proceso de fermentación por el pH bajo, entonces el catión metálico divalente se introduce preferiblemente como un compuesto alcalino tal como en la forma de óxido o como la sal bicarbonato o carbonato, continua o intermitentemente, durante el proceso de fermentación para contrarrestar la disminución del pH como se ha mencionado arriba. Si el control del pH no es importante para el rendimiento de la fermentación, entonces el catión metálico divalente puede introducirse en cualquier momento antes, durante o después del proceso de fermentación y en cualquier forma de sal o forma alcalina.

Además de la infusión de carbonato en el medio, se introduce también amonio en el medio como el catión sustituto para la formación de la sal del diácido y se mantienen estas condiciones durante un tiempo suficiente para equilibrar la formación de la sal amónica soluble del diácido y la sal divalente del carbonato. Como se utiliza en esta memoria, "sal amónica del diácido" o simplemente "diácido amónico" significa al menos una de una sal monoamónica del diácido que tiene un grupo ácido libre y un grupo amonio, o una sal diamónica de ambos grupos ácidos. Es importante tener en cuenta que el tiempo para la equilibración incluye el tiempo necesario para redissolver las sales de cationes divalentes de los diácidos que se han formado previamente y que comienzan a precipitar del medio y para sustituir el diácido por el ion amonio que mantendrá la solubilidad en el mismo. En prácticas ilustrativas, las condiciones utilizadas para la formación del catión del metal divalente y la sustitución para producir la sal diamónica del diácido, eran una temperatura de al menos 100°C, una presión de al menos 1480,28 kPa (200 psig), y un pH de 8 a 11. En prácticas ilustrativas particulares, la temperatura era 120°C a 230°C, la presión era 1480,28 a 3548,70 kPa (200 psig a 500 psig), el pH era 8-9, y el tiempo para equilibración en estas condiciones era aproximadamente 2 horas.

45 En el método puede utilizarse amoniaco, o cualquier sal donante de amonio, con inclusión de sales de amonio orgánicas o inorgánicas. Por razones de posesión y derivatización del diácido subsiguientes, se prefiere utilizar una sal diamónica inorgánica, tal como hidróxido de amonio, sulfato de amonio o un haluro de amonio. Es muy preferible utilizar hidróxido de amonio a fin de no introducir ion alguno distinto de H^+ y OH^- , o introducir otros grupos funcionales químicamente reactivos tales como sulfato, si se desea llevar a cabo reacciones ulteriores en un solo reactor como se describe más adelante en esta memoria. La cantidad de sal diamónica dependerá de la cantidad de diácido en el medio recuperado y el tipo de sal diamónica deseado. Si se desea la sal monoamónica, la cantidad de amonio debería ser aproximadamente un equivalente molar de la cantidad de ácido. Si se desea la sal diamónica, la cantidad de amonio debería ser al menos dos equivalentes molares respecto a la cantidad de diácido presente. En prácticas ilustrativas para formación de las sales diamónicas de los diácidos, se utilizaron 3-4 equivalentes molares de hidróxido de amonio.

Después que se alcanza la equilibración en la primera condición, se quita la presión y la temperatura se rebaja a la temperatura ambiente, proporcionando una segunda condición en la cual la sal carbonato del metal divalente precipitará cuantitativamente del medio de fermentación, mientras que la sal diamónica permanece solubilizada. En el caso de calcio o magnesio (no de acuerdo con la invención) la segunda condición puede ser una temperatura al menos tan alta como la temperatura ambiente (25°C); sin embargo, dependiendo de la concentración de las sales, puede operarse también a temperaturas superiores con incubación prolongada. Podrán utilizarse también temperaturas inferiores a la temperatura ambiente, con tal que la temperatura no sea tan baja como para causar precipitación de la sal amónica del diácido, y con tal que no exista un exceso del catión metálico divalente con relación al amonio tal que ocurra también formación de más de 10% de la sal metálica del diácido en el caso de que

la temperatura sea tal que precipite también la sal metálica del diácido, disminuyendo la recuperación del diácido en la forma de la sal amónica soluble.

5 La sal carbonato del metal divalente precipitada se separa del medio de fermentación por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica tal como filtración o centrifugación. En ciertas realizaciones del método, la sal carbonato metálico separada se recupera y se reutiliza como tal, o se convierte en otra forma alcalina para uso reciclado en el proceso de fermentación. Por ejemplo, en una alternativa, puede añadirse directamente una papilla del carbonato de calcio recuperado a un nuevo medio de fermentación ácido que se disuelve en parte en bicarbonato de calcio para aumentar el pH. En otra alternativa, el carbonato de calcio recuperado puede disolverse primeramente en un ácido mineral formando directamente bicarbonato de calcio, que puede utilizarse también para ajustar el pH en forma de solución. En otra práctica adicional, el carbonato de calcio puede descomponerse en el compuesto óxido de calcio por calentamiento a una temperatura de 825°C o más alta, lo cual liberará CO₂ que puede capturarse de nuevo por compresión. La reacción análoga ocurre también con carbonato de magnesio (MgCO₃) que se descompondrá a MgO a temperaturas aún más bajas comprendidas en el intervalo de 250°C-800°C, siendo la temperatura típica para 100% de conversión aproximadamente 500°C-662°C. El óxido de calcio y el óxido de magnesio se convierten ambos en sus compuestos hidróxido respectivos cuando se disuelven en medio acuoso, proporcionando un compuesto alcalino alternativo que puede reciclarse al medio de fermentación para control del pH. Como otra práctica alternativa adicional, el carbonato de magnesio puede convertirse también en su bicarbonato soluble en agua Mg(HCO₃)₂ por tratamiento con ácido, y el bicarbonato alcalino utilizarse para ajustar el pH del medio de fermentación.

Si bien es muy deseable reciclar el compuesto alcalino divalente recuperado por el uso de tandas de fermentación subsiguientes, como otra opción, la sal carbonato del metal o sus derivados alcalinos pueden venderse para uso en otros procesos, tales como para la fabricación de materiales de construcción.

25 El filtrado o sobrenadante empobrecido en el carbonato metálico y que contiene la sal diamónica solubilizada del diácido se recupera también. Esta fracción que contiene diácido amónico puede utilizarse directamente para conversión ulterior en otros compuestos, por ejemplo, por las técnicas descritas más adelante en esta memoria, o el diácido libre o la sal amónica del diácido puede purificarse ulteriormente. Por ejemplo, el ácido libre puede generarse por acidificación del medio para formar el diácido libre. El diácido libre puede separarse luego fácilmente del ion amonio por cromatografía de intercambio iónico u otro proceso convencional de separación de iones tal como electrodesionización o electrodialisis. En una práctica, el filtrado recuperado se concentra por evaporación en un producto concentrado líquido o sólido que se utiliza directamente como material de alimentación reactivo para procesamiento ulterior.

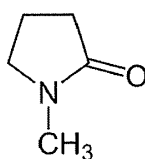
35 Se hace referencia a la Figura 1 que representa una realización ilustrativa de un proceso de fermentación para producción de uno o más de los diácidos C4 en donde se forma una sal amónica soluble de los diácidos con formación simultánea de un carbonato de calcio insoluble u otros derivados alcalinos óxido de calcio y/o bicarbonato de calcio que pueden reciclarse para controlar el pH de una fermentación en curso. Dependiendo del microorganismo, el pH debería mantenerse típicamente entre 5,5 y 7,5. Durante las primeras etapas de la fermentación 5 en un caldo de fermentación nutritivo, se produce una masa de células junto con los diácidos C4 libres, fumárico, málico y/o succínico. Los diácidos C4 libres rebajan el pH del medio de fermentación, lo que se contrarresta en el paso 10 por introducción de una o más de las formas alcalinas de compuestos oxidados de calcio - hidróxido de calcio, carbonato de calcio, óxido de calcio y/o bicarbonato de calcio. El compuesto oxidado de calcio introducido forma sales de calcio parcialmente insolubles de los diácidos C4. A la conclusión de la fermentación en el paso 15, se añade hidróxido de amonio al medio de fermentación junto con infusión de dióxido de carbono a una temperatura de al menos 100°C y una presión de al menos 1480,28 kPa (200 psig) formando inicialmente bicarbonato de calcio soluble y sales de amonio de los diácidos. En lugar de dióxido de carbono, el medio podría infundirse también con otra sal de bicarbonato, tal como bicarbonato de sodio, o más preferiblemente bicarbonato de amonio. La mezcla se deja incubar en las condiciones de temperatura y presión elevadas durante un tiempo suficiente para sustituir cuantitativamente por amonio las sales de calcio de los diácidos, con inclusión de la fracción parcialmente precipitada, y formar carbonato de calcio. En el paso 20, la mezcla se deja volver a las condiciones ambiente de temperatura y presión (v.g., STP), lo que da como resultado la formación cuantitativa de carbonato de calcio insoluble. En el paso 25, el carbonato de calcio precipitado se separa junto con la masa de células por filtración o centrifugación, y las sales de amonio solubles de los diácidos se recuperan, paso 40, en el filtrado o sobrenadante. En el paso 30a o 30b, el carbonato de calcio recuperado en el producto retenido o pélet, junto con la masa de células, se calienta a una temperatura y durante un tiempo suficientes para convertir la masa de células en ceniza. La ceniza de células contiene minerales traza que son suplementos útiles para promover nuevo crecimiento celular en el medio de fermentación.

60 En el paso alternativo 30a, utilizando una temperatura de aproximadamente 300°C durante aproximadamente 2 horas, la masa de células se convierte en una ceniza insoluble y el compuesto de calcio se encuentra en la forma de carbonato de calcio secado como materiales sólidos. En el paso alternativo 30b, utilizando una temperatura de al menos 825°C durante aproximadamente una hora, el carbonato de calcio se descompone en óxido de calcio sólido seco, con desprendimiento de óxido de carbono. Como una opción, en el paso 35 el carbonato de calcio o el óxido de calcio puede disolverse en un ácido mineral tal como HCl formando una solución de bicarbonato de calcio y

ceniza insoluble, que puede separarse en caso deseado por filtración. En el paso 45, cualquiera de los materiales oxidados de calcio recuperados, con o sin la ceniza, puede reciclarse para ajustar el pH de la fermentación en el paso 10. En una práctica ilustrativa para la producción de diácidos C4 mixtos (fumarato, malato, succinato) por fermentación con *Rhizopus oryzae*, se utilizó una papilla de carbonato de calcio como el compuesto de ajuste del pH en el paso 10.

Si bien se ilustra en la Figura 1 con compuestos oxidados de calcio, el proceso es esencialmente idéntico cuando se utilizan los compuestos análogos oxidados de magnesio, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, hidróxido de magnesio u óxido de magnesio (que forma hidróxido de magnesio en soluciones acuosas). En una práctica ilustrativa para producción primariamente de succinato por fermentación con *Actinobacillus succinogenes*, se utilizó una papilla de hidróxido de magnesio como el compuesto de ajuste del pH en el paso 10.

Reducción en un Solo Reactor de Diácidos de Amonio a partir del Medio de Fermentación. En un aspecto ulterior de esta descripción (no de acuerdo con la invención), las sales de amonio recuperadas de los diácidos C4 producidos en un medio de fermentación se utilizan como fuente alternativa para la producción del disolvente y reactivo ampliamente utilizado N-metil-2-pirrolidona (NMP).



NMP

NMP y sus derivados se utilizan como compuestos intermedios para la síntesis de productos agroquímicos, productos farmacéuticos, adyuvantes textiles, plastificantes, estabilizadores y tintas especiales. La misma se emplea también como precursor del nylon. La producción de NMP a partir del diácido de amonio es un proceso de 2,3 o 4 pasos dependiendo del resto diácido, todos los cuales pueden realizarse en una sola vasija de reacción sin purificación intercalada de los compuestos intermedios.

En el caso del succinato de amonio, la NMP se produce en un proceso de uno o dos pasos, que incluye combinar el succinato de amonio con un exceso molar de metanol e hidrógeno para formar una mezcla de reacción y calentar la mezcla de reacción a una temperatura de 200°C a 300°C, muy típicamente alrededor de 230°C, en presencia de un primer catalizador de hidrogenación durante un tiempo suficiente para formar inicialmente la diamida cíclica N-metil-succinamida (NMS, denominada también 1-metil-2,5-pirrolidinadiona). Con tiempos de incubación prolongados, la NMS se hidrogena ulteriormente a NMP de acuerdo con la secuencia de reacción ilustrada en la Figura 2. Los pasos de hidrogenación pueden realizarse en un solo paso utilizando un solo catalizador. Alternativamente, la reacción puede realizarse secuencialmente en un proceso de dos pasos, donde se utiliza un primer catalizador de hidrogenación en una primera serie de condiciones para producir NMS y se utiliza un segundo catalizador de hidrogenación en una segunda serie de condiciones de temperatura para producir la NMP.

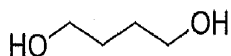
En el caso de fumarato (o maleato) de amonio se produce la NMP en un proceso de dos pasos que incluye un primer paso de hidrogenación con un primer catalizador de hidrogenación para reducir el enlace doble del fumarato antes de la introducción de metanol, seguido por un segundo paso de hidrogenación en presencia de un segundo catalizador de hidrogenación y metanol como se muestra en la Figura 3.

En el caso de malato de amonio, la NMP se produce en un proceso de tres pasos que incluye una deshidratación previa del grupo hidroxilo del malato por simple calentamiento del malato de amonio en solución acuosa a una temperatura de al menos 210°C, lo cual puede hacerse en ausencia de un catalizador de hidrogenación para formar fumarato de amonio en una secuencia representada por la Figura 4. Si bien la deshidratación inicial puede realizarse en ausencia del catalizador de hidrogenación, los catalizadores pueden incluirse opcionalmente en el paso de deshidratación inicial sin perjuicio para la secuencia de reacción.

Catalizadores adecuados para las reacciones de hidrogenación en cualquiera de los pasos anteriores incluyen, pero sin carácter limitante, níquel (v.g. níquel Raney, G49B disponible de Sud Chemie (Louisville, KY) que es níquel sobre tierra de diatomeas con un promotor de circonio), rutenio, v.g. Ru/C, que es rutenio sobre un sustrato de carbono), paladio como por ejemplo en forma de paladio sobre carbono (Pd/C), o cromito de cobre (Ru/C, Pd/C, Pt/C). Se prefiere utilizar un catalizador de rutenio y/o rodio para reacciones de hidrogenación con un solo catalizador. Cuando se utiliza níquel en una secuencia de hidrogenación multi-catalizador, el catalizador de níquel se emplea preferiblemente como el primer catalizador de las hidrogenaciones para la reducción de los ácidos C4 a succinato, utilizándose rutenio y/o rodio para las hidrogenaciones subsiguientes a fin de producir NMP en presencia de metanol. Las reacciones de hidrogenación requieren típicamente infusión en una atmósfera de H₂ a una presión de al menos 790,80 kPa (100 psig), muy típicamente entre 1480,28 y 3148,70 kPa (200 - 500 psig) y a temperaturas mayores que 100°C, típicamente entre 120 y 300°C durante un tiempo suficiente para hidrogenar (reducir) los enlaces pertinentes.

En una realización, las sales de amonio de los diácidos se utilizan como una fuente alternativa para la producción del disolvente y reactivo 1,4-butanodiol (BDO):

5



El BDO puede producirse por rutas alternativas, dependiendo del diácido C4 de partida.

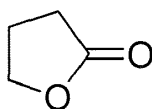
10 Cuando el material de partida es predominantemente fumarato de amonio y/o maleato de amonio, existen dos rutas para BDO, cada una de las cuales requiere separación de amonio de la sal. Una primera ruta incluye los pasos de (i) acidificación de la mezcla de reacción para formar el ácido libre y amonio, (ii) separación del amonio por intercambio iónico, electrodiálisis, electrodesionización u otra técnica adecuada de separación de iones; (iii) adición de metanol y un catalizador ácido o básico para formar el éster fumarato de dimetilo; y reducción del fumarato de dimetilo a BDO por hidrogenación en presencia de un catalizador de hidrogenación adecuado como se ilustra en la Figura 5A. Catalizadores ácidos o básicos adecuados incluyen ácidos minerales homogéneos simples tales como H₂SO₄, HCl, y bases minerales tales como NaOH, o un catalizador heterogéneo fuertemente ácido o fuertemente básico tal como resinas cambiadoras de iones ácidos sulfatadas o fosfatadas, o resinas cambiadoras de iones básicos que tienen grupos funcionales amino o metoxi. Condiciones ilustrativas para la reacción de esterificación son calentamiento a reflujo del fumarato de amonio en ácido sulfúrico al 10% durante aproximadamente una hora. Catalizadores de hidrogenación y condiciones adecuadas para la conversión del diéster en BDO son los mismos que se han mencionado anteriormente en esta memoria con respecto a las reacciones de hidrogenación para producir NMP. Catalizadores de hidrogenación y condiciones adecuados para la conversión del diéster en BDO son los mismos que se han mencionado anteriormente en esta memoria con respecto a las reacciones de hidrogenación para producir NMP. Los catalizadores preferidos para hidrogenación son Ni, Re, Rh, Ru, Pd, y Au.

Una segunda ruta para la síntesis de BDO cuando el material de partida es eminentemente fumarato de amonio y/o maleato de amonio consiste en realizar simultáneamente la separación por intercambio aniónico del ion amonio y la esterificación con metilo del fumarato por puesta en contacto del fumarato de amonio con una resina de intercambio de iones ácidos en una columna en presencia de metanol como se ilustra en la Figura 5B. En este caso, la columna funcionará en parte como una columna de intercambio de iones que retiene preferentemente el amonio en una porción de la funcionalidad ácida, mientras que los restos de las porciones de grupos ácidos actúan como catalizador para esterificar el fumarato al metanol. El éster fumarato de dimetilo que se eluye de la columna se somete luego a reducción en presencia de H₂, calor y un catalizador de hidrogenación metálico para producir BDO como en la primera ruta.

Por supuesto, BDO puede sintetizarse también a partir de malato de amonio utilizando las mismas dos rutas arriba mencionadas, excepto que antes de la separación de amonio o contacto con metanol, el malato se convierte en fumarato por deshidratación catalizada por calor como se ha mencionado anteriormente en esta memoria para la producción de NMP.

La tercera ruta para síntesis de BDO puede utilizarse cuando el diácido C4 es fundamentalmente succinato de amonio. En este caso, no hay necesidad alguna de esterificar el diácido en el derivado dimetil-éster. En lugar de ello, se añade un ácido mineral en cantidades suficientes para formar ácido succínico libre, y el amonio se sustituye con H⁺ por intercambio iónico, electrodiálisis, electrodesionización otro paso adecuado de separación de iones, y el ácido succínico se somete directamente a hidrogenación reductiva en presencia de hidrógeno con un catalizador de paladio y/o rutenio para formar BDO como se ilustra en la Figura 5C. Condiciones para la reducción directa del diácido al diol son las mismas que se requieren para reducción del diéster metílico al diol.

50 En otras realizaciones, puede producirse también directamente butirolactona (GBL) a partir del succinato de amonio:



GBL

La ruta para producción de GBL se ilustra en la Figura 6. Como en el caso de la producción de BOD, se añade un ácido mineral en cantidades suficientes para formar ácido succínico libre, y el amonio puede separarse opcionalmente por intercambio iónico u otra técnica adecuada. El ácido succínico libre se reduce a GBL por hidrogenación en presencia de un catalizador paladio/Al₂O₃, que puede ser paladio sobre carbono en presencia de Al₂O₃ o paladio sobre un soporte de Al₂O₃. Un disolvente adecuado es dioxano, y una temperatura adecuada es aproximadamente 280°C durante 4 horas a una presión de alrededor de 6 MPa (60 bar).

60

La Figura 7 resume un proceso integrado de fermentación para producción de diácidos C4, conversión de las sales divalentes de los mismos en sales de amonio, y reacciones de hidrogenación subsiguientes para producir una diversidad de derivados reducidos. Los pasos 5-30 de la Figura 1 representados en la parte superior derecha de la Figura 7 se realizan en el proceso de fermentación, dando como resultado la recuperación de un filtrado de diácidos de amonio solubilizados 50 en solución acuosa. El filtrado recuperado puede utilizarse directamente, o puede concentrarse opcionalmente por evaporación. Si la fermentación produce preferencialmente malato, como en el caso de *A. oryzae*, entonces, en el paso 55 puede utilizarse catálisis heterogénea con ácido o catálisis homogénea con ácido o base para deshidratar el malato a fumarato con separación del amonio seguida por esterificación del fumarato para formar fumarato de dimetilo 60. El fumarato de dimetilo puede ponerse luego en contacto con un catalizador de hidrogenación en presencia de H₂ para formar BDO. En un procedimiento alternativo para producción de BDO, las sales amónicas mixtas de los diácidos pueden hidrogenarse sobre un primer catalizador para convertir todas ellas en succinato diamonio-succínico, e intercambiar el amonio con hidrógeno por adición de un ácido. El succinato puede hidrogenarse ulteriormente para formar BDO con o sin separación del amonio. La hidrogenación en dos pasos puede realizarse en un solo reactor utilizando un solo catalizador, o puede utilizarse un catalizador diferente para las hidrogenaciones primera y segunda en la secuencia de reacción. En una realización para producir NMP (no de acuerdo con la invención), el ácido diamonio-succínico formado en el caldo de fermentación puede mezclarse con metanol y un catalizador de hidrogenación para formar NMS y luego NMP en una secuencia de reacción de dos pasos que requiere la presencia del ion amonio. La secuencia de reacción de dos pasos puede realizarse en un solo reactor con un solo catalizador de hidrogenación, o pueden utilizarse catalizadores de hidrogenación diferentes en los pasos primero y segundo en la secuencia de reacción. En una realización para producción de GBL, similar a la producción de BDO, el succinato de amonio se convierte en succinato por intercambio iónico con un ion hidrógeno, y el succinato se hidrogena sobre un catalizador de paladio para dar GBL.

Los Ejemplos que siguen se proporcionan a fin de ilustrar diversos aspectos de la invención.

Ejemplo 1

Separación de malato de amonio y carbonato de calcio a partir de malato de calcio (muestra diluida)

Una mezcla de 7,01 g (0,04 mol) de malato de calcio y 20 mL de NH₄OH (28%) en 150 mL de agua se presurizó a 500 psi de CO₂ a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas mientras se incubaba a 120°C. Después de la reacción, se liberó el gas y la mezcla se enfrió a la temperatura ambiente, formándose un precipitado sólido blanco de carbonato de calcio (5,64 g), que se recogió por filtración y se secó. El filtrado directo se evaporó a vacío para obtener un producto aceitoso, que era malato de amonio (6,11 g). El rendimiento de malato de amonio fue 93%, basado en el malato de calcio.

Ejemplo 2

Separación de malato de diamonio y carbonato de calcio a partir de malato de calcio (muestra concentrada)

Una muestra de 20,28 g (0,12 mol) de malato de calcio se mezcló con 30 mL of NH₄OH (28%) en 200 ml de agua y se cargó a 60 psi de CO₂ a la temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 2 horas mientras se incubaba a 120°C y alcanzó una presión 180 psi. Después de la reacción, se liberó el gas y la mezcla se enfrió a la temperatura ambiente, separándose por filtración el sólido blanco. El filtrado directo se evaporó a vacío para obtener un producto aceitoso, que se determinó era malato de amonio (21,76 g). La torta del filtro era carbonato de calcio (11,27 g). El rendimiento de malato de amonio fue %, basado en la entrada de malato de calcio.

Ejemplo 3

Recuperación de sales diamónicas de diácidos a partir de un medio de fermentación

Un caldo de fermentación clarificado de 502,82 g obtenido por cultivo de una cepa de *Rhizopus oryzae* en glucosa para producir una mezcla de ácidos fumárico, succínico y maleico se mezcló con 35 ml de NH₄OH (28 %), y se presurizó a 500 psi de CO₂ a la temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 2 horas mientras se incubaba a 120°C. Después de la reacción, se liberó el gas y la mezcla se enfrió a la temperatura ambiente, después de lo cual se recogió por filtración el precipitado sólido blanco formado (44,87 g), determinándose que era fundamentalmente CaCO₃ y contenía 0,5% de ácido málico libre y 0,8% de ácido fumárico libre. El filtrado directo se evaporó a vacío para obtener 54,368 de un producto sólido de color pardo claro, que se determinó era una mezcla de sales de amonio, que incluía 65,6% de fumarato de amonio, 18% de malato de amonio y 15,8% de succinato de diamonio (DAS).

Ejemplo 4 (formación de NMP, no de acuerdo con la invención)

Separación en un solo reactor de carbonato de calcio, formación de diácidos C4 de amonio mixtos, reducción a succinato y formación de NMP

Se obtuvo un caldo entero obtenido por fermentación de glucosa para formar diácidos C4 por *Rhizopus* de acuerdo con el Ejemplo 6. El caldo entero contenía sales de calcio del diácido, glucosa no consumida, biomasa de células y subproductos de fermentación tales como glicerol y ácido acético. Basándose en los resultados analíticos, el caldo entero contenía 46,9 g/kg de ácido fumárico, 19,2 g/kg de ácido málico y 3,3 g/kg de ácido succínico (calculados como ácidos libres, aunque estaban presentes en la forma de sales de calcio en el caldo).

El caldo entero (393,87 g) se trató por adición de 73 ml de NH₄OH (28% e infusión con CO₂ a 200 psi a una temperatura de 80°C durante 2 horas. Se añadió un catalizador de níquel en la forma de níquel Raney o un catalizador de paladio sobre carbono (Pd/C) a ciertas muestras del caldo amónico tratado y carbonatado como se indica en la Tabla siguiente, calentándose luego las muestras a una temperatura de 120°C a una presión de 500 psig de H₂ y agitando durante un periodo de una hora. Una muestra no contenía catalizador alguno. Se calentaron ulteriormente 2 muestras a una temperatura de 230°C y se agitaron durante 2 horas más. En una de las muestras de 230°C se añadieron también 18 ml de metanol a la mezcla de hidrogenación. El calentamiento del caldo entero en estas condiciones influyó también en un paso de destrucción sobre la biomasa de *Rhizopus* que desactivó los procesos biológicos posteriores.

La temperatura se redujo a la temperatura ambiente durante un periodo de 2 horas, y el material sólido suspendido, constituido por la sal carbonato de calcio y biomasa de células se recogió por filtración, después de lo cual se recuperó el filtrado que contenía las sales diamónicas de los diácidos disueltas y se analizó, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1

Temperatura	Caldo de fermentación (g)	Malato (g/l)	Diamónico	Fumarato (g/l)	Diamónico	Succinato (g/l)	Diamónico
120	460,86	11,52		0,01		23,59	
230**	393,87	0,47		0,32		16,20	
230*	379,00	0,60		0,14		18,22	
120	463,00	8,28		0,79		37,67	

*Se añadió metanol al caldo, y el catalizador era Ni.
** El catalizador era Pd/C

Basándose en el contenido del caldo de partida, los resultados indicaban que incluso en ausencia de un catalizador y a la temperatura relativamente baja de 120°C, más del 98% del fumarato y al menos 60% del malato contenido en el medio se convertía en succinato diamónico. En presencia de cualquier catalizador metálico a una temperatura de 230°C, al menos 95% de la fracción combinada de malato y fumarato se convertía en succinato diamónico. En presencia de metanol a 230°C una porción sustancial de diácidos se reducía ulteriormente a NMS y NMP como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Temperatura	Ácido málico	Ácido succínico	Ácido fumárico	NMP	NMS
230	0,074	3,16	0,007	12,5	10,4
g/kg					

Ejemplo 5 (formación de NMP, no de acuerdo con la invención)

Conversión en un solo reactor de diácidos C4 amónicos en NMP

Se obtuvo un caldo evaporado procedente de una fermentación con *Actinobacillus succinogenes* para producir diácidos C4 que se convirtieron en sales amónicas de diácidos a partir de sales de calcio. El caldo evaporado, que contenía 64% de succinato de amonio, 25,4% de ácido málico, y 10,3% de glicerol se mezcló con 2,32 g de níquel Raney y 25 ml de metanol en 200 ml de agua y se calentó a 280°C en un reactor de autoclave provisto con controladores de temperatura y presión. Se separó el aire por borboteo de hidrógeno 3 veces a través de un tubo de inmersión, y el hidrógeno se cargó a 400 psig a la temperatura ambiente. La mezcla se calentó a 280°C durante 2 horas, durante cuyo tiempo se consumió algo de hidrógeno. La mezcla se agitó durante 6 horas más a 280°C con la presión de H₂ a 1200 psig. Después de ello, el reactor se enfrió a la temperatura ambiente y se liberó el hidrógeno residual. Se separó el catalizador por filtración, y el filtrado recuperado se evaporó a vacío para obtener un material sólido blanco que se analizó, encontrándose que contenía 10,36 g/kg de NMS, 12,45 g/kg de NMP, y 3,16 g/kg de succinato diamónico.

Ejemplo 6

Medios de fermentación, condiciones y rendimientos de diácidos C4 a partir de *Actinobacillus succinogenes*, *Rhizopus oryzae*, y *Aspergillus oryzae*

- 5 A. Para *Actinobacillus succinogenes*, la cepa se obtuvo del Michigan Biotechnology Institute (Lansing, MI). El medio contenía, en g/litro:

Licor de maceración de maíz	20
Betaina	0,5
Ácido glutámico	0,5
Biotina	0,0002
Tampón de fosfato de sodio (0,5M)	7,0 ml/l
Na ₂ CO ₃ (solución al 20%)	2,6 ml/l
Dextrosa	137,5

- 10 A lo largo del curso de la fermentación, el pH se ajustó con Mg(OH) totalizando 87,5 g/l. Los parámetros del cultivo de fermentación eran:

pH	6,9
Temperatura	38C
Agitación	250 rpm
CO ₂	0,025 vvm

Los subproductos principales de la fermentación fueron:

Glicerol	<1 g/l
Acetato	0-3g/l
Etanol	< 1g/l
Piruvato	1-5 g/l

- 15 El título, el rendimiento y la productividad final de diácidos C4 fueron:

	Ácido succínico únicamente
Título (g/l)	100g/l
Rendimiento a partir de dextrosa	90%
Productividad	2,0 g/l/hora

B. Para *Rhizopus oryzae*, la cepa se obtuvo de Archer Daniels Midland Company, Decatur Illinois. El medio contenía, en g/l:

Licor de maceración de maíz	0,19 (base de sólidos secos)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,35
KH ₂ PO ₄	0,225
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,30
Solución de metales traza	7,5ml

- 20 Compuestos de:

ZnSO ₄ *7H ₂ O	4,4 g
FeCl ₃ *6H ₂ O	0,75 g
Ácido tartárico	0,75 g
dH ₂ O	1000 ml

A lo largo del curso de la fermentación, el pH se ajustó con una papilla de CaCO₃ que totalizaba 90 g/l. Los parámetros del cultivo de fermentación eran:

ES 2 717 873 T3

pH	5,8
Temperatura	34°C
Agitación	200-500 rpm
Aireación	0,05 vvm

Los subproductos principales de la fermentación fueron:

Glicerol	10-25 g/l
Ácido acético	<1 g/l
Etanol	1-10 g/l
Ácido 2-cetoglutarico	1-5g/l

El título, el rendimiento y la productividad final de diácidos C4 fueron:

	Fumárico	Málico	Succínico
Título (g/l)	30-50	5-30	2-10
Rendimiento a partir de dextrosa	57%		
Productividad	1,81 g/l/hora		

5

C. Para *Aspergillus oryzae*, la cepa se obtuvo de Novozymes (Washington, DC). El medio contenía, en g/l:

Peptona Bacto	9
KH ₂ PO ₄	0,15
K ₂ HPO ₄	0,15
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1
CaCl ₂	0,1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,005
NaCl	0,005
Solución stock de biotina (5mM)	1,0 ml
Pluronic L61	0,5 ml
Dextrosa	198

10 A lo largo del curso de la fermentación, el pH se ajustó con CaCO₃ que totalizaba 120 g/l. Los parámetros del cultivo de fermentación fueron:

pH	6 - 7
Temperatura	34°C
Agitación	300-700 rpm
Aireación	1,0 vvm

Los subproductos principales de la fermentación fueron:

Glicerol	<1g/l
Acetato	0<1g/l
Etanol	0-2 g/l
Ácido cítrico	1-4 g/l

15 El título, el rendimiento y la productividad final de diácidos C4 fueron:

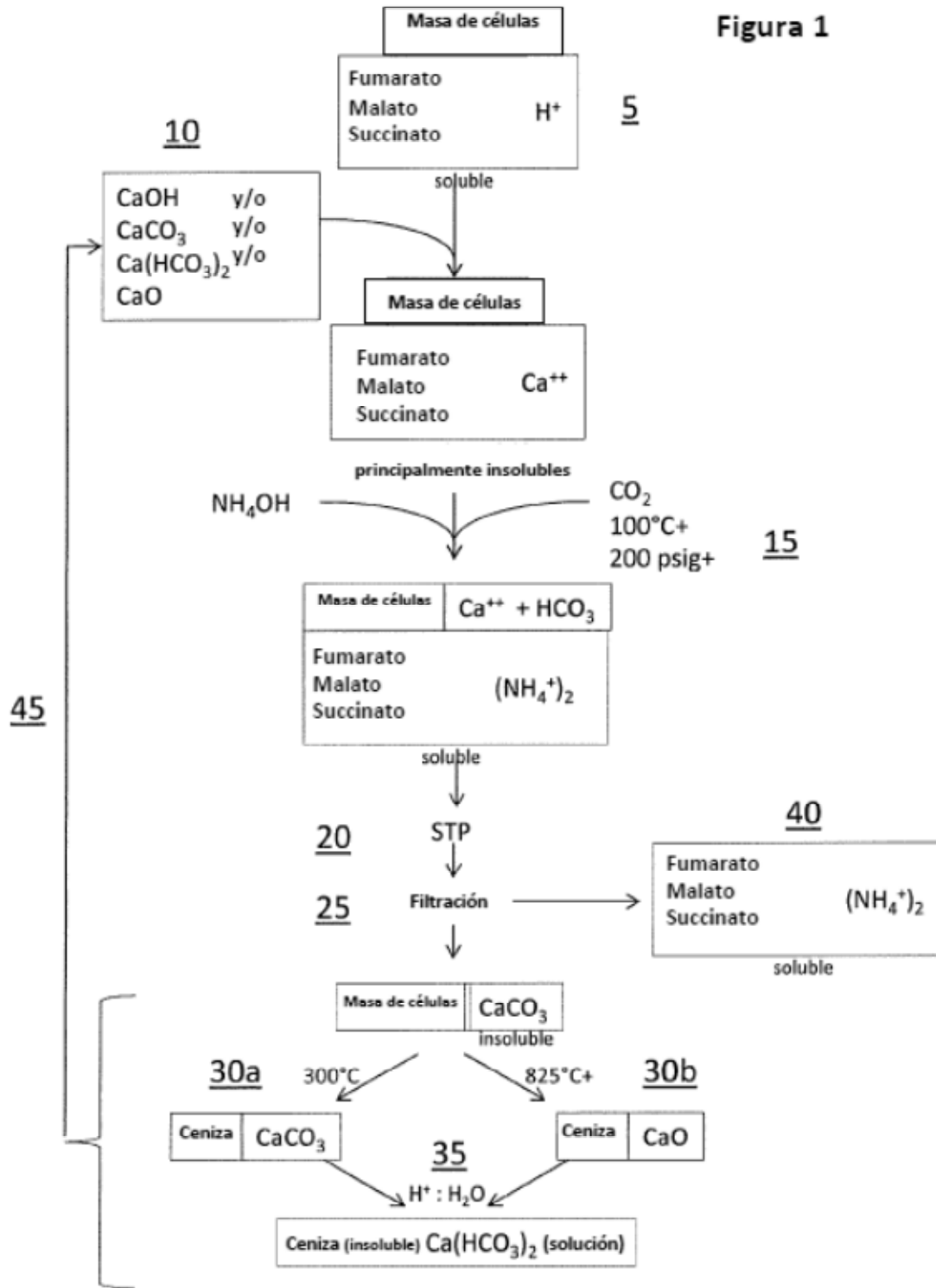
	Málico	Succínico
Título (g/litro)	141,5	11,2
Rendimiento a partir de dextrosa	80%	7%
Productividad (g/l/hora)	1,11	0,9

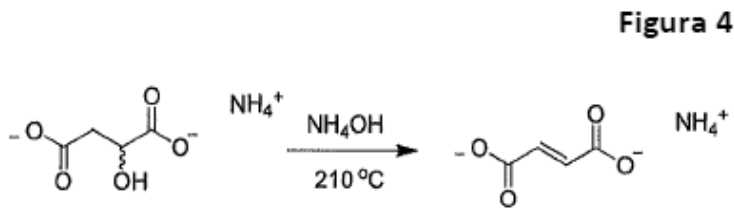
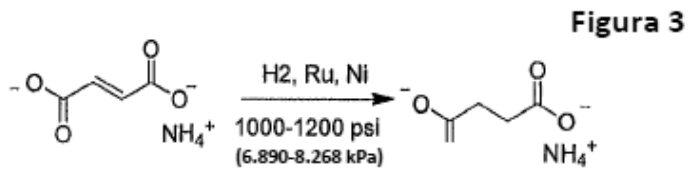
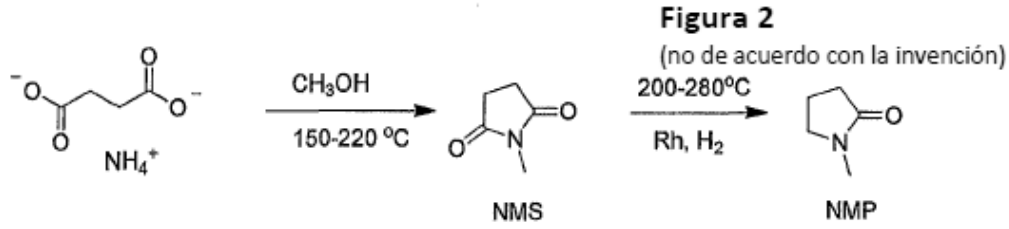
REIVINDICACIONES

- 1 . Un método de producción de compuestos derivados de ácidos C4, que comprende,
- 5 obtener un caldo de fermentación clarificado a partir del cultivo de un microorganismo para producir al menos una sal diamónica de un diácido C4 seleccionado del grupo constituido por ácido succínico, málico, maleico y fumárico y en donde el caldo de fermentación clarificado que contiene la sal diamónica de un diácido C4 se obtiene por
- 10 - cultivo de un microorganismo en un medio de fermentación para producir un caldo de fermentación que contiene el diácido C4;
- puesta en contacto del caldo de fermentación que contiene el diácido C4 con un compuesto de calcio para formar una sal de calcio del diácido;
- 15 - puesta en contacto del caldo de fermentación con una fuente de amonio y con una fuente de carbonato en una primera condición que incluye una temperatura de al menos 100°C y una presión de al menos 1480,28 kPa [200 psig] durante un tiempo suficiente para formar una sal carbonato de al menos 90% del calcio y una sal diamónica de al menos 90% del diácido C4 en el caldo de fermentación;
- 20 - reducción de la temperatura y la presión del caldo de fermentación contactado a una segunda condición eficaz para formar un precipitado de la sal carbonato del ácido en tanto que se mantiene la sal diamónica del diácido en solución; y
- separación de la sal carbonato de calcio precipitada y la masa de células en el caldo de fermentación de la solución de la sal amónica del diácido para formar el caldo de fermentación clarificado que contiene la sal amónica de un diácido C4; y
- 25
- puesta en contacto del caldo de fermentación clarificado que contiene la sal diamónica del diácido C4 con un
- 30 catalizador de hidrogenación y H2 en una mezcla de reacción en condiciones de temperatura, presión y tiempo suficientes para hidrogenar la sal diamónica del diácido C4 a fin de formar un compuesto derivado seleccionado del grupo constituido por gamma-butirolactona (GBL) y 1,4-butano-diol (BDO).
2. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto derivado es GBL; los diácidos C4 en el caldo de fermentación comprenden principalmente succinato o se reducen a ácido succínico durante la hidrogenación; se incluye un disolvente dioxano en la mezcla de reacción de hidrogenación; y el catalizador de hidrogenación para la formación de la GBL comprende paladio y Al₂O₃.
- 35
3. El método de la reivindicación 1 en donde la sal amónica del diácido C4 en el caldo de fermentación clarificado es principalmente malato de amonio, y el caldo de fermentación clarificado se pone en contacto con un catalizador ácido a una temperatura suficiente para deshidratar el malato a fumarato en la mezcla de reacción.
- 40
4. El método de la reivindicación 1 en donde el diácido C4 es fundamentalmente al menos uno de fumarato amónico y malato amónico y que incluye pasos en los que:
- 45 el caldo de fermentación clarificado se pone en contacto con un catalizador ácido y metanol, formando un compuesto intermedio seleccionado del grupo constituido por fumarato de dimetilo y/o malato de dimetilo; y se separa amonio del fumarato de dimetilo y/o malato de dimetilo antes de la puesta en contacto con el catalizador de hidrogenación; y el compuesto derivado de C4 es BDO.
- 50
5. El método de la reivindicación 4, en donde el catalizador ácido es un ácido homogéneo.
6. El método de la reivindicación 4, en donde el catalizador ácido es una resina ácida heterogénea.
- 55
7. El método de la reivindicación 1, en donde la sal amónica del diácido C4 en el caldo de fermentación clarificado es principalmente succinato amónico, el amonio se separa del caldo de fermentación clarificado formando ácido succínico libre antes de la puesta en contacto con el catalizador de hidrogenación, y el compuesto derivado es BDO.
- 60
8. El método de la reivindicación 1, en donde el catalizador de hidrogenaciones un compuesto que comprende al menos uno de níquel, rutenio, rodio, paladio, platino y cromito de cobre.
9. El método de la reivindicación 8, en donde la sal diamónica de los diácidos C4 en el caldo de fermentación clarificado es principalmente al menos uno de fumarato de amonio y malato de amonio, y la puesta en contacto con el catalizador de hidrogenación incluye poner en contacto con un primer catalizador que comprende níquel y un segundo catalizador que comprende al menos uno de rutenio, rodio y paladio.
- 65

10. El método de la reivindicación 9, en donde el contacto con el primer catalizador se realiza antes del contacto con el segundo catalizador.
- 5 11. El método de la reivindicación 1 en donde la sal diamónica de los diácidos C4 en el caldo de fermentación clarificado es principalmente al menos una de fumarato amónico y malato amónico, y el contacto con el catalizador de hidrogenación e hidrógeno incluye: (i) un primer paso de hidrogenación en donde el contacto tiene lugar durante un tiempo suficiente para hidrogenar el fumarato y/o malato a fin de formar succinato; (ii) un paso intermedio en donde el amonio se reemplaza con hidrógeno formando ácido succínico libre, y (iii) un segundo paso de hidrogenación en donde el contacto tiene lugar durante un tiempo suficiente para formar BDO a partir del ácido succínico.
- 10
12. El método de la reivindicación 11, en donde el paso intermedio se selecciona del grupo constituido por cromatografía de intercambio iónico, electrodiálisis, y electrodesionización.
- 15
13. El método de la reivindicación 1, en donde el diácido C4 es principalmente al menos uno de fumarato amónico y malato amónico; el caldo de fermentación clarificado se pone en contacto con un catalizador ácido y metanol, formando al menos uno de fumarato de dimetilo y malato de dimetilo, y antes de la puesta en contacto con el catalizador de hidrogenación se incluye un paso intermedio en donde se separa amonio de la mezcla de reacción; y en donde el contacto con el catalizador de hidrogenación tiene lugar durante un tiempo suficiente para formar BDO a partir de al menos uno del fumarato de dimetilo y malato de dimetilo.
- 20
14. El método de la reivindicación 13, en donde el paso intermedio se selecciona del grupo constituido por cromatografía de intercambio iónico, electrodiálisis, y electrodesionización.
- 25
15. El método de la reivindicación 1, en donde la fuente de amonio comprende NH_4OH .
16. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto de calcio se encuentra en una forma seleccionada del grupo constituido por un óxido, un hidróxido, un carbonato y un bicarbonato del calcio.
- 30
17. El método de la reivindicación 16, en donde el compuesto de calcio se introduce en el medio de fermentación para mantener el pH del medio de fermentación entre un pH de 5,5 y 7,5 durante un periodo de producción del diácido C4 por el microorganismo.
- 35
18. El método de la reivindicación 17, en donde el compuesto de calcio se obtiene por separación de una sal carbonato de calcio precipitada a partir de un segundo medio de fermentación utilizado para producir el diácido C4.

Figura 1





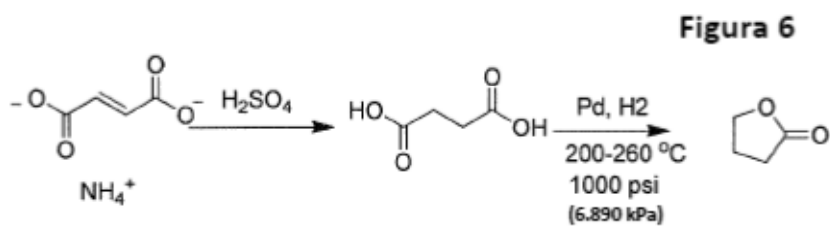
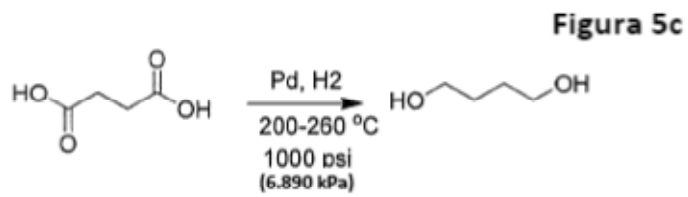
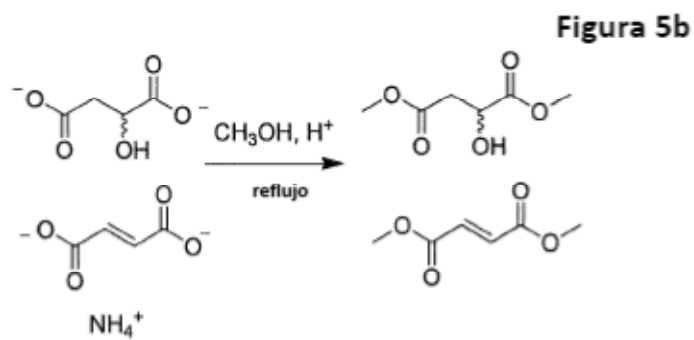
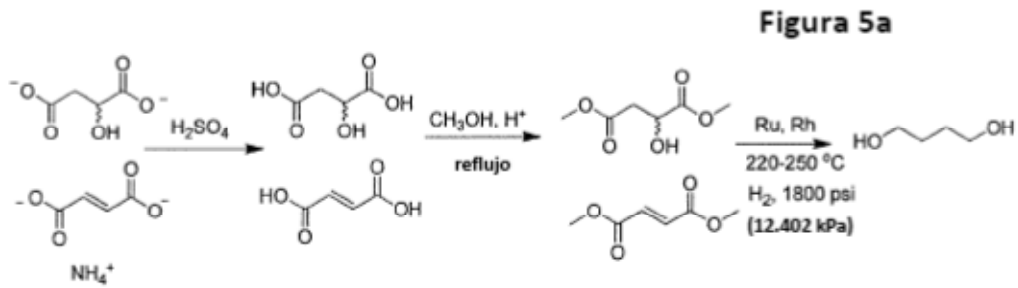


Figura 7

