

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 077**

51 Int. Cl.:

**C07C 227/08** (2006.01)

**C07C 229/08** (2006.01)

**C07C 51/363** (2006.01)

**C07C 53/16** (2006.01)

**C07C 53/19** (2006.01)

**C12P 7/52** (2006.01)

**C12P 7/54** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2016** **PCT/FR2016/050364**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016** **WO16135397**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2016** **E 16709991 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019** **EP 3262024**

54 Título: **Procedimiento de producción de aminoácidos a partir de precursores obtenidos por fermentación anaerobia de biomasa fermentable**

30 Prioridad:

**27.02.2015 FR 1551673**

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

**13.11.2019**

73 Titular/es:

**AFYREN (100.0%)  
Biopôle Clermont Limagne  
63360 Saint-Beauzire, FR**

72 Inventor/es:

**NOUAILLE, RÉGIS;  
PESSIOT, JÉRÉMY y  
THIEULIN, MARIE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 731 077 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de aminoácidos a partir de precursores obtenidos por fermentación anaerobia de biomasa fermentable

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de aminoácidos a partir de precursores obtenidos por fermentación anaerobia de biomasa fermentable.

10 Los aminoácidos son los componentes constitutivos de los péptidos y, por lo tanto, de las proteínas. Se utilizan, entre otras cosas, como aditivos en alimentación animal (por ejemplo, lisina, metionina o treonina), como potenciadores de sabor en la alimentación humana tales como el glutamato, la serina o el ácido aspártico, como nutrientes específicos en el campo médico o incluso en el campo cosmético. De igual manera, se puede mencionar la glicina, la alanina, la norvalina y la norleucina como aminoácidos que tienen aplicaciones en el campo de la farmacopea, cosmética y química industrial.

15 Se conoce la producción de aminoácidos mediante síntesis química o mediante conversión con la ayuda de enzimas. Por ejemplo, *H.H. Sisler et al., J. Org. Chem. 6(4) 1941, p. 467 – 478* y *W.H. Perkin et al., Justus Liebigs Ann. der Chemie, 108(1), 1958, p. 106 – 113* describen la preparación de aminoácidos a partir de un ácido  $\alpha$ -halogenado.

Aunque tales procedimientos son fácilmente adaptables y permiten un control óptimo de los parámetros de producción, son complejos y caros de implementar.

20 Con el fin de minimizar los costes de producción, existen, por ejemplo, procedimientos de obtención de aminoácidos por vía microbiana. Los aminoácidos son metabolitos primarios producidos por microorganismos durante un procedimiento de fermentación. Aunque tales procedimientos permiten producir grandes cantidades de aminoácidos directamente asimilables por el organismo, el hecho es que este tipo de procedimiento se ocupa de un solo tipo de aminoácido.

25 La invención tiene por objeto más particularmente solucionar estos inconvenientes proponiendo un procedimiento de producción de aminoácidos que permite producir diversos tipos de aminoácidos, especialmente no proteinoogénicos, de manera fácil y sin las limitaciones asociadas a los modos de producción conocidos del estado de la técnica.

Con este fin, la invención tiene por objeto un procedimiento de producción de aminoácidos a partir de moléculas de ácidos grasos volátiles (AGV), denominados precursores, producidos por fermentación anaerobia a partir de biomasa fermentable, caracterizado porque comprende al menos las siguientes etapas:

- 30 - a) extraer las moléculas de ácidos grasos volátiles (AGV), sin interrupción de la fermentación, por un medio de extracción seleccionado entre los medios que son, al menos, insolubles en el medio de fermentación,
- b) recoger, fuera del reactor de fermentación, las moléculas de ácidos grasos volátiles (AGV) una vez extraídas,
- 35 - c) sintetizar, mediante halogenación, a partir de un tipo de ácido graso volátil (AGV) seleccionado entre los ácidos grasos volátiles recogidos en la etapa b) y definido según el tipo de aminoácido deseado, un ácido  $\alpha$ -halogenado dado,
- d) sintetizar a partir de este ácido  $\alpha$ -halogenado un aminoácido definido.

40 Por lo tanto, tal procedimiento permite acoplar una fase de producción continua de precursores por los microorganismos con una fase de síntesis realizada sin fermentación, lo que permite un fácil control de los diferentes parámetros, al mismo tiempo que permite una mayor variabilidad en el tipo de aminoácidos producidos.

Tal procedimiento permite disponer, en forma continua, de precursores, es decir, ácidos grasos volátiles, mientras se mantiene la capacidad de producción de los microorganismos presentes en el biorreactor.

45 De hecho, las etapas a) y b) de extracción y recogida permiten no solo extraer y recoger de manera continua las moléculas de ácidos grasos volátiles producidas en el reactor de fermentación, sino también conservar a los microorganismos responsables de esta producción. En efecto, la extracción, y de hecho la recogida, se realiza en condiciones al menos no letales para la totalidad de los microorganismos, es decir, en condiciones de extracción y recogida biocompatibles, debido a que la extracción mantiene la actividad de los microorganismos y a que la recogida se realiza fuera del reactor de fermentación.

De esta manera, se superan los problemas asociados con la acumulación de metabolitos en el reactor de fermentación, por ejemplo, la acidificación del medio de fermentación por la acumulación de los ácidos grasos volátiles producidos que son dañinos para los microorganismos. La cantidad y la actividad de los microorganismos se mantienen a un nivel alto, cercano al inicial, a lo largo del ciclo de fermentación.

5 Al tener una producción continua y regular de AGV, se tiene una fuente de precursores variados que se pueden utilizar fácilmente y de manera rápida. En el procedimiento objeto de la invención, esta utilización se realiza a partir de la etapa c), por síntesis química y, por lo tanto, en condiciones fácilmente controlables y modificables, lo que proporciona además una variabilidad grande en el tipo de moléculas sintetizadas. En efecto, durante la etapa c), según el AGV retenido para realizar la halogenación, se obtiene un tipo dado de ácido  $\alpha$ -halogenado y, por lo tanto, luego se obtiene un tipo dado de  $\alpha$ -aminoácido.

10 Tal procedimiento permite, durante la fase de fermentación anaerobia utilizar la biomasa fermentable. Por biomasa fermentable, se designa en la presente memoria un sustrato orgánico, ventajosamente no alimentario, obtenido a partir de desechos, sub-productos y co-productos formados de materias orgánicas, es decir, de biomasa, procedente de actividades humanas, ya sean domésticas, industriales, agrícolas, forestales, de acuicultura, agroindustriales, de la ganadería u otros. A modo de ejemplo no limitante, se pueden mencionar como sustrato orgánico el estiércol, la fracción fermentable de los residuos domésticos, los co-productos de mataderos, los residuos de celulosa o ligno-celulósicos procedentes de la agroindustria, tales como los de la transformación de la caña de azúcar (bagazo), del girasol o de la soja.

15 Por fermentación anaerobia se entiende una fermentación realizada en condiciones anaerobias por microorganismos, eucariontes o procariontes, tales como bacterias, hongos, algas o levaduras.

Según aspectos ventajosos, pero no obligatorios de la invención, tal procedimiento puede comprender una o varias de las siguientes características:

- Durante la etapa c), el compuesto halogenado utilizado es dibromo.
- Durante la etapa c), el compuesto halogenado utilizado es diferente de dibromo.
- 25 - Durante la etapa c), se utiliza anhídrido acético en un porcentaje molar en relación con el ácido graso volátil cercano al 12%.
- Durante la etapa c), se utiliza un anhídrido correspondiente al ácido graso volátil (AGV) a halogenar.
- Durante la etapa c), la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción de bromación es menor de 20°C a 40°C a la temperatura de ebullición del ácido graso volátil.
- 30 - Durante la etapa d), la síntesis se lleva a cabo por reacción con amoníaco en exceso en relación con la estequiometría de la reacción.
- Durante la etapa d), la síntesis se lleva a cabo por reacción con una amina.
- Durante la etapa d), la temperatura está comprendida entre 20°C y 50°C.
- Durante la etapa d), se sintetiza al menos un co-producto definido como un iminodiácido y/o nitrilotriácido.

35 Existen varios tipos de aminoácidos que presentan interés para un uso industrial, cosmético, médico, alimentario u otro. Como ejemplo se pueden mencionar los aminoácidos no proteínogénicos, tales como homoalanina, norvalina, norleucina investigadas para la síntesis de moléculas plataforma para la farmacopea.

La expresión aminoácido se refiere en la presente memoria a los ácidos que tienen al menos una función amina primaria, secundaria o terciaria.

40 Además, gracias al procedimiento de la invención, se puede llevar a cabo la síntesis de varios tipos de aminoácidos, tales como pero no exclusivamente aquellos antes mencionados, de manera regular y controlada, a partir de un sustrato de biocomponente asociado a la producción por ruta biológica con una producción por ruta química.

45 La invención se entenderá mejor y serán más evidentes otras ventajas después de la lectura de la descripción de diversos modos de realización de la invención, dados a modo de ejemplo no limitante.

Las diferentes etapas del método se describen ahora con referencia a varios modos de realización,

entendiéndose que las etapas conocidas por sí mismas no se detallan.

En primer lugar, el sustrato utilizado es ventajosamente no tratado, es decir, que no ha sufrido ningún pretratamiento físico-químico o enzimático. Este sustrato está constituido principalmente por biomasa fermentable. A manera de ejemplo complementario no limitante, se pueden mencionar los desechos agrícolas o vegetales (paja, bagazo, residuos del maíz, hierbas, madera, hierba cortada), desechos de papel (cartón, papel), desechos agroalimentarios, desechos de mataderos, la fracción fermentable de los desechos domésticos, efluentes de ganado (estiércol, estiércol líquido, guano), algas, desechos de acuicultura, desechos de la actividad forestal o también los co-productos fermentables de la industria cosmética. Ciertos sustratos contienen moléculas orgánicas, tales como ácidos orgánicos, que no influyeron o lo hicieron de manera marginal, sobre el procedimiento de fermentación. Por el contrario, estas moléculas pueden encontrarse en el medio de fermentación y participar, por ejemplo, en la producción de moléculas orgánicas finales definidas.

Por ejemplo y de forma conocida, el sustrato se introduce en un reactor de fermentación, conocido por sí mismo y dimensionado para la producción deseada; bien sea esta última a escala de laboratorio para realizar ensayos o a escala industrial en el caso de una producción. En otras palabras, el reactor de fermentación o biorreactor tiene un volumen que varía de algunos litros a varias centenas de metros cúbicos, según se requiera.

Los microorganismos ventajosamente, se introducen inicialmente en el reactor de fermentación en una cantidad adecuada para comenzar la fermentación. Los microorganismos se inoculan ventajosamente en forma de un consorcio. El término consorcio designa una mezcla de microorganismos, eucariontes y procariontes, ya sean bacterias, levaduras, hongos o algas. Estos diferentes microorganismos provienen esencialmente de ecosistemas naturales, ventajosamente pero no exclusivamente de ecosistemas anaeróbicos tales como, a manera de ejemplo no limitante, la zona anaerobia de medios acuáticos como la zona anóxica de algunos lagos, suelos, pantanos, lodos de depuración, el rumen de rumiantes o el intestino de las termitas. Cabe señalar que la distribución cualitativa y cuantitativa de los diferentes tipos y especies de microorganismos en el consorcio no se conoce con precisión y sobre todo puede variar en proporciones significativas. Resulta que esta diversidad cualitativa y cuantitativa aporta de forma sorprendente robustez y adaptabilidad de los microorganismos que garantiza un uso óptimo de los sustratos, cualquiera que sea la composición de estos últimos y en condiciones variables de fermentación.

Además, debido a que el sustrato se usa tal cual, es decir, sin esterilizar o, en términos más generales, no se encuentra libre de los microorganismos que contiene antes de su introducción en el biorreactor, se ha demostrado que los microorganismos endémicos al sustrato, de hecho, se incorporan en el consorcio o al menos se asocian con este último en el biorreactor.

Además, la fermentación tiene lugar en condiciones anaerobias, de manera más precisa, cuando el potencial redox es menor que -300 mV, ventajosamente entre -550 mV y -400 mV y cuando el pH es menor que 8, preferiblemente comprendido entre 4 y 7. De manera ventajosa, la fermentación está limitada a la producción de metabolitos de fermentación denominados precursores, a saber, ácidos grasos volátiles o AGV que tienen de dos a ocho carbonos, preferentemente de dos a seis. Por lo tanto, se induce una reacción similar al fenómeno de acidosis que se encuentra en los rumiantes, a la vez que se tiene una producción de metano cercana a cero. El metano generalmente es uno de los metabolitos fermentativos finales obtenidos durante una fermentación anaerobia por microorganismos de ecosistemas naturales.

La fermentación conduce, inicialmente, a la formación de ácidos grasos volátiles que tienen, principalmente, de dos a cuatro carbonos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico. También se obtienen, en menor cantidad, ácidos grasos volátiles de cadena larga, por lo tanto, superiora cuatro carbonos, tales como los ácidos valérico y caproico, heptanoico u octanoico. Al continuar la fermentación y/o al aumentar la cantidad de microorganismos en el biorreactor, si es necesario con microorganismos seleccionados, se puede favorecer la producción de AGV de cadena carbonada larga, es decir, de más de cuatro carbonos.

En otras palabras, los ácidos grasos volátiles producidos en cantidad durante la fermentación son esencialmente ácidos grasos volátiles de dos a seis carbonos.

En todos los casos, la fermentación se dirige a asegurar la producción de AGV en fase líquida. Típicamente, el período de fermentación comprende entre 1 y 7 días, preferentemente entre 2 y 4 días. La concentración de metabolitos obtenida en el medio de fermentación al final de este periodo es variable, pero para los ácidos grasos volátiles, generalmente es del orden de 10 a 20 g/L, dependiendo de los ácidos grasos volátiles, entiéndase que en ciertas condiciones puede ser superior a 35 g/L, por ejemplo próxima a 50 g/L. Al final de la etapa de fermentación, el medio de fermentación se encuentra a un pH ácido, que generalmente está comprendido entre 4 y 6, debido a la presencia de ácidos grasos volátiles en el medio de fermentación.

Cuando la producción de AGV alcanza una cantidad definida, generalmente en fase de régimen permanente de la fermentación, se inicia la etapa a) de extracción de moléculas. De manera preferida pero no obligatoria, esta cantidad definida de AGV corresponde a una ralentización del crecimiento de los microorganismos, por lo tanto, a la proximidad de un umbral de inhibición de los microorganismos.

- 5 El medio de extracción se selecciona de entre los medios de extracción, líquidos o sólidos, que sean, al menos, insolubles en el medio de fermentación. Cuando el medio de extracción es líquido, por tanto cuando se trata de disolvente, preferentemente, la densidad del disolvente es menor que la del medio de fermentación.

De manera más precisa, la extracción se lleva a cabo con un medio de extracción, sólido o líquido, cuyas condiciones de implementación permiten conservar la actividad y/o el crecimiento de los microorganismos en las condiciones de fermentación reinantes en el biorreactor y que se definen para llevar a cabo la fermentación. Preferentemente, las moléculas de AGV se extraen por familias moleculares y luego se separan ventajosamente mediante técnicas conocidas *per se*.

10

Cuando se extraen del medio de fermentación moléculas tales como ácidos grasos volátiles, se reduce de hecho la acidificación del medio de fermentación por estos ácidos. Así, la fermentación, y por lo tanto la producción de metabolitos continúan en condiciones similares a las condiciones iniciales, y el medio de fermentación sigue siendo poco ácido.

15

La extracción se realiza ventajosamente de forma continua o al menos de modo secuencial, por ejemplo con una extracción cada 12 horas. En otras palabras, es posible continuar la fermentación mientras se extraen los metabolitos producidos, siempre y cuando se realice a la misma proporción y dimensión que la producción de manera regular.

20

La extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos como método de extracción es el modo de extracción retenido, preferentemente, pero no exclusivamente.

En un modo de realización, la extracción no se realiza en un órgano distinto del reactor de fermentación, sino directamente en este último. El disolvente, por ejemplo, se introduce mediante un dispositivo de tipo burbujeador ubicado en la parte inferior del reactor. Como una variante, un órgano de extracción se acopla con el reactor, proporcionándose una comunicación con el medio de fermentación.

25

Después de la extracción, se lleva a cabo la etapa b) de recogida. Durante esta etapa, los AGV se recogen a partir de la fase orgánica mediante técnicas conocidas por sí mismas, tales como la destilación o la evaporación.

La recogida se realiza ya sea en la mezcla de AGV o por tipo de AGV. Se apreciará que la elección del AGV o de la mezcla de AGV se determina por el tipo de molécula(s) final(es) deseada(s). Para ello, se adaptan las condiciones de recogida, típicamente los parámetros de evaporación o destilación.

30

Una vez realizada esta etapa de recogida, se ejecuta la etapa c) siguiente. Esta última se lleva a cabo ventajosamente pero no exclusivamente, después de la etapa de recogida. Como una variante, se realiza en otro momento y/o en otro sitio, siendo los productos AGV transportados y/o almacenados según las técnicas conocidas por sí mismas.

35

Esta etapa de halogenación consiste en hacer reaccionar un halógeno con un AGV para producir un ácido  $\alpha$ -halogenado que es un tipo de molécula altamente reactiva y que es particularmente interesante para producir otras moléculas. Tal reacción, conocida *per se*, se lleva a cabo por adición de bromo, esto de manera preferible, entendiéndose que se pueden utilizar los demás halógenos, a saber, cloro, flúor o yodo o moléculas halogenadas tales como trihalogenuros de fósforo, ácidos halogenados o halogenuros de acilo.

40

Se ha retenido el dibromo porque un  $\alpha$ -haloácido bromado es más reactivo que el  $\alpha$ -haloácido clorado correspondiente, siendo más fácil romper un enlace carbono-bromo que un enlace carbono-cloro. Además, el bromo es más fácil de manipular debido a su forma líquida.

Para llevar a cabo la síntesis de ácido  $\alpha$ -bromado la ruta emplea un anhídrido, en este caso anhídrido acético y se ha retenido piridina. Se concibe que se conocen por sí mismas otras rutas sintéticas, por ejemplo con ácido polifosfórico o trihalogenuros de fósforo. Se han realizado ensayos con ácido polifosfórico pero los resultados no han sido concluyentes debido, entre otros, a la alta viscosidad de este compuesto que hace que su manipulación sea difícil.

45

La solicitante ha realizado igualmente ensayos de cloración para la síntesis de ácidos  $\alpha$ -clorados, por ejemplo con ácido tricloroisocianúrico. Los resultados obtenidos son inferiores, en términos de rendimiento y de facilidad de

50

realización a los obtenidos con dibromo.

La ruta de síntesis que utiliza un anhídrido correspondiente al ácido graso volátil que se va a halogenar es interesante y permite obtener un ácido  $\alpha$ -halogenado, en este caso, un ácido  $\alpha$ -bromado de un tipo dado. El uso de anhídrido acético con otros AGV y/o una mezcla de AGV de dos a seis carbonos permite obtener una mezcla de ácidos  $\alpha$ -halogenados de dos a seis carbonos.

5

Los ensayos que emplean ácido acético (AGV de dos carbonos), ácido propiónico (AGV de tres carbonos), ácido butírico (AGV de cuatro carbonos), ácido caproico (AGV de seis carbonos) así como una mezcla de AGV de dos a seis carbonos se han realizado haciendo variar la cantidad de anhídrido acético así como otros parámetros tales como la temperatura.

10

Durante los diferentes ensayos, se ha respetado un protocolo. Se trata, en la fase preliminar, de calentar a reflujo una mezcla inicial de AGV, anhídrido acético y piridina. Luego, durante la bromación propiamente dicha, se añade el dibromo lentamente durante varias horas, a una temperatura menor a la de ebullición de la mezcla; una vez que se ha añadido el dibromo, la mezcla se lleva de nuevo a reflujo antes de enfriarse. Al final de la reacción, ventajosamente, se añade agua para destruir el anhídrido presente. El ácido  $\alpha$ -bromado se extrae a continuación por diferentes métodos, dependiendo del ácido. Se trata, por ejemplo, mediante destilación, de extracción separativa.

15

La temperatura inicial, para llevar la mezcla a reflujo, está comprendida entre 120°C, para los AGV de dos carbonos, y 200°C, para los AGV de seis carbonos. La temperatura de bromación varía de 80°C a 180°C, según si los AGV tienen de dos a seis carbonos. El tiempo de la reacción de bromación, por lo tanto de hecho, el tiempo de adición del dibromo, varía de aproximadamente una hora para los AGV de seis carbonos a aproximadamente cuatro horas para los AGV de dos carbonos.

20

Se han realizado ensayos de bromación de ácidos grasos volátiles de dos, tres, cuatro, seis carbonos, así como un ensayo de la mezcla de ácidos grasos volátiles:

Ácido acético (C2): 0,53 mol

25

Ácido propiónico (C3): 0,53 mol

Ácido butírico (C4): 0,53 mol

Ácido caproico (C6): 0,24 mol

Mezcla de AGV de C2 a C6: 0,54 mol

30

La cantidad de dibromo añadido es de 0,21 mol o 0,11 mol, de modo que el ácido graso volátil se encuentra en exceso. Ventajosamente, la solicitante ha constatado que la relación molar de 2:1 a favor del AGV es óptima.

La cantidad de anhídrido añadida es, para cada ácido, de 0,06 mol para un ensayo y 0,03 mol para otro ensayo.

La mezcla de AGV comprende: ácido acético (C2), propiónico (C3), butírico (C4), valérico (C5) y caproico (C6).

35

Las temperaturas de reflujo, durante la fase preliminar, varían según el AGV: 120°C para el ácido acético; 120°C y 140°C para los ensayos con ácido propiónico; 150°C y 160°C para el ácido butírico; 200°C para el ácido caproico y 180°C para la mezcla.

Las temperaturas de bromación para los diferentes ensayos con cada ácido son inferiores en 10°C a 50°C, y ventajosamente en 20°C a 40°C a las temperaturas de reflujo, por tanto de ebullición, del ácido graso volátil.

Los rendimientos y purezas de los ácidos  $\alpha$ -bromados obtenidos después de los diferentes ensayos se recogen más abajo en la Tabla 1 en la que los AGV se designan por el número de carbonos para simplificar.

40

TABLA 1

| Ácidos | Cantidad de anhídrido (mol) | Tiempo de bromación (h) | Temperatura de reflujo (°C) | Temperatura de bromación (°C) | Rendimiento (%) | Pureza (%)  |
|--------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------|-------------|
| C2     | 0,06                        | 2,2                     | 120                         | 100                           | 87              | 98          |
| C2     | 0,03                        | 4                       | 120                         | 90                            | 80              | 93          |
| C3     | 0,06                        | 3                       | 120                         | 80 a 110                      | 77              | 80          |
| C3     | 0,03                        | 3                       | 140                         | 125                           | 100             | 93          |
| C4     | 0,06                        | 1,25                    | 160                         | 140                           | 80              | 95          |
| C4     | 0,03                        | 3                       | 150                         | 110 a 140                     | 100             | 96          |
| C6     | 0,03                        | 0,92                    | 200                         | 150                           | 100             | desconocida |
| mezcla | 0,06                        | 1,5                     | 180                         | 130                           | 100             | desconocida |

5 El análisis y los cálculos de rendimiento se realizaron mediante técnicas analíticas conocidas, a saber, mediante RMN (Resonancia Magnética Nuclear) y HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución). Los rendimientos se definen en relación con la cantidad del AGV consumido.

La solicitante ha constatado que la velocidad de reacción, ilustrada por la decoloración de la mezcla de reacción después de la adición del dibromo, es más rápida cuando la cantidad de anhídrido es más importante, viéndose poco afectada la pureza. Sin embargo, es conveniente que la temperatura de las dos etapas, preliminar y de bromación, sea óptima.

10 Para ese propósito, la solicitante ha observado que se necesita una temperatura de bromación más baja que la temperatura de ebullición del ácido graso volátil, siempre y cuando no se aleje demasiado de esta temperatura.

15 Los diferentes ensayos han permitido definir que una temperatura de bromación inferior alrededor de 10°C a 50°C a la temperatura de ebullición del ácido graso volátil y, ventajosamente, inferior de 20°C, permitiría, siempre y cuando las otras condiciones sean idénticas, obtener un rendimiento óptimo, típicamente entre 60% y 100% con un tiempo de reacción de 1h a 4h.

Con respecto al papel del anhídrido acético, en vista de los resultados de la tabla, parece que el porcentaje molar de anhídrido con respecto al AGV debe estar cerca del 12% para una reacción de bromación óptima, entendiéndose que es aceptable un porcentaje comprendido entre el 5% y el 20%.

20 A partir de los ácidos  $\alpha$ -bromados obtenidos, o de forma más precisa a partir de un ácido  $\alpha$ -bromado dado, se lleva a cabo a continuación la síntesis, durante la etapa d), de un  $\alpha$ -aminoácido dado. Para ello se añade amoníaco, en forma gaseosa o en solución. Alternativamente, el amoníaco se reemplaza por una amina primaria o secundaria.

25 La solicitante ha realizado ensayos por reacción de amoníaco sobre  $\alpha$ -bromoácidos que tienen de dos a seis carbonos, a saber sobre un ácido bromoacético, ácido  $\alpha$ -bromopropiónico, ácido  $\alpha$ -bromobutírico, ácido  $\alpha$ -bromovalérico, ácido  $\alpha$ -bromocaproico. Tal reacción permite la obtención de  $\alpha$ -aminoácidos que tienen una cadena carbonada, respectivamente, de dos, tres, cuatro, cinco o seis carbonos, ya sea glicina, alanina, homoalanina, norvalina y norleucina.

30 Estos  $\alpha$ -aminoácidos se encuentran entre los más utilizados como constituyentes de productos cosméticos, alimentarios, bien sea en alimentación humana o animal, o como productos intermedios de reacción en la química y la farmacopea. Se entiende fácilmente que el procedimiento de la invención permite la producción de otros tipos de aminoácidos.

Para los diferentes ensayos, el protocolo consiste en hacer agitar, a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente, es decir alrededor de 20°C y 50°C, amoníaco con ácido  $\alpha$ -bromado. La reacción se lleva a cabo durante un tiempo variable, que va de media hora a setenta y dos horas, dependiendo del tipo de ácido  $\alpha$ -

bromado y dependiendo de la temperatura. Un ácido  $\alpha$ -bromado largo, es decir que tiene al menos cuatro carbonos, requiere un tiempo de reacción largo, típicamente más de 24 horas a temperatura ambiente pero menos de 12h a 50°C.

5 La solicitante ha constatado sorprendentemente que una alta temperatura de reacción cercana a 50°C permite disminuir el tiempo de reacción.

La solicitante ha constatado que cuando el amoníaco se encuentra en exceso, es decir, en una relación molar próxima a 1:10, se optimiza la conversión a aminoácidos.

La tabla 2 a continuación recoge los resultados obtenidos.

10 El análisis y los cálculos de rendimientos y de las tasas de conversión se han realizado mediante técnicas de RMN (resonancia magnética nuclear) y HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). Las tasas de conversión se calcularon a partir de la cantidad de aminoácido producido en el medio de reacción en relación con la cantidad inicial de ácido  $\alpha$ -bromado. Los rendimientos se definen con respecto al análisis de masas y cualitativo de los productos, recuperados después de la extracción y recristalización en metanol.

TABLA 2

| Ácidos | Proporción ácido:NH3 | T (°C)       | Consumo de ácido $\alpha$ -bromado(%)-duración (h) | Conversión en AA (%) | Rendimiento después de la extracción (%) |
|--------|----------------------|--------------|----------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------|
| C2     | 1:10                 | (T ambiente) | 99% - 5h                                           | 46                   | 24                                       |
| C3     | 1:5                  | (T ambiente) | 95% - 5h                                           | 65                   | 44                                       |
| C3     | 1:10                 | (T ambiente) | 98% - 5h                                           | 66                   | 52                                       |
| C3     | 1:10                 | 50           | 99% - 1h                                           | 64                   | 40                                       |
| C4     | 1:5                  | (T ambiente) | 96% - 24h                                          | 55                   | 39                                       |
| C4     | 1:10                 | (T ambiente) | 99% - 24h                                          | 76                   | 54                                       |
| C4     | 1:10                 | 50           | 99% - 2h                                           | 58                   | 48                                       |
| C6     | NH3 en exceso        | (T ambiente) | 99% - 72h                                          | /                    | 43                                       |

15

Por lo tanto, se obtiene una producción de aminoácidos a partir de una fuente de base biológica en condiciones de producción fáciles de implementar y controlar.

20 Además, las tasas de conversión de aminoácidos son menores que las tasas de consumo de ácido  $\alpha$ -bromado, lo que resulta en la síntesis de al menos un co-producto definido como iminodiácidos y/o nitrilotriácidos. A modo de ejemplo no limitante, para la síntesis de glicina, los co-productos son, entre otros, ácido iminodiacético y ácido nitrilotriacético y para la síntesis de alanina, los co-productos son, entre otros, ácido  $\alpha,\alpha'$ -iminodipropiónico y ácido  $\alpha,\alpha',\alpha''$ -nitrilotripropiónico.

**REVINDICACIONES**

1. Procedimiento de producción de aminoácidos a partir de moléculas de ácidos grasos volátiles (AGV), denominados precursores, producidos por fermentación anaerobia a partir de biomasa fermentable, caracterizado por que comprende al menos las siguientes etapas:
- 5       - a) extraer las moléculas de ácidos grasos volátiles (AGV), sin interrupción de la fermentación, por un medio de extracción seleccionado entre los medios que son, al menos, insolubles en el medio de fermentación,
- b) recoleger, fuera del reactor de fermentación, las moléculas de ácidos grasos volátiles (AGV) una vez extraídos,
- 10       - c) sintetizar, por halogenación, a partir de un tipo de ácido graso volátil (AGV) seleccionado entre los ácidos grasos volátiles recolegidos en la etapa b) y definido según el tipo de aminoácido deseado, un ácido  $\alpha$ -halogenado dado,
- d) sintetizar un aminoácido definido a partir de este ácido  $\alpha$ -halogenado.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que durante la etapa c), el compuesto halogenado utilizado es dibromo.
- 15       3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que durante la etapa c), el compuesto halogenado utilizado es diferente de dibromo.
4. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que durante la etapa c), se utiliza anhídrido acético en un porcentaje molar con respecto al ácido graso volátil cercano al 12%.
- 20       5. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que durante la etapa c), se utiliza un anhídrido correspondiente al ácido graso volátil (AGV) que se va a halogenar.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que durante la etapa c), la temperatura a la que se realiza la reacción de bromación, es inferior en 20°C a 40°C a la temperatura de ebullición del ácido graso volátil.
- 25       7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que durante la etapa d), la síntesis se realiza por reacción con amoníaco en exceso con respecto a la estequiometría de la reacción.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que durante la etapa d), la síntesis se realiza mediante reacción con una amina.
9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, caracterizado por que durante la etapa d), la temperatura está comprendida entre 20°C y 50°C.
- 30       10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que durante la etapa d), se sintetiza al menos un co-producto definido como un iminodiácido y/o un nitrilotriácido.