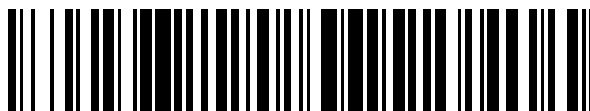


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 930**

51 Int. Cl.:

C12P 7/62 (2006.01)

C07C 67/08 (2006.01)

C07C 69/40 (2006.01)

C07C 51/43 (2006.01)

C07C 55/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2014** **PCT/US2014/068823**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2015** **WO15085185**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2014** **E 14867372 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019** **EP 3077525**

54 Título: **Un procedimiento para preparar éster succinato**

30 Prioridad:

06.12.2013 US 201361912578 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2019

73 Titular/es:

**PTTGC INNOVATION AMERICA CORPORATION
(100.0%)
42 Cummings Park
Woburn, MA 01801, US**

72 Inventor/es:

**TOSUKHOWONG, THIDARAT;
WANG, BIN;
MISTRY, MANAV;
DASARI, RAJESH y
WILSON, ZACHARY**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 725 930 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

Un procedimiento para preparar éster succinato

La presente invención está en el campo de la producción de productos químicos orgánicos básicos y especializados, utilizando biocatalizadores que han sido modificados para aumentar su capacidad para producir unos u otros productos químicos utilizando recursos de carbono renovables. La presente invención está relacionada con la producción de 1,4-butanodiol, gama-butirolactona y tetrahidrofurano a partir de una sal de ácido succínico obtenida a partir de recursos de carbono renovables, mediante fermentación biológica que involucra biocatalizadores. Más específicamente, la presente invención se refiere a la producción de éster succinato a partir de una sal de ácido succínico presente en un caldo de fermentación.

1,4-Butanodiol (BDO), gama-butirolactona (GBL), tetrahidrofurano (THF), y ácido succínico cristalino son productos químicos industriales útiles. BDO es actualmente utilizado como un disolvente industrial, en la fabricación de plásticos y poliésteres, y es un precursor para productos químicos útiles tales como GBL y THF. Es un disolvente polar prótico, que es miscible con agua. El mercado global actual para BDO es de aproximadamente mil quinientos millones de kilogramos al año, casi exclusivamente producidos a partir de procesos petroquímicos. GBL es utilizado como disolvente para reemplazar los disolventes clorados perjudiciales para el medio ambiente. GBL es usado como un intermediario en la preparación de pirrolidonas utilizadas como materia prima en la fabricación de herbicidas, aditivos para caucho, y productos farmacéuticos. THF es un disolvente aprótico miscible utilizado en química orgánica. También es ampliamente utilizado en la producción de resinas y polímeros.

El procedimiento típico para producir BDO comienza a partir de acetileno obtenido petroquímicamente, que se hace reaccionar con formaldehído utilizando la química Reppe. El 1,4-butanodiol resultante se hidrogena después para formar BDO. La vía más económica para la fabricación de BDO utiliza butano como materia prima. En la primera etapa de este procedimiento, el butano es oxidado para producir anhídrido maleico, que seguidamente se convierte en BDO mediante el proceso de BP/Lurgi Geminox o el Proceso de Davy Technology. El proceso BP/Lurgi Geminox recupera anhídrido maleico como ácido maleico y lleva a cabo una hidrogenación en fase líquida para producir una mezcla de BDO con THF y/o GBL. En el proceso de Davy Technology, el anhídrido maleico es esterificado a maleato de dimetilo, que después es vaporizado y alimentado a un sistema de hidrogenación en fase vapor para producir succinato de dimetilo. El succinato de dimetilo experimenta una reacción de hidrogenólisis para producir GBL y BDO, que puede ser adicionalmente convertido en THF. Estos productos son separados por destilación y se recicla metanol al reactor de esterificación.

Estos procedimientos convencionales para producir BDO, GBL, y THF no son sostenibles ya que las materias primas se derivan de petróleo. Uno de los caminos posibles para obtener un BDO de base biológica es mediante la esterificación de bio-ácido succínico a succinato de dialquilo e hidrogenación del succinato de dialquilo resultante para producir BDO, GBL, y THF. El principal obstáculo para el uso de bio-ácido succínico en la producción de BDO es el coste del procedimiento de fabricación. Existe una necesidad de desarrollar procedimientos de fabricación de bio-BDO de un modo económico.

Recientemente, ha habido un avance significativo en la producción de ácido succínico mediante fermentación de fuentes de carbono renovables utilizando un biocatalizador, tal como *E. coli*, *Actinobacillus succinogenes* y *Mannheimia succiniproducens*. El bio-ácido succínico puede ser polimerizado con BDO para formar un polímero de succinato de polibutileno (PBS) biodegradable. Adicionalmente, el bio-ácido succínico en un caldo de fermentación puede ser esterificado con alcohol para preparar succinato de dialquilo, que puede a su vez ser sometido a reacción de hidrogenación en fase vapor para brindar BDO, GBL y THF. La ruta desde el bio-ácido succínico a BDO mediante un éster de alquilo de ácido succínico tiene una ventaja significativa al reducir la huella de dióxido de carbono (CO₂) respecto de un proceso convencional para la fabricación de BDO en base a petróleo. Como se muestra en la Ec. [1], la cepa *E. coli* útil en la producción de ácido succínico consume CO₂ directamente para fabricar ácido succínico. La cepa *E. coli* que produce ácido succínico mediante un proceso de fermentación requiere aproximadamente 0,5 moles de CO₂ para fabricar cada mol de ácido succínico.



El proceso de fermentación de ácido succínico que utiliza biocatalizadores bacterianos es típicamente mantenido a cerca de pH neutro mediante adición de base al fermentador a medida que el ácido succínico está siendo producido. Como resultado, el producto al final de la fermentación está en forma de una sal succinato. Para convertir la sal succinato en ácido succínico, se han propuesto varios métodos. De manera similar, se han propuesto varios métodos para la esterificación del ácido succínico recuperado del caldo de fermentación así como para la conversión de éster de ácido succínico en BDO, GBL y THF mediante reacciones de hidrogenación. La presente invención provee un proceso integrado para recuperar ácido succínico con mínimas impurezas a partir de un caldo de fermentación y su alquilación para producir éster succinato.

Se han llevado a cabo y revisado numerosas investigaciones y esfuerzos en diseñar un proceso corriente abajo adecuado para la recuperación de ácido succínico y su sal. Las tecnologías básicas de separación de diferentes rutas corriente abajo incluyen precipitación con cal, cromatografía incluyendo cromatografía de lecho móvil simulado,

electrodialisis (ED), extracción reactiva, adsorción incluyendo resinas o zeolitas de intercambio iónico, cristalización, etc. La mayor parte de estos enfoques son principalmente funcionales en laboratorio, incluso a escala piloto, pero el éxito industrial dependerá de la escalabilidad, operabilidad, robustez, rendimiento y costes. El objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo procedimiento para recuperar éster succinato a partir de caldo de fermentación que contiene succinato de amonio, que es rentable cuando se realiza a escala industrial.

La patente US 5.168.055 divulga un proceso para recuperar ácido succínico a partir de caldo de fermentación que contiene sal de ácido succínico. Según este proceso, se agrega ácido sulfúrico al caldo para producir ácido succínico y sulfato de calcio (yeso). El sulfato de calcio resultante de este proceso de acidificación tiene muy poco o ningún valor comercial y típicamente termina como una corriente de desecho en un vertedero del proceso.

Las patentes US 5.034.105 y 5.143.834 divulgan un proceso de electrodialisis (ED) para separar sal de ácido succínico en un caldo de fermentación para brindar una base y ácido succínico. Tal proceso tiene la ventaja de que no se generan subproductos de sulfato. Sin embargo, la membrana de electrodialisis suele estar expuesta a contaminación por diversas proteínas, macromoléculas y iones multivalentes en el caldo de fermentación, lo que conduce a muy elevados costes de reposición.

La publicación de la solicitud de patente internacional No. WO2011/160760 y la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2013/0096343 divulgaron un proceso que comprende una etapa de acidificación para producir una mezcla de ácido succínico y sulfato de amonio, seguida de una etapa de cromatografía de lecho móvil simulado (SMB, por su sigla en inglés) para separar ácido succínico de sulfato de amonio. La corriente de ácido succínico es evaporada y cristalizada para producir ácido succínico puro.

El método de extracción reactiva para recuperar ácido carboxílico a partir de un caldo de fermentación que contiene ya sea ácido carboxílico o sal de ácido carboxílico ha sido descrito en varias patentes estadounidenses. Un asunto asociado con el proceso de extracción reactiva es el desafío que supone recuperar disolventes a escala industrial.

Se han ensayado más de 25 sorbentes para captar ácido succínico a partir de soluciones acuosas en Davison et al. Las mejores resinas tienen una capacidad de aproximadamente 0,06 g de ácido succínico/g de resina a concentraciones moderadas (1–5 g/l) de ácido succínico. Se alcanzó un 70% de recuperación utilizando regeneración en agua caliente, y este procedimiento de regeneración no fue estable a lo largo de 10 ciclos en la columna. Los esquemas de regeneración alternativa que utilizan ácido y base aumentarán los consumos de productos químicos y generarán más desperdicios. La separación en base a resina también somete a ensuciamiento el caldo de fermentación si no es pretratado intensamente.

La cristalización es una de las técnicas de separación y purificación más antiguas conocidas por el hombre. La cristalización podría ser considerada como no solo la etapa de purificación final sino también la primera etapa de recuperación para la separación corriente abajo del ácido succínico. Debido a su robustez, operatividad, y rentabilidad, la cristalización y la precipitación en el seno de soluciones son responsables del 70% de todos los materiales sólidos producidos por la industria química.

La WO2011/123269 describe un procedimiento para preparar THF, GBL, y BDO a partir de sal succinato de diamonio presente en un caldo de fermentación. El procedimiento implica hervir el caldo de fermentación por encima de la presión atmosférica a una temperatura entre 100-300°C. El objetivo de este procedimiento fue formar un producto de cabeza que contiene agua y amoníaco y un producto líquido de fondo que contiene ácido succínico y al menos 20 % en peso de agua para evitar la formación de subproductos de amida. En esta etapa puede ser utilizado un disolvente polar de elevado punto de ebullición. A continuación, el producto de fondo es enfriado para formar una porción sólida que contiene ácido succínico. El sólido es recuperado e hidrogenado en presencia de un catalizador de hidrogenación para producir THF, GBL y BDO. El Ejemplo 4 en esta solicitud de patente comienza con 80 gramos de solución de succinato de diamonio al 36% y 80 g de triglilMA. Durante la evaporación, una cantidad adicional de 3300 g de agua tiene que ser alimentada gradualmente a la mezcla en destilación a fin de evitar la formación de productos secundarios, tales como ácido succinámico y succinimida. Al final se tomó un total de 3313 g de destilado. Luego la solución fue enfriada para precipitar 7,1g de sólido. El sólido tuvo que ser recristalizado nuevamente mediante adición de 7,1g de agua caliente y enfriado para producir 3,9 g de ácido succínico. El rendimiento de ácido succínico como cristal fue calculado como solo 17%, y aún contiene 0,099% en peso de ácido succinámico. Este procedimiento tiene la desventaja económica de que se necesita mucha agua para agregar a la reacción (3300g de agua para 80 g de alimentación en este caso) y tiene que ser retirada por destilación. Si este proceso es llevado a una escala industrial, requerirá una gran cantidad de energía térmica para evaporación.

Las patentes U.S. Nos. 5.958.744 y 6.265.190 describen un método que requiere concentración de caldo de fermentación que contiene succinato de disodio a 30% p/p y ajustar el pH a 1,5-1,8 mediante adición de amoníaco, H₂SO₄ y NH₄SO₄ para producir ácido succínico y sulfato de amonio. A este rango de pH, la solubilidad del ácido succínico es baja ocasionando que se separe por precipitación. El ácido succínico precipitado se redisuelve en metanol. Para producir un ácido succínico puro, se evapora el metanol y el ácido succínico se separa por recristalización. El sulfato de amonio es insoluble en metanol. Se añade metanol al cristizador de sulfato de amonio para ayudar a que el sulfato de amonio precipite. El co-producto sulfato de amonio puede ser descompuesto térmicamente, preferiblemente a aproximadamente 290-310° C en amoníaco y bisulfato de amonio. El metanol y el

vapor de agua evaporados se podrían condensar y reutilizar. El nivel de impurezas tal como azufre en el ácido succínico obtenido de acuerdo a este proceso no es conocido.

Existe una necesidad de producir ésteres de ácido succínico con mínimo contenido de azufre en el rango de 100 ppm, preferiblemente menos de 50 ppm y lo más preferiblemente menos de 10 ppm dado que los catalizadores de hidrogenación utilizados en la conversión de éster succinato en sus productos hidrogenados tales como BDO, GBL y THF son conocidos por ser sensibles a contaminación con azufre.

La presente invención proporciona un método nuevo y simple para recuperar ácido succínico a partir de un caldo de fermentación que contiene una sal de ácido succínico mediante acidificación y esterificación de ácido succínico para producir succinato de dialquilo que a su vez es sometido a reacción de hidrogenación para producir BDO, GBL y THF. Por consiguiente la producción de BDO, GBL, o THF con base biológica mediante el método de la presente invención tendrá baja huella de carbono y ayudará a ampliar la cartera de productos químicos ecológicos de valor añadido.

La presente invención proporciona un procedimiento para preparar éster succinato a partir de sal de ácido succínico presente en un caldo de fermentación. El éster succinato producido de acuerdo a la presente invención se hidrogena para producir productos seleccionados de un grupo que consiste en 1,4-butanodiol (BDO), tetrahydrofurano (THF) y gama-butirolactona (GBL).

La sal de ácido succínico adecuada para la presente invención es producida utilizando biocatalizadores bacterianos y fúngicos incluyendo levaduras. Los biocatalizadores para la producción de ácido succínico pueden utilizar una variedad de fuentes de carbono incluyendo glucosa, sacarosa, glicerol e hidrolizados de celulosa. El ácido succínico es acumulado en el caldo de fermentación como una sal que tiene un contraión seleccionado de un grupo que consiste en metal alcalino, metal alcalino térreo, amonio, o el grupo alquilamonio. El ácido succínico es recuperado como un ácido libre mediante la acidificación del caldo de fermentación clarificado utilizando ácidos más fuertes. De acuerdo con la presente invención, se utiliza ácido fosfórico para acidificar el caldo de fermentación que contiene succinato de amonio conduciendo a la liberación de ácido succínico y fosfato de amonio.

Entre las diversas sales de ácido succínico que pueden ser fabricadas a través de un procedimiento biológico de acuerdo con la presente invención, se utiliza preferentemente succinato de amonio en la presente invención. El procedimiento de acuerdo con la presente invención permite una máxima recuperación de ácido succínico a partir de un caldo de fermentación que contiene succinato de amonio y su conversión en éster succinato, de manera rentable.

En una realización de la presente invención, se obtiene éster de ácido succínico utilizando un procedimiento que incluye etapas de evaporación, filtración, reacción de doble desplazamiento asociado con acidificación, cristalización controlada, esterificación y destilación fraccionada. En la primera etapa de esta realización, se lleva a cabo la acidificación del caldo de fermentación que contiene succinato de amonio con un ácido fuerte tal como ácido sulfúrico (fuera del alcance de la invención) o ácido fosfórico. Esta acidificación del caldo de fermentación que contiene succinato de amonio ocasiona una reacción de doble desplazamiento donde los cationes y aniones intercambian contrapartes. El succinato de amonio reacciona con el ácido fuerte en una reacción de doble desplazamiento que conduce a la formación de ácido succínico libre y una sal de amonio tal como sulfato de amonio o fosfato de amonio dependiendo de la naturaleza del ácido fuerte agregado al caldo de fermentación. Después de completada la reacción de doble desplazamiento, el caldo de fermentación acidificado es sometido a evaporación bajo vacío a una temperatura elevada y a un proceso de cristalización controlada a una temperatura más baja. Los cristales de ácido succínico a partir de esta primera etapa de cristalización se disuelven en un alcohol y se someten a una reacción de esterificación para producir un éster de ácido succínico que se purifica mediante destilación fraccionada.

En un aspecto de la presente invención, el caldo de fermentación acidificado es enfriado para cristalizar el ácido succínico. En otra realización de la presente invención, el caldo de fermentación es sometido a evaporación antes de ser sometido a acidificación. En un aspecto preferido de esta invención, el caldo de fermentación se somete a evaporación y filtrado antes de la etapa de acidificación. En aún otro aspecto de la presente invención, el ácido succínico obtenido a partir de la primera etapa de cristalización se somete a una etapa de recristalización para mejorar adicionalmente la calidad de los cristales de ácido succínico.

Independientemente de las etapas del procedimiento seguidas para alcanzar la primera cristalización, el caldo de fermentación acidificado es filtrado o centrifugado para separar los cristales de ácido succínico desde el licor madre al final de la primera etapa de cristalización. El licor madre de la primera etapa de cristalización se somete a otra etapa de evaporación a una temperatura elevada bajo vacío seguido de una segunda etapa de cristalización a una temperatura más baja bajo vacío, conduciendo a co-cristalización de la sal de amonio y ácido succínico resultantes de la reacción de doble desplazamiento. El producto co-cristalizado de la segunda etapa de cristalización es disuelto o lavado utilizando metanol para separar la sal de amonio del ácido succínico. La sal de amonio es insoluble en metanol y es recuperada como sal de amonio cristalina a través de centrifugación o filtración mientras el ácido succínico se disuelve fácilmente en metanol. La fase metanol que contiene ácido succínico es sometida a una reacción de esterificación, ya sea separadamente o combinada con ácido succínico proveniente de la primera etapa de cristalización para producir éster de ácido succínico, que es purificado adicionalmente mediante destilación fraccionada.

En otra realización de la presente invención, el caldo de fermentación que contiene sal de ácido succínico es concentrado mediante evaporación seguido de una etapa de intercambio de sal. Durante el procedimiento de intercambio de sal, la sal de ácido succínico concentrada es mezclada con un disolvente orgánico, por ej. metanol, etanol, etc. para recuperar sal de ácido succínico como un precipitado sólido mientras que la mayor parte de las impurezas en el caldo de fermentación son retenidas en la fase disolvente orgánico-agua. Cuando se usa metanol como disolvente orgánico, el metanol es recuperado de la fase de metanol-agua por destilación para su reutilización, y la sal de ácido succínico residual en la fase acuosa es reciclada a la etapa de intercambio de sal para maximizar la recuperación de sal de ácido succínico. La sal de ácido succínico recuperada como un precipitado sólido es mezclada con metanol y sometida a una reacción de doble desplazamiento con un ácido fuerte para producir ácido succínico libre y sal de amonio del ácido fuerte nuevamente formada, como los productos de una reacción de doble desplazamiento.

En el aspecto anterior de la presente invención, que incluye la etapa de intercambio de sal, se usa ácido sulfúrico en la reacción de doble desplazamiento para dar ácido succínico y sulfato de amonio.

El ácido succínico es totalmente soluble en metanol mientras que la sal de amonio resultante de la reacción de doble desplazamiento es insoluble en metanol y es recuperada como un precipitado sólido. Dado que el ácido sulfúrico es capaz de actuar asimismo como un catalizador de esterificación, el ácido succínico formado como resultado de la reacción de doble desplazamiento en presencia de metanol es esterificado hasta cierto punto dando por resultado una mezcla de ácido succínico, succinato de monometilo, y succinato de dimetilo en la fase metanol. Mediante la provisión de condiciones adecuadas para una reacción de esterificación, el ácido succínico libre que resulta de la reacción de doble desplazamiento en la fase metanol puede ser totalmente esterificado y el éster de dimetilo es recuperado de la fase metanol mediante destilación fraccionada. El éster de dimetilo puede ser convertido en otros ésteres deseables tales como éster succinato de dietilo, éster succinato de dipropilo, y éster succinato de dibutilo a través de apropiadas reacciones de transesterificación.

El éster de ácido succínico obtenido de acuerdo a la presente invención es adecuado para el procedimiento de hidrogenación catalítica en fase vapor para producir productos de hidrogenación tales como BDO, GBL, y THF. El éster succinato puede ser también hidrolizado para proporcionar ácido succínico de elevada pureza.

Breve descripción de las figuras

FIG. 1. Diagrama de flujo del procedimiento para la producción de BDO, GBL y THF derivados de biomasa. En el procedimiento de fermentación de acuerdo a este diagrama de flujo, el ácido succínico es producido como succinato de amonio. La acidificación del caldo de fermentación que contiene succinato de amonio es lograda mediante la adición de ácido sulfúrico, conduciendo a la liberación de ácido succínico libre que es recuperado de acuerdo al procedimiento de la presente invención.

FIG. 2. Tres configuraciones de diagrama de flujo para producir cristales brutos de ácido succínico de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. En la configuración del diagrama de flujo 1, un caldo de fermentación que contiene succinato de amonio es acidificado con la adición de ácido sulfúrico seguido de concentración del caldo de fermentación por evaporación conduciendo a la recuperación de ácido acético como un condensado. El caldo de fermentación concentrado, acidificado es enfriado, conduciendo a la cristalización del ácido succínico. El ácido succínico cristalino es recuperado mediante filtración. En la configuración del diagrama de flujo 2a, un caldo de fermentación que contiene succinato de amonio es concentrado por evaporación y el amoníaco es recuperado en el condensado seguido por enfriamiento. Subsiguientemente, el caldo de fermentación concentrado, enfriado, es acidificado y el ácido succínico es precipitado y recuperado mediante filtración. En la configuración del diagrama de flujo 2b, un caldo de fermentación que contiene succinato de amonio es concentrado por evaporación y el amoníaco es recuperado en el condensado. Se utiliza ácido sulfúrico para acidificar el caldo de fermentación concentrado y el ácido succínico que se separa por precipitación es calentado y sometido a recristalización para formar material cristalino más puro y más grande. Las etapas acidificación/precipitación, calentamiento, y cristalización todas tienen lugar en un único equipo, que utiliza un cristizador de tubo difusor con tabique deflector (del inglés: *draft-tube baffled crystallizer*) conectado a un circuito de recirculación donde puede ser agregado el ácido sulfúrico. Puede ser utilizado el calor liberado de la acidificación, y opcionalmente un calentador auxiliar, para redissolver las partículas finas. El tiempo de residencia y el mezclado en el cristizador de tubo difusor con tabique deflector deben ser controlados de modo de obtener cristales grandes con elevada pureza. En las tres configuraciones, el ácido succínico es recuperado al final mediante filtración o centrifugación como cristales brutos. El licor madre se somete a etapas de procesamiento adicional para recuperar el ácido succínico remanente.

FIG. 3. Procedimientos en una etapa y en dos etapas para la acidificación del caldo de fermentación que contiene succinato de amonio. Bajo el procedimiento normal para la acidificación del caldo de fermentación que contiene succinato de amonio, también referido como procedimiento para la acidificación en una etapa, se agrega ácido sulfúrico al caldo de fermentación para bajar el pH del caldo de fermentación desde pH 6,5 hasta pH 2,2-2,4 en una única etapa. En el procedimiento de acidificación en dos etapas, inicialmente el pH del caldo de fermentación se hace descender desde pH 6,5 hasta un punto intermedio (típicamente alrededor de pH 2,8-3,0) seguido de una etapa de cristalización controlada. Los cristales formados mediante la primera etapa del procedimiento no son cosechados, sino que son utilizados como siembra para la segunda etapa donde el pH de la solución se hace descender adicionalmente

a pH 2,2-2,5 y más ácido succínico se separa por cristalización a medida que desciende la temperatura. Los acrónimos "SAC" y "AMS" en esta figura y en todo el texto de esta solicitud de patente representan ácido succínico y sulfato de amonio, respectivamente.

FIG. 4A y 4B. Diagrama de flujo detallado del procedimiento para producir succinato de dimetilo que involucra etapas de evaporación, acidificación, cristalización fraccionada y esterificación. El material de partida para la producción de succinato de dimetilo de acuerdo con este diagrama de flujo del procedimiento es caldo de fermentación que contiene succinato de amonio que ha sido clarificado para retirar biomasa y proteína. En la Figura 4A, se utiliza H_2SO_4 para acidificar el caldo de fermentación, conduciendo a la protonación del ácido succínico y la formación de sulfato de amonio como co-producto. La solución acidificada es concentrada en una etapa de evaporación. Alternativamente, como se muestra en la Figura 4B, la evaporación del caldo de fermentación clarificado tiene lugar antes de la acidificación con H_2SO_4 . Subsiguientemente, en la primera etapa de cristalización, cristaliza el ácido succínico, que tiene menor solubilidad que el sulfato de amonio, y se separa del licor madre mediante centrifugación. El licor madre, que está agotado en ácido succínico, es adicionalmente concentrado en un evaporador. En la segunda etapa de cristalización, el sulfato de amonio es cristalizado con (o sin) ácido succínico. El sulfato de amonio es separado del licor madre mediante centrifugación. Este licor madre puede ser reciclado al primer o segundo evaporador. El ácido succínico co-cristalizado con la fracción de sulfato de amonio es adicionalmente separado del sulfato de amonio mediante una etapa de lavado con metanol. El sulfato de amonio, que es insoluble en metanol, puede ser centrifugado y recuperado. Tanto los cristales brutos de ácido succínico obtenidos en la primera etapa de cristalización como la corriente de lavado de metanol que contiene ácido succínico, pueden ser utilizados para alimentar el proceso de esterificación. El sulfato de amonio de elevada pureza a partir de la segunda etapa de cristalización puede ser secado y vendido como fertilizante comercial.

FIG. 5. Curva de solubilidad para sulfato de amonio en agua. Hay un aumento en la solubilidad del sulfato de amonio en agua con el aumento de temperatura. Incluso a 0°C, aproximadamente 70 gramos de sulfato de amonio es aún soluble en 100 gramos de agua.

FIG. 6A y 6B. Diagrama de flujo detallado del procedimiento para producir succinato de dimetilo que involucra etapas de evaporación, acidificación, cristalización fraccionada y esterificación. El material de partida para la producción de succinato de dimetilo de acuerdo con este diagrama de flujo del procedimiento es caldo de fermentación que contiene succinato de amonio que ha sido clarificado para retirar biomasa y proteína. En la Figura 6A, se utiliza H_3PO_4 para acidificar el caldo de fermentación conduciendo a la protonación del ácido succínico y la formación de fosfato de amonio (ADP) como co-producto. La solución acidificada es concentrada en una etapa de evaporación. Alternativamente, como se muestra en la Figura 6B, la evaporación del caldo de fermentación clarificado tiene lugar antes de la acidificación con ácido fosfórico. Subsiguientemente en la primera etapa de cristalización, el ácido succínico, es cristalizado, y separado del licor madre mediante centrifugación. El licor madre, que está agotado en ácido succínico, es adicionalmente concentrado en un evaporador. En la segunda etapa de cristalización, el fosfato de amonio es cristalizado con (o sin) ácido succínico. El fosfato de amonio es separado del licor madre mediante centrifugación. Este licor madre puede ser reciclado al primer o segundo evaporador. El ácido succínico co-cristalizado con fosfato de amonio es adicionalmente separado del fosfato de amonio mediante una etapa de lavado con metanol. El fosfato de amonio, que es insoluble en metanol puede ser centrifugado y recuperado. Tanto los cristales brutos de ácido succínico obtenidos en la primera etapa de cristalización como la corriente de lavado con metanol que contiene ácido succínico pueden ser utilizados para alimentar el procedimiento de esterificación. El fosfato de amonio de elevada pureza a partir de la segunda etapa de cristalización puede ser craqueado térmicamente para recuperar amoníaco y ácido fosfórico.

FIG. 7. Titulación de solución de succinato de amonio con ácido fosfórico. Para llevar solución de sulfato de amonio acuoso hasta pH 2,0, se requieren aproximadamente 3 gramos de ácido fosfórico por cada gramo de succinato de amonio en la solución.

FIG. 8. Procedimiento para reciclar fosfato de amonio. Cuando se utiliza ácido fosfórico para acidificar el caldo de fermentación que contiene succinato de amonio, se obtiene fosfato de amonio como producto secundario. Se muestran en este diagrama de flujo del procedimiento las etapas de la conversión térmica de fosfato de amonio cristalino en ácido fosfórico, ácido polifosfórico y/o pentóxido de fósforo, que puede ser reciclado en el procedimiento de recuperación de ácido succínico de acuerdo con la presente invención.

FIG. 9. Procedimiento de intercambio de sal succinato de amonio para la eliminación de agua a partir del procedimiento de fermentación. Un caldo de fermentación que contiene succinato de amonio (AMSAC) se somete a evaporación a una temperatura elevada bajo vacío y el caldo de fermentación concentrado es mezclado con metanol para causar la precipitación de succinato de amonio, que es recuperado mediante filtración. El metanol es recuperado a partir de la fase metanol-agua mediante destilación y reciclado mientras la solución de succinato de amonio acuoso, diluido, remanente, es devuelta a la etapa de evaporación. El succinato de amonio cristalino es mezclado con metanol en presencia de ácido sulfúrico para iniciar una reacción de doble desplazamiento acompañada de una reacción de esterificación. El sulfato de amonio insoluble resultante de la reacción de doble desplazamiento es recuperado mediante filtración dejando atrás una solución metanólica que comprende ácido succínico y una mezcla de succinato de mono y dimetilo. La solución metanólica es adicionalmente hecha reaccionar para convertir completamente ácido succínico en succinato de dimetilo, que es luego recuperado a partir de metanol mediante destilación fraccionada.

FIG. 10. Cristales de succinato de amonio (AMSAC) y licor madre derivado del tratamiento con metanol del caldo de fermentación que contiene succinato de amonio. El caldo de fermentación que contiene succinato de amonio es de color oscuro. Con la adición de metanol al caldo de fermentación, el succinato de amonio es separado por precipitación como una sal cristalina blanca que es separada por filtración del licor madre. El licor madre retiene todas las impurezas en el caldo de fermentación original y se ve tan oscuro como el caldo de fermentación original.

FIG. 11. Comparación de tratamiento con metanol y etanol del caldo de fermentación que contiene succinato de amonio. El metanol como disolvente precipita específicamente succinato de amonio como un sólido cristalino blanco dejando atrás todas las impurezas en el licor madre. Por otra parte, con el tratamiento con etanol, la mayor parte de las impurezas precipitan junto con el succinato de amonio y la fracción de succinato de amonio resultante aparece oscura y el licor madre es de color claro. Las muestras que se muestran en la figura están numeradas desde 1 hasta 8 de izquierda a derecha. Las muestras 1 y 2 tenían una proporción metanol:caldo concentrado de 4 y las muestras 3 y 4 tenían una proporción metanol:caldo concentrado de 5. Las muestras 1 y 3 fueron tratadas con metanol a temperatura ambiente y las muestras 2 y 4 fueron tratadas con metanol a 60°C. Las muestras 5 y 6 tenían una proporción etanol:caldo concentrado de 4 y las muestras 7 y 8 tenían una proporción etanol:caldo concentrado de 5. Las muestras 5 y 7 fueron tratadas con etanol a temperatura ambiente y las muestras 6 y 8 fueron tratadas con etanol a 60°C.

FIG. 12. Reacciones de doble desplazamiento y esterificación combinadas, involucrando succinato de amonio sólido (fracción AMSAC obtenida a partir de caldo de fermentación que contiene succinato de amonio), metanol y ácido sulfúrico. La fracción líquida resultante de estas reacciones de doble desplazamiento y esterificación combinadas comprende ácido succínico, succinato de monometilo y succinato de dimetilo. La fracción sólida resultante de estas reacciones de doble desplazamiento y esterificación combinadas comprende sulfato de amonio (AMS).

FIG. 13A, 13B y 13C. Comparación de cristales de ácido succínico resultantes de la acidificación en una etapa y en dos etapas del caldo de fermentación que contiene succinato de amonio. La Figura 13A proporciona la comparación de los procedimientos de acidificación en una etapa y en dos etapas en términos de rendimiento y pureza de ácido succínico. Mientras el rendimiento de cristales de ácido succínico no lavados es comparable bajo ambos procedimientos, la pureza en base seca de los cristales de ácido succínico es aproximadamente 12% superior bajo el procedimiento de acidificación en dos etapas en comparación con el procedimiento de acidificación en una etapa. La Figura 13B proporciona la comparación del nivel de impurezas de amonio y azufre en los cristales de ácido succínico obtenido mediante procedimientos de acidificación en una etapa y en dos etapas. La Figura 13C proporciona la comparación del nivel de impurezas de ácido aspártico, ácido glutámico y alanina en los cristales de ácido succínico obtenidos mediante el procedimiento de acidificación en una etapa y el procedimiento de acidificación en dos etapas. En las Figuras 13A, 13B y 13C, el procedimiento de acidificación en una etapa es referido como procedimiento de "Cristalización Normal".

FIG. 14. Efecto de la concentración de la sal de ácido succínico en el rendimiento de cristales de ácido succínico bajo el procedimiento de acidificación en una etapa y el procedimiento de acidificación en dos etapas. El caldo de fermentación que contiene succinato de amonio fue evaporado y sometido a ultrafiltración y la concentración de sal de ácido succínico fue determinada en el permeato a partir de la etapa de ultrafiltración. En esta Figura, el procedimiento de acidificación de una etapa es referido como "Cristalización Normal".

FIG. 15. Análisis de composición y de tamaño de partículas de los cristales de ácido succínico obtenidos ya sea mediante un procedimiento de acidificación en una etapa o un procedimiento de acidificación en dos etapas. La Figura 15A proporciona el nivel de impurezas de amonio y azufre en los cristales de ácido succínico obtenidos a partir de un procedimiento de acidificación en una etapa (1 etapa) y un procedimiento de acidificación en dos etapas (2 etapas de pH). La Figura 15B proporciona el nivel de impurezas de diversos aminoácidos en cristales de ácido succínico obtenidos a partir de un procedimiento de acidificación en una etapa (1 etapa) y un procedimiento de acidificación en dos etapas (2 etapas de pH). La Figura 15C proporciona la distribución del tamaño de partículas de los cristales de ácido succínico obtenidos a partir de un procedimiento de acidificación en una etapa (1S) y un procedimiento de acidificación en dos etapas (2S).

Como se utiliza en esta invención, la expresión "bio-ácido succínico" significa ácido succínico derivado de fuentes de carbono renovables a través de procedimientos de fermentación que involucran biocatalizadores. El ácido succínico es acumulado en el caldo de fermentación como una sal de ácido succínico la cual es sometida a un procedimiento corriente abajo para recuperar ácido succínico.

Como se utiliza en esta invención, el término "bio-BDO" significa BDO derivado de una reacción de hidrogenación que involucra bio-ácido succínico como un material de partida. En la primera etapa del procedimiento para producir bio-BDO, el bio-ácido succínico es esterificado para producir éster de bio-ácido succínico que es utilizado a su vez como un sustrato en la reacción de hidrogenación para producir bio-BDO.

Como se utiliza en esta invención, el término "evaporación" significa someter una solución acuosa a temperaturas elevadas para reducir el contenido de agua de la solución acuosa. El procedimiento de evaporación es preferiblemente llevado a cabo bajo vacío.

Como se utiliza en esta invención, el término “concentración” significa reducir el contenido de disolvente de una solución acuosa con referencia a su contenido de soluto.

Como se utiliza en esta invención, el término “acidificación” significa agregar un ácido a una solución acuosa para reducir el pH de dicha solución acuosa. La acidificación del caldo de fermentación que contiene una sal de ácido succínico de acuerdo con la presente invención puede lograrse ya sea en una única etapa o en dos etapas. La acidificación del caldo de fermentación realizada en una única etapa es referida como “acidificación en una etapa” o “proceso de cristalización normal”. Cuando el caldo de fermentación que contiene una sal de ácido succínico es acidificado en dos etapas, este es referido como “acidificación en dos etapas”. En el procedimiento de acidificación en dos etapas, inicialmente el pH del caldo de fermentación cae desde pH 6,5 hasta un punto intermedio (típicamente alrededor de pH 2,8-3,0) seguido por una etapa de cristalización controlada. Los cristales formados mediante la primera etapa del procedimiento no son cosechados, sino que son utilizados como siembra de la segunda etapa donde el pH de la solución cae adicionalmente hasta pH 2,2-2,5 y se separa más ácido succínico por cristalización a medida que baja la temperatura.

Como se utiliza en esta invención, el término “cristalización” significa precipitar soluto disuelto en una solución acuosa por medio de variación de la temperatura de la solución acuosa.

Como se utiliza en esta invención, el término “cristalización controlada” significa precipitar soluto disuelto en una solución acuosa por medio de variación de la temperatura de la solución acuosa con una velocidad predefinida.

Como se utiliza en esta invención, el término “filtración” significa la remoción de material particulado en una solución mediante el pasaje de la solución a través de un filtro grueso para retener la materia particulada. El proceso de filtración es llevado a cabo ya sea bajo flujo gravitacional o por presión diferencial a través de las membranas.

Como se utiliza en esta invención, la expresión “primera cristalización” significa la recuperación del ácido succínico a partir del caldo de fermentación que contiene succinato de amonio siguiendo una etapa de acidificación. La etapa de acidificación involucra la adición de un ácido al caldo de fermentación que contiene succinato de amonio para llevar el pH del caldo de fermentación a 2,4 o menos.

Como se utiliza en esta invención, la expresión “segunda cristalización” significa la recuperación de sulfato de amonio o fosfato de amonio a partir del licor madre resultante de la remoción de ácido succínico en la primera etapa de cristalización. Para comenzar, se utiliza un caldo de fermentación que contiene succinato de amonio. Cuando se utiliza ácido sulfúrico en la etapa de acidificación, se recupera sulfato de amonio en la etapa de segunda cristalización. Por otra parte, cuando se utiliza ácido fosfórico en la etapa de acidificación, se recupera fosfato de amonio en la etapa de segunda cristalización.

Como se utiliza en esta invención, la expresión “intercambio de sal” significa precipitar succinato de amonio a partir de un caldo de fermentación que comprende succinato de amonio disuelto con la adición de metanol. El precipitado de succinato de amonio resultante es recuperado ya sea mediante filtración o centrifugación.

Como se utiliza en esta invención, la expresión “desdoblamiento de sal” significa una reacción de doble desplazamiento en la cual el succinato de sodio es mezclado con ácido sulfúrico en presencia de metanol. La presencia de ácido sulfúrico produce la protonación del ácido succínico a partir del succinato de amonio acompañado de la formación de sulfato de amonio. El ácido succínico resultante de la reacción de doble desplazamiento simultáneamente entra dentro de una reacción de esterificación con metanol en presencia de sulfúrico como catalizador conduciendo a la acumulación de succinato de monometilo y succinato de dimetilo. Dependiendo de la velocidad de la reacción de doble desplazamiento y de la reacción de esterificación, diversas cantidades de ácido succínico, sulfato de amonio y succinato de monometilo y succinato de dimetilo se acumulan en la mezcla de reacción al final de la reacción de desdoblamiento de sal.

Como se utiliza en esta invención, la expresión “reacción de doble desplazamiento” significa una reacción química en la cual los aniones y cationes intercambian contrapartes. Por ejemplo, en una reacción de doble desplazamiento que involucra succinato de amonio y ácido sulfúrico, un protón del ácido sulfúrico reemplaza el catión de amonio en el succinato de amonio conduciendo a la formación de ácido succínico. Simultáneamente, el catión amonio reacciona con el anión sulfato del ácido sulfúrico para formar sulfato de amonio.

Como se utiliza en esta invención, la expresión “calidad de cristales de ácido succínico” significa pureza relativa de los cristales de ácido succínico recuperados utilizando el procedimiento de acuerdo a la presente invención. Por ejemplo, el objetivo de la presente invención es recuperar cristales de ácido succínico a partir de un caldo de fermentación que contiene succinato de amonio con mínimo contenido de azufre de modo que no haya interferencia en el funcionamiento de los catalizadores que son útiles en el procedimiento siguiente corriente abajo que conduce a la producción de BDO, THF y GBL.

La presente invención proporciona un método para producir BDO, GBL y THF a partir de ácido succínico derivado de un proceso de fermentación. La Figura 1 proporciona un diagrama de flujo del proceso para la producción de ácido succínico, BDO, GBL y THF, derivados de biomasa. En una fermentación productora de ácido succínico adecuada para la presente invención, se utiliza una variedad de biocatalizadores y un amplio rango de sustratos adecuados para

fermentación microbiana. El biocatalizador adecuado para la presente invención puede derivarse de una variedad de microorganismos en el rango de bacterias Gram negativas hasta hongos incluyendo cepas de levadura. Los materiales carbohidrato adecuados para la presente invención son glucosa, sacarosa, glicerol e hidrolizados lignocelulósicos, obtenidos a partir de una variedad de materiales ricos en azúcares de seis carbonos y de cinco carbonos. Es preferible tener biocatalizadores con la capacidad para utilizar tanto azúcares de seis carbonos como de cinco carbonos simultáneamente. Una característica deseable de cualquier biocatalizador adecuado para la presente invención es que los biocatalizadores presentan un elevado título y un elevado rendimiento para la producción de ácido succínico. Las expresiones "rendimiento de ácido succínico" y "rendimiento" se refieren a moles del ácido succínico producido por mol de material de carbohidrato consumido. Las expresiones "título de ácido succínico" y "título" como se utilizan en la presente invención se refieren a la cantidad de ácido succínico producido por unidad de volumen del caldo de fermentación por unidad de período de tiempo (g/l/h). Otra característica deseable de los catalizadores adecuados para la presente invención es la capacidad de crecer en un medio mínimo de sal mineral sin la necesidad de cualquier otra fuente de nutriente adicional tal como extracto de levadura o licor de maíz fermentado. El proceso de fermentación puede ser llevado a cabo ya sea bajo condición anaeróbica o condición aeróbica o condición microaeróbica.

En el proceso de fermentación biológica para producir ácido succínico, se agregan álcalis inorgánicos y productos químicos nutrientes en traza al fermentador para mantener la condición donde los organismos pueden funcionar de manera óptima. Por ejemplo, la cepa KJ122 de *E.coli* obtenida mediante manipulaciones genéticas produce ácido succínico al más alto rendimiento cuando el pH es de aproximadamente 6,5-7,0. Con la producción de ácido succínico durante el proceso de fermentación, el pH del medio de fermentación disminuye significativamente. A fin de mantener el pH del medio de fermentación, se agregan gradualmente bases tales como hidróxido de potasio, hidróxido de sodio e hidróxido de amonio durante el transcurso de la fermentación. Como resultado, al final del proceso de fermentación, el ácido succínico se acumula en el medio de fermentación como sal de ácido succínico. Por ejemplo, cuando se utiliza hidróxido de amonio como la base neutralizante en el proceso de fermentación que involucra la cepa KJ122 de *E. coli*, el ácido succínico se acumula al final de la fermentación en la forma de succinato de diamonio. De acuerdo con la presente invención, se podrían seguir varios enfoques diferentes para recuperar el ácido succínico del caldo de fermentación que contiene sal de ácido succínico y su conversión química subsiguiente en entidades químicas deseadas tales como BDO, GBL y THF mediante reacciones químicas apropiadas.

El caldo de fermentación que contiene ácido succínico en la forma de una sal se somete a etapas de centrifugación y filtración apropiadas para liberarse de la mayor parte del material particulado en el caldo de fermentación incluyendo la masa celular y proteínas. Las etapas de centrifugación y filtración son referidas como etapa de clarificación, y el caldo de fermentación luego de la etapa de clarificación es referido como caldo de fermentación clarificado. En la recuperación de ácido succínico a partir del caldo de fermentación que contiene una sal de ácido succínico, se continúa con una etapa de acidificación. Por ejemplo, para convertir la solución diluida de succinato de amonio en ácido succínico, es necesario proporcionar una fuente de protones. Esto puede lograrse ya sea utilizando una resina de intercambio iónico o una etapa de acidificación.

Cuando se utiliza una resina de intercambio iónico en la recuperación de ácido succínico a partir del caldo de fermentación que contiene sal de ácido succínico, la sal succinato se separa sobre la superficie de la resina y dependiendo de la carga sobre la resina, el succinato o su catión contrario es retenido sobre la superficie de la resina. Por ejemplo, cuando se utiliza resina de intercambio iónico de cationes y la resina está cargada con protón, el protón de la resina es intercambiado con el catión contrario del succinato y el ácido succínico sale en el efluente.

Cuando el caldo de fermentación clarificado que contiene una sal de ácido succínico es acidificado con un ácido fuerte, el ácido succínico libre y la sal correspondiente se acumulan. Por ejemplo, cuando el caldo de fermentación que contiene succinato de amonio es acidificado con ácido sulfúrico, el ácido succínico libre y el succinato de amonio se acumulan en el caldo de fermentación. El ácido succínico necesita ser separado del sulfato de amonio y la solución remanente, contiene principalmente agua y otras impurezas tales como azúcares no convertidos, aminoácidos y nutrientes inorgánicos. Existen varias tecnologías que pueden utilizarse para purificar adicionalmente el ácido succínico.

Cuando un caldo de fermentación clarificado que contiene succinato de amonio es acidificado con un ácido fuerte, tal como ácido sulfúrico o ácido fosfórico, el ácido succínico y una sal de amonio correspondiente tal como sulfato de amonio o fosfato de amonio, se acumulan en la fase acuosa. La fase acuosa es concentrada preferiblemente bajo vacío para eliminar agua y ácidos carboxílicos volátiles, tales como ácido acético y ácido fórmico. La solución es concentrada hasta por encima del 20% en peso de ácido succínico y la cristalización de ácido succínico es llevada a cabo reduciendo la temperatura de la mezcla hasta que su solubilidad límite a la temperatura correspondiente es inferior a la concentración de ácido succínico. Mientras que el sulfato de amonio es altamente soluble en solución acuosa (Figura 5), la solubilidad de ácido succínico en agua es altamente dependiente de la temperatura. La solubilidad del ácido succínico disminuye con la disminución en la temperatura. Controlando la velocidad de enfriamiento de la solución acuosa que contiene ácido succínico, se puede controlar la solubilidad de ácido succínico lo que conduce a una cristalización controlada de ácido succínico. Esta etapa de cristalización que resulta en la formación de ácido succínico principalmente cristalino a partir del caldo de fermentación acidificado es referida como etapa de "primera cristalización" (Figura 2). La suspensión final es filtrada y los cristales de ácido succínico son secados para eliminar la humedad. Si es necesario, los cristales de ácido succínico pueden ser disueltos y

recristalizados para mejorar la pureza del ácido succínico.

Existen dos etapas esenciales para la formación de partículas mediante cristalización, a saber, nucleación y crecimiento de cristales. Los procesos cinéticos de nucleación y crecimiento de cristales requieren sobresaturación. No obstante, la sobresaturación excesiva normalmente conduce a grandes cantidades de cristales de pequeño tamaño y mala morfología del cristal lo que impacta negativamente en las etapas de procesamiento corriente abajo, tales como centrifugación/filtración, secado, molienda, manipulación de sólidos y medios para evitar la formación de tortas de producto. La más grande área superficial de los cristales de pequeño tamaño a menudo atrapa más licor madre con impurezas. Los crecientes requerimientos de más elevada pureza, distribución de tamaño de cristales y morfología de los cristales del producto, han depositado nuevas demandas sobre los procesos de cristalización. Controlar el nivel de sobresaturación durante la cristalización es un factor clave en la determinación de la morfología del cristal. La cristalización es más comúnmente conducida utilizando evaporación o enfriamiento controlado. En esta invención, se proporciona un método para utilizar el pH como una herramienta para controlar el proceso de cristalización.

En un proceso normal para la recuperación de ácido succínico a partir de un caldo de fermentación que comprende sal de ácido succínico, la acidificación del proceso de fermentación es llevada a cabo en una única etapa para dar ácido succínico para el proceso de cristalización. En este proceso normal para acidificación, el pH deseado de 2,2 a 2,4 se logra en una única etapa seguida de la cristalización del ácido succínico resultante. En la presente invención, se proporciona una acidificación en dos etapas del caldo de fermentación que comprende ácido succínico para controlar el nivel de sobresaturación durante el proceso de cristalización. En la primera etapa del proceso de acidificación de acuerdo con la presente invención, el pH del caldo de fermentación es reducido hasta pH 2,5 a 3,5 seguido por la primera etapa de cristalización. Subsiguientemente, el pH del caldo de fermentación es reducido aún más hasta pH 2,0 a 2,5 seguido por la segunda etapa de cristalización (Figura 3). En otro aspecto de la presente invención, es posible llevar a cabo la acidificación en más de dos etapas para mejorar aún más la calidad de los cristales de ácido succínico formados. La acidificación que conduce al ajuste de pH puede realizarse dentro del cristizador o en los circuitos de disolución de cristales de pequeño tamaño. Si la acidificación es realizada en el circuito de disolución de cristales de pequeño tamaño, la reacción exotérmica resultante del proceso de acidificación ayudará a disolver los cristales de pequeño tamaño en lugar de utilizar vapor de agua.

Los cristales de ácido succínico son separados del licor madre utilizando centrifugación. El cristal de ácido succínico sólido es disuelto en metanol para eliminar cualquier sulfato de amonio remanente. El sulfato de amonio tiene una solubilidad mucho más baja en metanol y puede ser recuperado como precipitado sólido a partir de una solución metanólica. El ácido succínico es completamente disuelto en metanol. El ácido succínico en solución metanólica se somete a reacción de esterificación lo que conduce a la formación de succinato de dimetilo que es adicionalmente purificado mediante destilación fraccionada.

El licor madre obtenido después de la eliminación de ácido succínico cristalino sólido es adicionalmente concentrado mediante evaporación a elevada temperatura bajo vacío y sometido a reacción de cristalización a temperatura más baja para precipitar sulfato de amonio. Esta etapa de cristalización es referida como etapa de "segunda cristalización". Dependiendo del nivel de ácido succínico remanente en el licor madre luego de la etapa de primera cristalización, el precipitado de succinato de amonio resultante de la etapa de segunda cristalización puede tener cierto nivel de cristales de ácido succínico. El ácido succínico en el precipitado de sulfato de amonio puede ser recuperado disolviendo en metanol el precipitado de la reacción de segunda cristalización. Mientras que el ácido succínico es completamente soluble en metanol, el sulfato de amonio es relativamente insoluble en metanol. El sulfato de amonio es recuperado como un precipitado blanco mientras que el ácido succínico permanece completamente disuelto en metanol. El sulfato de amonio obtenido a partir de la etapa de disolución en metanol puede ser utilizado como fertilizante o puede ser sometido a degradación térmica para producir amoníaco y ácido sulfúrico que puede reciclarse dentro del proceso para recuperar ácido succínico a partir del caldo de fermentación (Figura 4).

Cuando se utiliza ácido fosfórico como agente acidificante, se recupera fosfato de amonio como co-producto, que puede ser utilizado como fertilizante o sometido a degradación térmica para dar ácido fosfórico utilizado en el proceso para recuperar ácido succínico a partir del caldo de fermentación que contiene succinato de amonio (Figuras 6A, 6B, 7 y 8).

El ácido succínico así recuperado a partir del caldo de fermentación mediante un proceso de acidificación como se describió anteriormente, se somete a un procesamiento químico adicional corriente abajo como se describe a continuación, para obtener los productos químicos deseados tales como BDO, GBL y THF. El proceso comienza con la esterificación de ácido succínico en presencia de un catalizador de esterificación. En un aspecto de la presente invención, la esterificación es llevada a cabo en ausencia de cualquier catalizador de esterificación exógeno y dicho proceso de esterificación es referido como reacción de esterificación autocatalítica.

El carbonato de dimetilo (DMC) se ha vuelto muy atractivo como agente de alquilación en años recientes como una alternativa no tóxica y más ambientalmente benigna. El DMC puede ser utilizado para esterificación de ácidos carboxílicos en lugar de metanol con niveles de desempeño similares en la reacción. El producto secundario de la esterificación de ácido succínico con DMC es CO_2 , que puede ser reciclado a la fermentación de ácido succínico.

El catalizador de esterificación adecuado para el presente propósito puede ser un catalizador heterogéneo u

homogéneo. La reacción de esterificación puede realizarse utilizando una variedad de catalizadores que incluyen zeolitas (X, Y, L, beta, ZSM-5, etc.), óxidos de metal cristalinos y amorfos (sílice y alúmina), zeolitas modificadas con álcalis (Na, K, Li, Cs, Ru, La, etc.), óxidos de metal y zeolitas modificados con aniones (SO₄, PO₄, BO₃, etc.), resinas catiónicas (Amberlyst-15, Amberlyst-70 etc.), hidróxidos alcalinos (NaOH, NH₄OH, KOH, etc.) y alcóxidos alcalinos. El éster de ácido succínico así producido puede ser purificado adicionalmente mediante destilación fraccionada. En una realización, se produce primero éster butílico de ácido succínico. Otros tipos de ésteres tales como ésteres metílico, etílico y propílico del ácido succínico pueden obtenerse a partir del éster butílico del ácido succínico mediante un proceso de transesterificación. Cuando la esterificación se realiza a escala industrial, puede requerir el uso de ciertos catalizadores de esterificación heterogénea. Bajo aquellas condiciones es necesario asegurar que la alimentación de ácido succínico a ser utilizada en la reacción de esterificación en presencia de dichos catalizadores heterogéneos no tenga contaminantes que puedan interferir con el funcionamiento de los catalizadores de esterificación. Por ejemplo, se sabe que ciertas resinas utilizadas en esterificación de ácidos carboxílicos a escala industrial son sensibles a ciertos contaminantes catiónicos y aniónicos del sustrato ácido carboxílico, y por lo tanto, es necesario asegurar que el ácido succínico cristalino utilizado como sustrato en la reacción de esterificación esté libre de cualquier contaminante que pueda interferir en las reacciones de esterificación de la presente invención.

De acuerdo con el presente procedimiento, el ácido succínico es esterificado con un alcohol bajo presión super atmosférica y a una temperatura elevada sustancialmente entre 100°C y 300°C. Cuando se utiliza un alcohol monohídrico inferior, la presión deberá ser suficientemente elevada para minimizar su evaporación, que de otro modo ocurriría a dicha temperatura, de modo que las reacciones se mantienen en el estado líquido en la zona de reacción. Se pueden utilizar varios alcoholes en este proceso de esterificación, especialmente los de metilo, etilo, isopropilo, butilo, hexilo, octilo y compuestos alifáticos monohídricos similares. Es preferible realizar la reacción autocatalíticamente o utilizar un catalizador homogéneo en la reacción de esterificación. Los catalizadores ácidos heterogéneos pueden ser sometidos a ensuciamiento en contacto con una corriente de ácido succínico que no ha sido purificada para remover cationes. El ácido sulfúrico, el ácido fosfórico, el ácido clorhídrico y ácidos orgánicos tales como ácido alcansulfónico y ácidos arilsulfónicos son catalizadores homogéneos adecuados. El agua formada en la reacción de esterificación es eliminada permitiendo que la mezcla de reacción caliente pase desde la zona de reacción a elevada presión hacia dentro de una zona a presión atmosférica, mediante lo cual el agua es dirigida hacia afuera.

En otra realización de la presente invención, se proporciona un nuevo procedimiento para la recuperación de ácido succínico y succinato de dimetilo a partir del caldo de fermentación que contiene succinato de amonio. En la primera etapa de este proceso, el caldo de fermentación que contiene succinato de amonio es concentrado 4-5 veces utilizando evaporación a elevada temperatura y se mezcla con metanol o etanol, lo que conduce a la precipitación de succinato de amonio. Con metanol como disolvente, el succinato de amonio es precipitado como un sólido puro cristalino blanco mientras que las impurezas originalmente presentes en el caldo de fermentación son retenidas en el licor madre (Figura 9 y 10). Por otro lado, con etanol como disolvente, el succinato de amonio es precipitado junto con la mayoría de las impurezas originalmente presentes en el caldo de fermentación. Como resultado, el succinato de amonio que contiene una fracción sólida resultante del tratamiento con etanol del caldo de fermentación es de color oscuro y el licor madre es de color claro (Figura 11).

La fracción de succinato de amonio blanco cristalino obtenida luego de la adición de metanol al caldo de fermentación puede ser re-suspendida en metanol en presencia de suficiente cantidad de ácido sulfúrico para iniciar una reacción de doble desplazamiento que conduce a la formación de ácido succínico y sulfato de amonio. Siendo el sulfato de amonio relativamente insoluble en solución de metanol se separaría por precipitación desde la fase metanol. El ácido succínico que resulta de una reacción de doble desplazamiento también sufriría una reacción de esterificación en presencia de ácido sulfúrico como catalizador, conduciendo a la formación de éster de dimetilo que puede ser adicionalmente purificado mediante destilación fraccionada (Figura 12).

Los siguientes ejemplos están incluidos para ilustrar ciertos aspectos de la presente invención, y no deberán ser vistos como realizaciones excluyentes.

Sección experimental

Aclaraciones generales

Cepa y preparaciones de inóculo: se utilizó KJ122 (*E. coli* C, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ackA$, $\Delta flocA$ -*pflB*, $\Delta mgsA$, $\Delta poxB$, $\Delta tdcDE$, $\Delta citF$, $\Delta aspC$, $\Delta sfcA$) en la presente invención. KJ122 fue derivada de la cepa de *E. coli* C (ATCC 8739) mediante modificaciones genéticas como se describe en Jantama *et al* (2008a; 2008b) y en las Solicitudes de Patente publicadas bajo el Tratado de Cooperación en materia de Patentes con los Nos. de Publicación Internacional WO 2008/115958 y WO 2010/115067.

La cepa de *E. coli* KJ122 es capaz de fermentar el 10% de glucosa en medio mineral AM1 para producir 88 g/l de succinato, normalizado por adición de base, en 72 horas. El medio AM1 contiene 2,63 g/l de (NH₄)₂HPO₄, 0,87 g/l de NH₄H₂PO₄, 1,5 mM de MgSO₄, 1,0 mM de betaína, y 1,5 ml/l de elementos traza. Los elementos traza son preparados como una solución stock 1000X y contenían los siguientes componentes: 1,6 g/l de FeCl₃, 0,2 g/l de CoCl₂•6H₂O, 0,1 g/l de CuCl₂, 0,2 g/l de ZnCl₂•4H₂O, 0,2 g/l de NaMoO₄, 0,05 g/l de H₃BO₃ y 0,33 g/l de MnCl₂•4H₂O. El pH del caldo de fermentación es mantenido en 7,0 con: 1:4 (6 N de KOH: 3 M de K₂CO₃) (1,2 N de KOH, 2,4 M de K₂CO₃) o cualquier

otra base adecuada que incluya hidróxido de amonio.

En algunos experimentos, se agregó jarabe de maíz fermentado. Es un producto secundario de la industria de molienda en húmedo de maíz. Comparado con el extracto de levadura y la peptona, es una fuente económica de vitaminas y elementos traza.

- 5 Análisis de ácido orgánico y azúcar: Se midió la concentración de diversos ácidos orgánicos y azúcares mediante HPLC. El ácido succínico, los azúcares y otros ácidos orgánicos presentes en el caldo de fermentación fueron analizados en un aparato para HPLC Agilent 1200 con una columna HPX-87H BioRad Aminex. Se utilizó BioRad Microguard Cation H⁺ como guarda columna. Los estándares para análisis de HPLC fueron preparados en ácido sulfúrico 0,008N. La temperatura de la columna de HPLC fue mantenida a 50°C. Se utilizó ácido sulfúrico a una concentración de 0,008N como fase móvil a un caudal de 0,6 ml/min. La cuantificación de diversos componentes se realizó midiendo su absorción a 210 nm. La cuantificación de azúcares y otros componentes se realizó utilizando un detector de índice de refracción.

- 15 Determinación de azufre y contenido de fósforo utilizando Espectrometría de Emisión Óptica por Plasma acoplado Inductivamente (ICP-OES, por sus siglas en inglés: *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*). Las muestras derivadas de los diversos procesos de acuerdo con la presente invención pueden ensayarse utilizando Espectrometría de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente. Las muestras se diluyen a menos del 5% de orgánicos utilizando ácido nítrico grado 2% de metal traza. La ICP-OES produce una curva que está en el rango desde 0,05ppm a 10ppm, así la muestra se diluye de modo que la concentración de la molécula diana cae entre estas concentraciones. Si la muestra contiene cualesquiera matrices complejas o líquidos insolubles, son digeridos o hechos ceniza previo a ser disueltos. Las muestras son luego ubicadas en un muestreador automático conectado al ICP-OES, con un control de calidad en las posiciones primera, media y última. El ICP-OES analizará luego los estándares, generará una curva de calibración y analizará las muestras. El software luego calculará las ppm para cada sustancia detectada, y a partir de allí la concentración inicial de la sustancia puede ser determinada en base al factor de dilución cuando la muestra fue preparada.

- 25 Determinación de cloruros, sulfatos, fosfatos y amonio utilizando Cromatografía Iónica (IC, por sus siglas en inglés: *Ion Chromatography*). Se puede cuantificar la concentración de amonio y diversos aniones utilizando cromatografía iónica. Las muestras fueron analizadas utilizando un instrumento de cromatografía iónica Dionex 1100 con un muestreador automático AS-DV. Los estándares de 0,04 a 30ppm son preparados en agua desionizada y se genera una curva de calibración, previo a cada operación. Las muestras se diluyen de modo que el analito de interés cae dentro de la curva de calibración. Para el análisis de amonio, se utiliza una columna CS16 Dionex con una guarda columna CG16 y un supresor CSRS400. Se utiliza ácido metansulfónico 35mM como eluyente. Para el análisis de cloruro, sulfato y fosfato, se utiliza una columna AS17-HC Dionex con una guarda columna AG17-HC y un supresor ASRS400. Se utiliza hidróxido de sodio 28mM como eluyente para el análisis de cationes. La cuantificación se realiza midiendo la respuesta en la conductividad de cada componente.

- 35 Determinación de aminoácidos. Los aminoácidos se miden mediante HPLC. Las muestras fueron analizadas en un HPLC Agilent 1100 con derivatización en línea y un detector fluorescente. Se utiliza una columna Phenomenex Gemini C18 con un buffer de fosfato y un gradiente de disolvente para eluir los compuestos. Las muestras y los estándares se diluyen con ácido clorhídrico 0,1M y se derivatizan con reactivo OPA previo a la inyección. La cuantificación de aminoácidos se realiza midiendo la respuesta desde un detector de fluorescencia con excitación a 338nm y emisión a 450nm.

Ejemplo 1

Producción fermentativa de ácido succínico

- Se inoculó la cepa de *E. coli* KJ122 en un medio mínimo que consiste de NBS, 100 mM de MOPS, 2% de glucosa, 1mM de MgSO₄, elementos traza y 0,1 mM de CaCl₂ a 37°C. Una vez que la densidad celular ha alcanzado una OD = 5, los inóculos fueron transferidos a un fermentador conteniendo medio inicial que consiste de 25mM de KH₂PO₄, 3 mM de MgSO₄, 2 mM de betaína y 8 ppm de antiespumante 204. Se realizó la fermentación en un modo de lote alimentado con glucosa como fuente de carbohidrato. A medida que el ácido succínico se iba produciendo, se medía una solución de NH₄OH 7M y NH₄HCO₃ 3M dentro del fermentador para mantener el pH a aproximadamente 6,5-7 y para proporcionar una fuente para el CO₂. Luego de 48 horas, se completó la fermentación. Se eliminó la biomasa mediante una unidad de microfiltración por flujo tangencial. La composición de caldo filtrada se muestra en la Tabla 1.

Ejemplo 2 (Ejemplo de referencia, fuera del alcance de la invención)

Acidificación del caldo de fermentación y recuperación de cristales de ácido succínico - 1

- El caldo de fermentación de succinato de diamonio preparado en el Ejemplo 1 se utilizó en este experimento. Se utilizaron 49ml de ácido sulfúrico 36,25N para acidificar 1200ml de caldo de fermentación hasta pH 2,0. Luego, 1010g del caldo acidificado se evaporaron en un evaporador rotatorio bajo vacío a 70°C para obtener 330g de caldo concentrado. El condensado fue analizado y se encontró que contenía 0,8 g/l de ácido acético. El caldo concentrado fue enfriado mediante un perfil de enfriamiento escalonado a una velocidad de -5°C cada 30 minutos en un agitador

orbital configurado a 200 rpm. Se filtró el cristal bajo vacío para obtener 55,75g de cristales húmedos. El cristal fue subsiguientemente lavado con 25ml de agua desionizada y secado durante la noche a 50°C. Este proceso corresponde al proceso ilustrado en la Figura 2 como "Diagrama de flujo 1". Se calculó la recuperación de ácido succínico como el cristal en un 53%. La composición del cristal seco fue analizada y se muestra en la Tabla 2. Los cristales presentaron muy alta pureza de ácido succínico del 95,9%. Las impurezas consisten de 0,17% en peso de ión amonio y 0,22% en peso de azufre.

Ejemplo 3 (Ejemplo de referencia, fuera del alcance de la invención)

Acidificación del caldo de fermentación y recuperación de cristales de ácido succínico - 2

El caldo de fermentación de succinato de diamonio preparado en el Ejemplo 1 se utilizó en este experimento. Se concentraron 1038g del caldo en un evaporador rotatorio hasta 416g bajo vacío. Algunos sólidos marrones se separaron de la solución por precipitación. Se analizó el condensado y se encontró que contenía 2,8 g/l de amoníaco. El caldo concentrado se dividió en tres porciones. La porción 1 (99,92g) fue filtrada para remover sólidos y luego fue acidificada con 8ml de H₂SO₄ 36,25N hasta pH 2,0. La porción 2 (84,66g) fue acidificada con 8ml de H₂SO₄ 36,25N hasta pH 2,0. La porción 3 fue guardada como referencia. Durante la etapa de acidificación, se comenzó a formar precipitado blanco a pH 5,2 y más salió de la solución a medida que el pH cayó aún más. Luego de dejar enfriar la solución hasta temperatura ambiente, se filtraron los precipitados de las porciones 1 y 2 y cada uno fue lavado con 10ml de agua desionizada. Los sólidos se secaron durante la noche a 50°C. El análisis de composición de estos sólidos se muestra en la Tabla 2. En comparación con el Ejemplo 2, esta configuración del procedimiento utiliza menos ácido sulfúrico para llevar el pH de la solución hasta 2,0. Este procedimiento corresponde al procedimiento ilustrado en la Figura 2 como "Diagrama de flujo 2a". Se cree que dado que el amoníaco fue eliminado como un condensado, se requiere menos ácido para reducir el pH de la solución, lo cual es muy deseable desde un punto de vista económico. No obstante, la pureza del cristal fue menor. La Porción de Cristal 1, que había sido filtrada luego de la evaporación presentó una pureza del 90% en peso de ácido succínico, mientras que la Porción de cristal 2 presentó una pureza de solamente el 82% en peso. La etapa de filtración luego de la evaporación claramente ayudó a purificar los cristales sustancialmente; las cantidades de ión amonio, azufre, fósforo, ión potasio, y aminoácido son sustancialmente menores.

Ejemplo 4 (Ejemplo de referencia, fuera del alcance de la invención)

Acidificación del caldo de fermentación y recuperación de cristales de ácido succínico

El caldo de fermentación de succinato de diamonio preparado en el Ejemplo 1 se utilizó en este experimento. Se concentraron 1010g del caldo bajo presión reducida a 70°C en un evaporador rotatorio hasta 264g. Se analizó el condensado y se encontró que contenía 2,1 g/l de amoníaco. Algunos sólidos marrones se separaron de la solución por precipitación. No obstante, el caldo no se filtró. La solución se acidificó con 34,85ml de H₂SO₄ 36,25N hasta el pH de 2,07. Luego, se llevó a cabo una cristalización controlada en un agitador orbital enfriando a una velocidad de 5°C cada 30 minutos hasta temperatura ambiente. Se filtró el cristal y se lavó con 40ml de agua desionizada y luego se secó a 50°C durante la noche. La composición del cristal se muestra en la Tabla 2. Realizando una etapa de cristalización con enfriamiento adecuadamente controlado, el cristal de ácido succínico tuvo sorprendentemente una muy elevada pureza del 99% en peso de ácido succínico, incluso sin una etapa de filtración luego de la evaporación. La cantidad de reducción en ión amonio, azufre, fósforo y aminoácidos es superior a 10 veces. Este procedimiento corresponde al procedimiento ilustrado en la Figura 2 como "Diagrama de flujo 2b".

Los usos de ácido sulfúrico y las calidades del cristal de estos tres diagramas de flujo se comparan en la Tabla 2. Los resultados mostraron que los Diagramas de flujo 2a y 2b utilizaron menos ácido sulfúrico que aquel del Diagrama de flujo 1 para ajustar el pH hasta 2. En términos de la pureza del cristal, el Diagrama de flujo 2a tuvo la más alta cantidad de impurezas incorporadas dentro del producto final. Esto probablemente se debe al hecho de que el ácido succínico fue separado por precipitación de un modo no controlado y el licor madre que porta impurezas fue atrapado dentro del precipitado. Con una etapa de recristalización controlada en el Diagrama de flujo 2b, la calidad del cristal fue grandemente mejorada. Los resultados sugieren que es deseable primero concentrar la muestra, seguido de acidificación y recristalización.

Ejemplo 5

Efecto de la temperatura sobre la formación de ácido succinámico

Se preparó una solución acuosa al 10% en peso de succinato de diamonio sintético mediante disolución de ácido succínico grado reactivo en agua y luego se agregó amoníaco acuoso a la solución. Se cargaron 45ml de la solución bajo presión atmosférica dentro de un recipiente de 75ml de un reactor Multi-Parr modelo 5000. La solución se calentó hasta diversas temperaturas y se mantuvo durante un período de tiempo. Luego de esto, la solución fue enfriada inmediatamente haciendo correr agua para enfriamiento a través de un dedo frío. Luego el contenido del reactor fue vaciado y se analizó la composición del producto. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Estos resultados mostraron que la temperatura creciente y la duración de la exposición puede incrementar la formación de sub-productos de amida. El procedimiento de acuerdo con esta invención recomienda que el proceso de evaporación sea realizado bajo presión reducida, lo que será ventajoso para reducir la pérdida de rendimiento de ácido succínico como

amidas.

Ejemplo 6

Cristalización en bruto de ácido succínico en caldo de fermentación de gran volumen

Las muestras líquidas 1 y 2 fueron obtenidas a partir de una operación de fermentación de gran volumen (85.000 litros) utilizando la cepa KJ122 como se describió en el Ejemplo 1. La muestra líquida 1 es caldo de fermentación de succinato de diamonio luego de centrifugación para separar masa celular. La muestra líquida 2 es caldo de fermentación de succinato de diamonio luego de centrifugación y una etapa de acidificación con ácido sulfúrico hasta pH 4,5. Aproximadamente 45kg de cada muestra líquida se utilizaron para generar cristal de succínico bruto utilizando los siguientes procedimientos: (1) aproximadamente 45kg de cada muestra se concentraron ~3x mediante evaporación a presión reducida. (2) El succinato de amonio concentrado fue filtrado mediante una prensa filtro utilizando membranas de 5-micrómetros y 0,5-micrómetros. (3) El material filtrado fue luego particionado en lotes de 4kg para acidificación hasta pH=2 con H₂SO₄ 96%; esto se realizó en botellas Pyrex de 5L utilizando una barra agitadora para agitación. (4) Se llevó a cabo el calentamiento y la recristalización en un incubador agitador Innova-43 a 150rpm y a una temperatura inicial de 70°C. El incubador agitador fue programado para dejar caer la temperatura en 10°C por hora a fin de llevar a cabo el enfriamiento lento. (5) Los cristales precipitados y el licor madre de cada lote de acidificación/cristalización se agruparon juntos en un Reactor con filtro encamisado de 20L para completar la filtración. Se utilizó vacío para empujar al licor madre a través de un filtro de Teflon hacia adentro de un contenedor. Los cristales se lavaron con agua desionizada y luego se dejaron secar durante varias horas bajo vacío. (6) Luego del secado, los cristales fueron cosechados desde el reactor. El balance de masa se resume en la Tabla 4. Las composiciones de los cristales brutos se muestran en las Tablas 5 y 6.

Ejemplo 7

Acidificación del caldo de fermentación y recuperación de cristales de ácido succínico

El caldo de fermentación de succinato de diamonio preparado en el Ejemplo 1 se utilizó en este experimento. Se utilizó ácido sulfúrico 36,25N para ajustar el caldo hasta pH 2,4. El caldo con pH ajustado se hizo pasar luego a través de un filtro de 0,5 micrómetros. Luego se evaporaron 1600ml del caldo acidificado en un evaporador rotatorio bajo vacío a 70°C para obtener 440ml de caldo concentrado. El condensado fue analizado y se encontró que contenía 8 g/l de ácido acético. El caldo concentrado se enfrió mediante un perfil de enfriamiento escalonado a una velocidad de -5°C cada 30 minutos en un agitador orbital configurado a 200 rpm. El cristal fue filtrado bajo vacío para obtener 74,2g de cristales húmedos. El cristal fue subsiguientemente lavado con 25ml de agua desionizada y secado durante la noche bajo vacío. La recuperación de ácido succínico como el cristal se calculó en 73%. La composición del cristal seco fue analizada y se muestra en la Tabla 7. Los cristales presentaron muy elevada pureza de ácido succínico del 99%.

Ejemplo 8

Recuperación de sulfato de amonio a partir de licor madre utilizando metanol

El caldo de fermentación de succinato de diamonio preparado en el Ejemplo 1 se utilizó en este experimento. Los cristales de ácido succínico fueron recuperados siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 7. El filtrado luego de remover los cristales de ácido succínico contenían 423g de licor madre. Este licor madre fue evaporado en un evaporador rotatorio bajo vacío a 70°C para obtener 215g de suspensión concentrada. La suspensión fue filtrada bajo vacío para obtener 83g de cristales húmedos. Los cristales húmedos tenían una composición de 15% en peso de ácido succínico y 72% en peso de sulfato de amonio. Los cristales húmedos fueron mezclados con 200ml de metanol y filtrados bajo vacío para obtener 54g de cristales. La composición de los cristales y el filtrado metanólico fueron analizados y los resultados se muestran en la Tabla 7. Los cristales finales de AMS presentaron una elevada concentración de sulfato de amonio con <1% de impurezas, 0,2% de ácido succínico.

Ejemplo 9

Formación de ésteres succinato de metilo a partir de filtrado con metanol

El filtrado metanólico del Ejemplo 8 fue combinado con 20g de Amberlyst 36 y calentado durante 6hs a 60°C bajo presión atmosférica. Luego del calentamiento, el líquido final fue analizado y la composición fue de 71g/l de succinato de dimetilo, 14g/l de succinato de monometilo y 0,5 g/l de ácido succínico.

Ejemplo 10

Acidificación de succinato de amonio mediante H₃PO₄ y recuperación de cristales de ácido succínico

La solución de succinato de diamonio preparada disolviendo 258 g/l de succinato de amonio (equivalente a 200 g/l de SAC) a 60°C fue titulada con ácido fosfórico concentrado hasta pH 2,0, 2,5 y 3,0 y se llevó a cabo una cristalización controlada en un agitador orbital enfriando a una velocidad de -5°C cada hora, hasta temperatura ambiente. El cristal de ácido succínico resultante se filtró y se analizó. La composición del cristal de ácido succínico resultante de la

acidificación con ácido fosfórico se muestra en la Tabla 8. Como resultado de seguir un procedimiento de cristalización con enfriamiento controlado, el cristal de ácido succínico resultante tuvo muy poco difosfato de amonio (ADP) incluso sin una etapa de enjuague con agua. Dado que el ADP tiene alta solubilidad en agua (~ 55% a 25°C), el licor madre puede retener aproximadamente la mitad de su peso de ADP. El enjuague con agua de los cristales de ácido succínico debería aplicarse dado que mejora la calidad de los cristales de ácido succínico.

Dado que el ácido fosfórico tiene tres valores de pKa, es decir, $pK_{a1} = 2,1$, $pK_{a2} = 7,2$, $pK_{a3} = 12,3$, el ácido succínico tiene dos $pK_{a1} = 4,2$, $pK_{a2} = 5,6$, teóricamente solo el 1^{er} protón del H_3PO_4 puede ser utilizado para protonar el succinato. La curva de titulación (Figura 6) muestra claramente que es necesario el doble de la cantidad de H_3PO_4 a ácido succínico para llevar al succinato de diamonio desde pH neutro hasta pH 2,5. Los resultados analíticos confirmaron que el fosfato generado en solución es difosfato de amonio (ADP).

La Tabla 8 muestra los resultados de la recuperación de los cristales de ácido succínico a partir de la solución de fosfato a pH 2, pH 2,5 y pH 3. El ácido succínico libre tiene mucho menos solubilidad en agua que su sal de diamonio. Cuando el pH está 1 unidad por debajo del 1^{er} pKa de un ácido orgánico, aproximadamente 10% del ácido orgánico está en su forma de sal. Si el pH está 2 unidades por debajo del 1^{er} pKa de un ácido orgánico, solo aproximadamente el 1% del ácido orgánico está en su forma de sal. Dado que el 1^{er} valor de pKa del ácido succínico es 4,2, si la solución es acidificada hasta 2,2, 99% del ácido succínico estará en la forma de ácido libre, lo que será mucho más fácil para cristalizar. La Tabla 8 muestra que cuando la cristalización es llevada a cabo a pH 3,0, 10,18 g de succinato aún permanecieron en solución y solo se alcanzó el 42% de rendimiento de la cristalización. No obstante, cuando los valores de pH se ajustaron a 2 y 2,5, el rendimiento del cristal de SAC fue de 69% y 58%, respectivamente. Por estas razones, se sugiere que es mejor mantener la cristalización a escala industrial de ácido succínico alrededor de un rango de pH preferencial de pH 2,0 a pH 2,5.

Ejemplo 11

Intercambio de sal y formación de sólidos

Se concentraron 2L de caldo de fermentación en un evaporador rotatorio bajo vacío. La composición química de la alimentación introducida dentro del evaporador, del concentrado recuperado del evaporador y del concentrado desde el evaporador se muestran en la Tabla 9. La corriente de condensado mostró 2,96 g/l de ión NH_4^+ y <10 ppm de otros iones. Se observó que la pérdida de ión NH_4^+ a la corriente de condensado fue 9% en peso. La corriente de concentrado mostró pequeña formación del sub-producto succinimida.

Se utilizó una muestra de 50 ml del concentrado recuperado del evaporador para el procedimiento de intercambio de sal en la etapa siguiente. Esta muestra de 50 ml del concentrado recuperado del evaporador tenía 32,19 g de succinato de diamonio. Se utilizó metanol para la separación por precipitación de sólidos del concentrado recuperado desde el evaporador. Se ensayaron distintas relaciones en peso de metanol a succinato de diamonio teóricamente presente en el concentrado recuperado desde el evaporador, para entender la efectividad de la precipitación bajo diferentes cargas de disolvente. Esta etapa es referida como precipitación por disolvente o intercambio de sal de insolubles utilizando un disolvente. Este método está destinado a explotar la baja solubilidad de las sales de amonio en alcohol.

Las relaciones en peso metanol: succinato de diamonio 2x, 3x y 4x fueron ensayadas en tres diferentes vasos de precipitados. Se utilizaron 3 vasos de precipitados con diferente cantidad de concentraciones de metanol 64,38g, 96,57g & 128,77g representando las relaciones 2x, 3x & 4x, respectivamente, se agregaron a 50 ml de concentrado recuperado del evaporador y las soluciones fueron agitadas sobre una placa caliente a temperatura ambiente durante 2 horas. Este tiempo fue suficiente para separar por precipitación los sólidos a partir de la solución de succinato de diamonio que dieron por resultado una suspensión que fue separada en una corriente sólida y una líquida utilizando filtros a vacío Nalgene® de 0,22 micrómetros. Los sólidos y los líquidos fueron pesados y analizados. Las masas de sólidos recolectados para las muestras con relación 2x, 3x, & 4x fueron 26,64g, 32,08g y 22,18g, respectivamente, mientras que las masas de filtrado recolectadas para las muestras con relaciones 2x, 3x y 4x fueron 93,76g, 120,17g y 160,14g, respectivamente. Este filtrado puede ser enviado a una etapa de destilación para la recuperación del metanol. El agua puede también ser recuperada o reciclada nuevamente hacia la corriente diluida de succinato de diamonio, antes de la etapa de concentración.

A partir del análisis de composición se determinó que una recuperación de succinato de amonio de única pasada en la etapa de precipitación fue 64%, 62% y 60% para relaciones en peso metanol: succinato de diamonio 2x, 3x y 4x respectivamente (Tabla 10 y 11). Estos números de recuperación han sido observados para una precipitación de única pasada sin reciclado del filtrado, estos deberían mejorar a medida que las proporciones de reciclaje se aumentan.

Los sólidos recolectados en la etapa de precipitación de experimentos previos a partir de relaciones en peso metanol:caldo de succinato de diamonio 2x, 3x y 4x fueron combinados conjuntamente para componer la alimentación para la etapa siguiente conocida como la etapa de reacción de desdoblamiento de sal. En esta etapa, el sólido succinato de diamonio es re-suspendido en metanol, la reacción es catalizada utilizando un ácido mineral para desdoblar la sal succinato de diamonio en un ácido succínico y una sal inorgánica. En el presente caso se ha suspendido sal succinato de diamonio en metanol en presencia de ácido sulfúrico 98%, que desdobla la sal succinato de amonio para formar ácido succínico y sulfato de amonio (AMS). El AMS es una sal inorgánica que tiene baja

solubilidad en metanol y por lo tanto se separa de la solución por precipitación. El ácido succínico liberado durante la etapa de desdoblamiento de sal experimenta una esterificación en presencia de ácido sulfúrico como catalizador, lo que conduce a la formación de succinato de dimetilo.

Ejemplo 12

5 Cristalización de ácido succínico mediante un proceso de acidificación en dos etapas

El caldo de fermentación que comprende succinato de amonio fue sometido a centrifugación y evaporación, seguido de una etapa de ultrafiltración. El permeato de la etapa de ultrafiltración fue concentrado hasta 250,4 g/l de equivalente de ácido succínico y sometido a un proceso de acidificación en una etapa o en dos etapas. Bajo el proceso de acidificación en una etapa, el pH del caldo de fermentación se llevó hasta pH 2,2 a 2,4 en una única etapa y el precipitado resultante fue redissuelto elevando la temperatura hasta 80°C. Subsiguientemente, la temperatura del caldo de fermentación acidificado fue gradualmente disminuida hasta 30°C a la velocidad de 5°C/hora para iniciar el proceso de cristalización. Bajo el proceso de acidificación en dos etapas, se siguió el mismo protocolo para cristalización excepto que la acidificación se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa del proceso de acidificación en dos etapas, el pH del caldo de fermentación fue disminuido hasta pH 2,8 – 3,0 seguido de una etapa de cristalización. En la segunda etapa del proceso de acidificación en dos etapas, el pH del caldo de fermentación fue disminuido aún más hasta pH 2,2 – 2,4 seguido de una etapa de cristalización. Luego de que se completara la cristalización, se filtraron las suspensiones del proceso de acidificación en una etapa y del proceso de acidificación en dos etapas, utilizando los mismos tipos de filtros Nalgene (Filtros a vacío desechables de 2,0 µm) bajo vacío. Los cristales de ácido succínico bruto del proceso de acidificación en una etapa y del proceso de acidificación en dos etapas fueron sometidos a análisis sin ningún lavado. Ambos experimentos fueron realizados por triplicado. Los resultados de estos experimentos se brindan en la Tabla 12. La Figura 13A proporciona una comparación de rendimiento y pureza de los cristales de ácido succínico del proceso de acidificación en una etapa y del proceso de acidificación en dos etapas. La Figura 13B proporciona la comparación de las impurezas de amonio y azufre en los cristales de ácido succínico obtenidos mediante el proceso de acidificación en una etapa y el proceso de acidificación en dos etapas. La Figura 13C proporciona la comparación del nivel de ácido aspártico, ácido glutámico y alanina en los cristales de ácido succínico resultantes del proceso de acidificación en una etapa y del proceso de acidificación en dos etapas. En las Figuras 13A, 13B y 13C, el proceso de acidificación en una etapa está referido como proceso de "Cristalización Normal".

Ejemplo 13

30 Cristalización de ácido succínico mediante el proceso de acidificación en dos etapas – Efecto de la concentración de sal

Para comprender aún más el efecto de la concentración inicial de succinato de amonio en el proceso de cristalización bajo los procesos de acidificación en una etapa y en dos etapas, el caldo de fermentación que comprende succinato de amonio fue sometido a centrifugación y evaporación, seguido de una etapa de ultrafiltración. El permeato de la etapa de ultrafiltración contenía 66 gramos de sal de ácido succínico por litro. Este permeato de la etapa de ultrafiltración fue concentrado hasta seis concentraciones diferentes (184, 210, 255, 285, 316 y 360 [g/l]) utilizando un Rotovap funcionando a aproximadamente 80-90 RPM y a 70-80°C. Todas las seis muestras fueron sometidas a proceso de acidificación en una etapa o en dos etapas seguido de un proceso de cristalización como se describió en el Ejemplo 12 anteriormente. Se ensayó cada muestra bajo dos procedimientos de acidificación: cristalización en 1 etapa de pH (normal) y en 2 etapas de pH (nuevo). El ensayo fue realizado por triplicado.

Luego de que el proceso de cristalización se completó, la suspensión resultante fue filtrada utilizando filtros a vacío Nalgene (2,0 µm) a temperatura ambiente. Aproximadamente 1,2g de muestras de los cristales brutos húmedos fueron lavados utilizando una relación 1:1 (p/p) de agua desionizada a temperatura ambiente utilizando un tubo para centrífuga con membrana de PVDF Durapore de baja unión Millipore (5,0 µm) en la centrífuga de mesada Beckman Accuspin funcionando a ~1000 g. Se lavó cada muestra con la mitad del agua DI durante dos minutos, seguido de un segundo lavado con la otra mitad del agua DI durante otros dos minutos. La duración de dos minutos incluyó el tiempo de giro inicial pero excluyó el tiempo necesario para alcanzar las cero RPM. Los resultados como se muestran en la Figura 14, con el aumento en la concentración de sal de ácido succínico en el material de partida, el proceso de acidificación en dos etapas mostró mayor rendimiento para cristales de ácido succínico. En la Figura 14, el proceso de acidificación en una etapa está referido como "Cristalización Normal".

50 Ejemplo 14

Comparación del tamaño de partícula de los cristales

En base a los resultados de los experimentos en el Ejemplo 13 anterior, el caldo de fermentación que tiene mayor concentración de sal de ácido succínico daría mayor rendimiento para cristales de ácido succínico; se eligió un caldo de fermentación que tiene 300 g de sal de ácido succínico/L para producir aproximadamente 0,7kg de cristal de ácido succínico ya sea utilizando el proceso de acidificación en una etapa o el proceso de acidificación en dos etapas. El cristal de ácido succínico obtenido tanto a partir del proceso de acidificación en una etapa (1S) como a partir del proceso de acidificación en dos etapas (2S) fueron sometidos a análisis de composición y de distribución de tamaño

- de partícula. La Figura 15A proporciona el nivel de impurezas de amonio y azufre en los cristales de ácido succínico obtenidos a partir del proceso de acidificación en una etapa (1 etapa) y del proceso de acidificación en dos etapas (2 etapas de pH). La Figura 15B proporciona el nivel de diversas impurezas de aminoácidos en los cristales de ácido succínico obtenidos a partir del proceso de acidificación en una etapa (1 etapa) y del proceso de acidificación en dos etapas (2 etapas de pH). La Figura 15C proporciona la distribución del tamaño de partícula de los cristales de ácido succínico obtenidos a partir del proceso de acidificación en una etapa (1 S) y del proceso de acidificación en dos etapas (2 S). Los cristales de SAC obtenidos utilizando el procedimiento de acidificación en dos etapas tuvo menos cristales de pequeño tamaño con el tamaño de partícula de 125 micrómetros o menor. En general, el procedimiento de acidificación en dos etapas produjo cristales distribuidos en un rango de alrededor de 300 a 500 micrómetros. Adicionalmente, se encontró que la curva con forma de campana de la distribución de cristales bajo el procedimiento de acidificación en dos etapas fue más angosta, sugiriendo que la distribución de cristales bajo el procedimiento de acidificación en dos etapas fue más uniforme. Como resultado hubo menores impurezas a medida que ellas fueron eliminadas por lavado más tempranamente en el procedimiento.

Ejemplo 15

- 15 Producción de sulfato de amonio utilizando evaporación y cristalización controladas

El caldo de fermentación que contiene succinato de amonio fue producido utilizando el proceso de fermentación descrito en el Ejemplo 1. Este caldo se hizo pasar a través de una unidad de ultrafiltración y se utilizó para producir cristales de ácido succínico utilizando la cristalización controlada en dos etapas de pH, como se describió en el Ejemplo 12. El licor madre de la cristalización de ácido succínico tuvo una composición de 54 g/l de ácido succínico, 47 g/l de ácido acético, 270 g/l de sulfato, 123 g/l de amonio y 13 g/l de fosfato. A este material se le evaporó luego el 20% del volumen en un evaporador rotatorio. La suspensión remanente fue calentada hasta 80°C y lentamente enfriada a 5 grados Celsius por hora hasta 30 grados. Los cristales fueron luego filtrados y secados bajo vacío a temperatura ambiente. La composición de los cristales fue >98% en peso de sulfato de amonio con aproximadamente 1% de ácido succínico.

- 25 Los cristales de sulfato de amonio producidos siguiendo este procedimiento no necesitan someterse a una etapa adicional de lavado. El filtrado puede luego ser reciclado ya sea a la primera o a la segunda etapa de evaporación en el proceso.

Tabla 1. Composición del caldo de fermentación	
Ácido Succínico (g/l)	78,2
Ácido Acético (g/l)	0,6
Ácido Láctico (g/l)	-
Ácido Pirúvico (g/l)	0,04
Ácido Málico (g/l)	-
Ácido Fumárico (g/l)	0,06
Ácido Fórmico (g/l)	-
Ión Amonio (g/l)	23,0
Ión Cloruro (ppm)	2,5
Azufre Total (ppm)	110
Fósforo Total (ppm)	318
Aminoácidos (g/l)	22,6

Tabla 2. Calidad de producto de cristales de ácido succínico				
	Diagrama de Flujo 1	Diagrama de flujo 2a		Diagrama de flujo 2b
Configuración del procedimiento	Acidificar → Evaporar → Cristalizar	Evaporar → Filtrar → Acidificar & Precipitar	Evaporar → Acidificar & Precipitar	Evaporar → Acidificar & Precipitar → Recristalizar
Uso de H ₂ SO ₄ en caldo (g/g)	0,0746	0,0639		0,0635
Humedad (% en peso)	0,24%	0,21%	0,22%	0,42%
Ácido succínico (% en peso)	95,9%	90,0%	82,3%	99,2%
Ácido Fumárico (% en peso)	0,07%	0,06%	0,05%	0,11%
Ácido Succinámico (% en peso)	0,18%	0,67%	0,73%	0,42%
Succinimida (% en peso)	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado
Succindiamida (% en peso)	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado
Aminoácidos (% en peso)	0,39%	3,86%	4,51%	0,14%
Amonio (ppmp)	1769,8	11411	17751	130,6
Azufre (ppmp)	2248,8	19308	23631	1082,8
Fósforo (ppmp)	76,0	825,9	915,3	no detectado
Cloruro (ppmp)	no detectado	8,45	7,45	no detectado
Calcio (ppmp)	22,6	3,6	4,1	no detectado
Potasio (ppmp)	612,0	272,3	432,7	29,94
Magnesio (ppmp)	12,5	4,5	7,0	no detectado
Sodio (ppmp)	7,8	22,9	33,6	no detectado

Tabla 3. Efecto de la temperatura en la formación de ácido succinámico					
Número de Operación	MA13	MA15	MA16	MA17	MA18
Temperatura (°C)	150	120	120	90	90
Duración (h)	4	4	8	4	8
Rendimiento					
- Succinimida	0,13%	0,04%	0,13%	0,00%	0,00%
- Succindiamida	0,08%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
- Ácido Succinámico	10,7%	0,7%	1,6%	0,00%	0,07%

Tabla 4. Balance de masa para muestras 1 y 2 de ácido succínico obtenido a partir de la cristalización cruda de un gran volumen de caldo de fermentación						
	Alimentación líquida (kg)	g/l de SAC en alimentación	SAC Total en alimentación (kg)	Cristales brutos totales (kg)	SAC en cristales brutos (kg)	% de SAC recuperado
Muestra 1	42,5	68,38	2,84	2,32	2,18	76,8%
Muestra 2	45,2	68,09	3,00	2,72	2,59	86,3%

Tabla 5. Composición de cristales brutos de succínico			
		Bruto 1	Bruto 2
Color (YI)		19,51	15,83
Color (WI)		-7,39	1,46
Humedad	% en peso	6,47%	0,71%
<u>Orgánicos</u>			
Ácido succínico	% en peso	95,91%	96,98%
Ácido Acético	% en peso	0,092%	0,075%
Ácido Pirúvico	% en peso	0,006%	0,028%
Ácido Málico	% en peso	no detectado	no detectado
Ácido Fumárico	% en peso	0,004%	0,009%
Ácido Láctico	% en peso	no detectado	no detectado
Glucosa	% en peso	0,016%	0,019%
Maltosa	% en peso	0,050%	0,030%
Glicerol	% en peso	no detectado	no detectado
Ácido Fórmico	% en peso	no detectado	no detectado
Ácido Succinámico	% en peso	0,03%	0,05%
Succinimida	% en peso	no detectado	no detectado
Succindiamida	% en peso	no detectado	0,02%

Tabla 6. Composición de cristales brutos de succínico (Aniones y Cationes)			
		Bruto 1	Bruto 2
<u>Aniones</u>			
Sulfato	ppm	11267,51	9053,58
Fosfato	ppm	no detectado	no detectado
Cloruros	ppm	3,39	0,51
<u>Cationes</u>			

Amonio	ppm	5747,57	4650,70
As	ppm	no detectado	no detectado
Ca	ppm	1,73	0,91
Cu	ppm	0,52	no detectado
Fe	ppm	no detectado	1,12
K	ppm	143,30	100,75
Mg	ppm	9,18	6,22
Mn	ppm	no detectado	no detectado
Ni	ppm	no detectado	no detectado
Pb	ppm	no detectado	no detectado
Zn	ppm	0,39	no detectado
Na	ppm	2,13	3,68
Cr	ppm	no detectado	no detectado
S	ppm	4264,90	3471,00
P	ppm	102,72	74,14
Aminoácidos Totales	ppm	253,1	181,18

Tabla 7. Análisis de composición de diversas fracciones a partir del procedimiento del diagrama de flujo mostrado en la Figura 1

	Alimen- tación	Cristales brutos de Succínico	ML#1	Sólidos Mixtos	ML #2	Solución de MeOH	AMS
Apariencia		Pardo claro		Amarillo			Blanco
Succínico g/l o % en peso	70,10	99,30%	56,18	15,58%	50,21	61,86	0,22%
Maltosa g/l o % en peso	1,69	no detectado	6,35	0,32%	14,25	1,09	no detectado
Glucosa g/l o % en peso	0,23	0,09%	0,99	0,06%	2,93	0,25	no detectado
Acético g/l o % en peso	10,90	0,15%	15,20	0,22%	11,38	0,71	no detectado
Láctico g/l o % en peso	0,64	no detectado	2,00	0,10%	5,56	0,38	no detectado
Pirúvico g/l o % en peso	no detectado	no detectado	0,25	no detectado	0,70	no detectado	no detectado

Málico g/l o % en peso	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado
Fumárico g/l o % en peso	0,01	0,02%	0,01	0,00%	0,01	0,01	no detectado
Fórmico g/l o % en peso	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado
Glicerol g/l o % en peso	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado
Cloruro ppm	14,5	21	115	518	4	0,4	1536
Sulfato ppm	70601	4775	249134	509639	259688	1325,9	655889
Fosfato ppm	1820	1747	7668	2202	14442	680,0	no detectado
Amonio ppm	29011	1622	92449	211396	100014	332,4	284484
Aminoácidos Totales ppm	7129,5	581,5	18346,0	6809,6	83710,7	2049,7	249,0

Tabla 8. Recuperación de cristales de ácido succínico a partir de solución acidificada con H3PO4			
Peso total de solución (g)	115	115	115
SAC total en solución (g)	15,5	18,4	17,7
ADP total en solución (g)	29,9	43,8	35,1
Valores de pH en la Cristalización	pH2	pH2,5	pH3
Cristal húmedo			
Cristal húmedo recolectado (g)	15,8	15,2	13,5
SAC en Cristal húmedo (g)	10,7	10,7	7,5
Licor madre retenido (g)	2,0	3,0	4,0
ADP retenido (g)	0,9	1,1	1,56
Masa medible	0,9	1,0	1,0
Licor madre			
SAC en licor madre (g)	4,8	7,7	10,2

ADP en licor madre (g)	29,1	42,7	33,6
Rendimiento de cristales de SAC	69%	58%	42%

Tabla 9. Composición del caldo de fermentación antes y después de la evaporación y del condensado del evaporador

Componente analizado	Alimentación al evaporador	Concentrado del evaporador	Condensado del evaporador
Ión amonio	27,83 (g/l)	145,41 (g/l)	2959 (ppm)
Ácido succínico	74,19 (g/l)	498,42 (g/l)	no ensayado
Ácido Acético	8,02 (g/l)	53,50 (g/l)	no ensayado
Ácido Láctico	no detectado	no detectado	no ensayado
Ácido Fumárico	no detectado	0,03 (g/l)	no ensayado
Ácido Fórmico	no detectado	0,27 (g/l)	no ensayado
Ácido Pirúvico	0,07 (g/l)	no detectado	no ensayado
Ácido Málico	0,2 (g/l)	no detectado	no ensayado
Ión fosfato	4,02 (g/l)	34,00 (g/l)	no ensayado
Ión sulfato	0,19 (g/l)	2,27 (g/l)	5,04 (ppm)
Ión cloruro	0,40 (g/l)	2,17 (g/l)	1,04 (ppm)
Maltosa	4,76 (g/l)	7,30 (g/l)	no ensayado
Glucosa	0,88 (g/l)		no ensayado
Glicerol	0,72 (g/l)	6,89 (g/l)	no ensayado
Aminoácidos	no ensayado	8,66 (g/l)	no ensayado
Succinamida	no detectado	no detectado	no ensayado
Succinimida	no ensayado	3,20 (g/l)	no ensayado

Tabla 10. Composición de la fracción sólida luego del proceso de intercambio de sal

Relación Metanol:Caldo Concentrado	2X	3X	4X
Masa de muestra (g)	0,34	0,36	0,38
Ácido succínico (% en peso)	56,4	44,78	62,76
Ácido acético (% en peso)	0,89	1,11	0,53
Ión amonio (% en peso)	21	17	24
Otros ácidos orgánicos (% en peso)	0,01	no detectado	0,01

Azúcares totales (% en peso)	no detectado	no detectado	no detectado
Metanol (% en peso)	9	19	3
Glicerol (% en peso)	no detectado	no detectado	no detectado

Tabla 11. Composición de la fracción líquida luego del proceso de intercambio de sal			
Relación Metanol:Caldo Concentrado	2X	3X	4x
Ácido succínico (g/l)	91,3	64,6	54
Ácido acético (g/l)	21,1	15,6	12,1
Ión amonio (ppm)	23395	17246	12569
Otros ácidos orgánicos (ppm)	0,49	0,19	0,28
Azúcares totales (g/l)	2,08	1,59	1,51
Metanol (g/l)	527,3	588,6	642,8
Glicerol (g/l)	3,1	1,9	1,7

Tabla 12. Comparación de los procesos de acidificación en una etapa y en dos etapas										
	Cristalización normal en 1 etapa de pH					Cristalización en 2 etapas de pH				
Matraces	A	B	C	Promedio	Desv. Est.	A	B	C	Promedio	Desv. Est.
Filtro (g)	35,71	35,50	35,28			35,35	35,61	35,41		
Botella (g)	50,57	50,78	50,64			50,79	50,89	50,58		
Filtro + Cristal húmedo (g)	63,84	62,17	61,98			59,91	61,46	58,77		
Botella +ML (g)	155,23	156,71	156,16			160,04	157,59	158,88		
Licor madre (g)	104,66	105,93	105,52	105,37	0,65	109,25	106,70	108,30	108,08	1,29
Cristal húmedo (g)	28,13	26,67	26,70	27,17	0,83	24,56	25,85	23,36	24,59	1,25
Humedad	15,00%	14,46%	17,40%	0,16	0,02	12,44%	17,25%	14,66%	0,15	0,02
Contenido de SAC	69,3%	69,8%	64,1%	67,7%	0,03	76,1%	78,2%	82,9%	79,1%	0,03
Rendimiento de SAC	77,8%	74,3%	68,4%	73,5%	0,05	74,6%	80,8%	77,3%	77,6%	0,03
Pureza en base seca	81,5%	81,6%	77,6%	80,2%	0,02	86,9%	94,6%	97,1%	92,8%	0,05

Para comodidad del lector se enumeran todas las referencias.

	Patente de EE.UU. No. 2.565.487
	Patente de EE.UU. No. 2.722.541
	Patente de EE.UU. No. 2.766.273
5	Patente de EE.UU. No. 4.100.189
	Patente de EE.UU. No. 4.405.717
	Patente de EE.UU. No. 4.444.881
	Patente de EE.UU. No. 4.645.855
	Patente de EE.UU. No. 4.885.247
10	Patente de EE.UU. No. 5.034.105
	Patente de EE.UU. No. 5.068.418
	Patente de EE.UU. No. 5.132.456
	Patente de EE.UU. No. 5.143.834
	Patente de EE.UU. No. 5.168.055
15	Patente de EE.UU. No. 5.210.296
	Patente de EE.UU. No. 5.323.639
	Patente de EE.UU. No. 5.352.825
	Patente de EE.UU. No. 5.405.992
	Patente de EE.UU. No. 5.449.824
20	Patente de EE.UU. No. 5.453.365
	Patente de EE.UU. No. 5.502.240
	Patente de EE.UU. No. 5.510.526
	Patente de EE.UU. No. 5.641.406
	Patente de EE.UU. No. 5.766.439
25	Patente de EE.UU. No. 5.773.653
	Patente de EE.UU. No. 5.780.276
	Patente de EE.UU. No. 5.780.678
	Patente de EE.UU. No. 5.786.185
	Patente de EE.UU. No. 5.892.109
30	Patente de EE.UU. No. 5.958.744
	Patente de EE.UU. No. 5.986.133
	Patente de EE.UU. No. 6.043.392
	Patente de EE.UU. No. 6.087.532
	Patente de EE.UU. No. 6.160.173
35	Patente de EE.UU. No. 6.187.951
	Patente de EE.UU. No. 6.229.046
	Patente de EE.UU. No. 6.265.190

	Patente de EE.UU. No. 6.280.985
	Patente de EE.UU. No. 6.291.708
	Patente de EE.UU. No. 6.319.382
	Patente de EE.UU. No. 6.320.077
5	Patente de EE.UU. No. 6.342.626
	Patente de EE.UU. No. 6.384.276
	Patente de EE.UU. No. 6.403.825
	Patente de EE.UU. No. 6.452.0151
	Patente de EE.UU. No. 6.472.559
10	Patente de EE.UU. No. 6.476.239
	Patente de EE.UU. No. 6.478.965
	Patente de EE.UU. No. 6.509.179
	Patente de EE.UU. No. 6.518.454
	Patente de EE.UU. No. 6.534.079
15	Patente de EE.UU. No. 6.583.310
	Patente de EE.UU. No. 6.660.505
	Patente de EE.UU. No. 6.641.734
	Patente de EE.UU. No. 6.664.413
	Patente de EE.UU. No. 6.670.505
20	Patente de EE.UU. No. 6.772.213
	Patente de EE.UU. No. 6.803.217
	Patente de EE.UU. No. 6.872.314
	Patente de EE.UU. No. 6.926.810
	Patente de EE.UU. No. 6.942.803
25	Patente de EE.UU. No. 7.019.170
	Patente de EE.UU. No. 7.026.145
	Patente de EE.UU. No. 7.144.977
	Patente de EE.UU. No. 7.186.856
	Patente de EE.UU. No. 7.238.837
30	Patente de EE.UU. No. 7.297.809
	Patente de EE.UU. No. 7.439.392
	Patente de EE.UU. No. 7.498.450
	Patente de EE.UU. No. 7.528.277
	Patente de EE.UU. No. 7.601.865
35	Patente de EE.UU. No. 7.632.479
	Patente de EE.UU. No. 7.652.167
	Patente de EE.UU. No. 7.696.375

	Patente de EE.UU. No. 7.709.689
	Patente de EE.UU. No. 7.754.916
	Patente de EE.UU. No. 7.820.859
	Patente de EE.UU. No. 7.915.447
5	Patente de EE.UU. No. 8.084.626
	Patente de EE.UU. No. 8.193.375
	Patente de EE.UU. No. 8.203.021
	Patente de EE.UU. No. 8.241.482
	Patente de EE.UU. No. 8.293.935
10	Patente de EE.UU. No. 8.338.145
	Patente de EE.UU. No. 8.410.306
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2004/0210087
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2006/0252956
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2006/0276674
15	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2006/0041165
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2007/0014895
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2007/0096481
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2007/0161816
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2007/0167649
20	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2008/0287714
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2008/042958
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2009/0076297
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2009/0104322
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2009/0234160
25	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2010/0297715
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2001/0137843
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2011/0257429
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2011/0300589
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2012/0142945
30	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2012/0238722
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2013/0018206
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2013/0096343
	Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2013/0081947
	Publicación Internacional de Solicitud de Patente No. WO2005/051885
35	Publicación Internacional de Solicitud de Patente No. WO2009/030395
	Publicación Internacional de Solicitud de Patente No. WO2009/040095
	Publicación Internacional de Solicitud de Patente No. WO2009/082050

- Publicación Internacional de Solicitud de Patente No. WO2010/022960
- Publicación Internacional de Solicitud de Patente No. WO2010/022966
- Publicación Internacional de Solicitud de Patente No. WO2011/064151
- Publicación Internacional de Solicitud de Patente No. WO2011/069007
- 5 Publicación Internacional de Solicitud de Patente No. WO2011/123269
- Publicación Internacional de Solicitud de Patente No. WO2011/160760
- Publicación Internacional de Solicitud de Patente No. WO2013/012590
- Benedict, D. J., Parulekar, S. J. y Tsai, S-P. Pervaporation-assisted esterification and succinic acids with downstream ester recovery. *J. Mem. Sci.* 281: 435-445.
- 10 Budarin, V., Luque, R., Macquarrie, D. J. y Clark, J. H. Towards a bio-based industry: Benign catalytic esterification of succinic acid in the presence of the water. *Chem. Euro. J.* 13: 6914-6919.
- Cheng, Ke-ke., Zhao, X-B., Zeng, J., Wu, R-C., Xu, Y-Z., Liu, D-H., Zhang, J-A. Downstream processing of biotechnological produced succinic acid. 95: 841-850.
- Davis, S. 1, 4-Butanediol, CEH Market Research Report, Octubre 2010.
- 15 Davison, B. H., Nghiem, N. P. y Richardson, G. L. Succinic acid adsorption from fermentation broth and regeneration. *App. Biochem. Biotechnol.* 113-116: 653-669.
- Delhomme, C., Weuster-Botz, D., Kuhn, F. E. Succinic acid from renewable resources ad a C4 building-block chemical – A review of the catalytic possibilities in aqueous media. *Green Chem.* 11: 13-26.
- 20 Delhomme, C. Process integration of fermentation and catalysts for the production of succinic acid derivatives. Disertación presentada para el título de Doctor de Filosofía en Ingeniería, Technische Universitat Munchen, Alemania.
- Delhomme, C., Goh, S. L. M., Kuhn, F. E. y Weuster-Botz, D. Esterification of bio-based succinic acid in biphasic systems: Comparison of chemical and biological catalysts. *J. Mol. Cata. Enz.* 80: 39-47.
- 25 Filachione, E. M., Costello, E. J. y C. H. Fisher. Preparation of esters by reaction of ammonium salts with alcohols. *J. Amer. Chem. Society.* 13(11), 5265-5267.
- Filachione, E. M. y Costello, E. J. Lactic esters by reaction of ammonium lactate with alcohols. *Ind. & Eng. Chem.*, 44, 2189-2191.
- Huh, Y. S., Jun, Y-S., Hong, Y. K., Song, H., Lee, S. Y., Hong, W. H. Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*. *Proc. Biochem.* 41: 1461-1465.
- 30 Jafar, J. J., Budd, P. M., Hughes, R. Enhancement of esterification reaction yield using zeolite Avapour permeation membrane. *J. Mem. Sci.* 199: 117-123.
- Jantama, K., Haupt, M. J., Svoronos, S. A., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugham, K. T., Ingram, L. O. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *E. coli* C that produce succinate and malate. *Biotech Bioeng* 99: 1140-1153.
- 35 Jantama, K., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugham, K. T., Svoronos, S. A., Ingram, L. O. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotech. Bioeng.* 101: 881-893.
- Jun, Y-S., Huh, Y. S., Hong, W. H. y Hong, Y. K. Kinetics of the extraction of succinic acid with tri—octylamine in 1-octanol solution. *Biotechnol. Prog.* 21: 1673-1679.
- 40 Jun, Y-S., Lee, E. Z., Huh, Y. S., Hong, Y. K. Kinetic study for the extraction of succinic acid with ZTOA in fermentation broth; effects of pH, salt and contaminated acid. *Biochem. Eng. J.* 36: 8-13.
- Kurzrock, T. y Weuster-Botz, D. Recovery of succinic acid from fermentation broth. *Biotechnol. Lett.* DOI 10.1007/s10529-009-0163-6. Publicado en línea: 08 Noviembre 2009.
- 45 Kurzrock, T. y Weuster-Botz, D. New reactive extraction systems for separation of bio-succinic acid. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 34: 779-787.

- Li, Q., Wang, D., Wu, Y., Li, W., Zhang, Y., Xing, J. y Su, Z. One Step recovery of succinic acid from fermentation broths by crystallization. *Sep. Purif. Technol.* 72: 294-300.
- Li, Q., Li, W.-l., Wang, D., Lili, B.-b., Tang, H., Yang, M.-h., Liu, Q.-f., Xing, J. M. y Su, Z.-g. pH Neutralization while succinic acid adsorption onto anion-exchange resins. *Appl Biochem Biotechnol.* 160:438-445.
- 5 Lin, C.S.K., Luque, R., Clark, J. H., Webb, C. y Du, C. Wheat-based biorefining strategy for fermentative production and chemical transformations of succinic acid. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 6: 88-104.
- Londono, A. O. Separation of succinic acid from fermentation broths and esterification by a reactive distillation method. Una disertación presentada para el título de Doctor en Filosofía en Ingeniería Química, Michigan State University, EE.UU..
- 10 Lopez-Garzon, C. S., Ottens, M., van der Wielen, A. M. y Straathof, A. J. J. Direct downstream catalysis: From succinate to its diethyl ester without intermediate acidification. *Chem.Eng. J.* 200-202: 637-644.
- Luque, R., Lin, C. S. K., Du, C., Macquarrie, D. J., Koutinas, A., Wang, R., Webb, C. y Clark, J. H. Chemical transformations of succinic acid recovered from fermentation broths by a novel direct vacuum distillation-crystallization method. *Green Chem.* 11: 193-200.
- 15 Minh, D. P., Besson, M., Pinel, C., Fuytes, P. y Petitjean, C. Aqueous-phase hydrogenation of biomass-based succinic acid to 1,4-butanediol over supported bimetallic catalysts. *Top. Catal.* 53: 1270-1273.
- Orjuela, A., Kolah, A., Lira, C. T. y Miller, D. J. Mixed succinic acid/acetic acid esterification with ethanol by reactive distillation. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50: 9209-9220.
- 20 Orjuela, A., Yanez, A., Peereboom, L., Lira, C. T. y Miller, D. J. A novel process for recovery of fermentation-derived succinic acid. *Sep. Purif. Tech.* 83: 31-37.
- Orjuela, A., Yanez, A. J., Santhanakrishnan, A., Lira, C. T. y Miller, D. J. Kinetics of mixed succinic acid/acetic acid esterification with Amberlyst 70 ion exchange resin as catalyst. *Chem. Eng. J.* 188: 98-107.
- Orjuela, A., Kolah, A., Hong, X., Lira, C. T. y Miller, D.J. Diethyl succinate synthesis by reactive distillation. *Sep. Purif. Tech.* 88: 151-162.
- 25 Orjuela, A., Orjuela, A., Lira, C. T. y Miller, D. J. A novel process for recovery of fermentation-derived succinic acid: Process design and economic analysis. *Bioreso. Tech.* 139: 235-241.
- Rahman, M. B. A., Jarmi, N. I., Chaibakhsh, N. y Basri, M. Modeling and optimization of lipase-catalysed production of succinic acid ester using central composite design analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38: 229-234.
- 30 Song, H., Huh, Y. S., Lee, S. Y., Hong, W. H. y Hong, Y. K. Recovery of succinic acid produced by fermentation of a metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens* strain. *J. Biotechnol.* 132: 445-452.
- Varadarajan, S. y Miller, D. J. Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids. *Biotechnol. Prog.* 15: 845-854
- 35 Wang, C., Li, Q., Tang, H., Zhou, W., Yan, D., xing, J. y Wan, Y. Clarification of succinic acid fermentation broth by ultrafiltration in succinic acid bio-refinery. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88: 444-448.
- Zhang, X., Jantama, K., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 106: 20180-20185.
- 40

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar éster succinato que comprende las etapas de:
 - (a) fermentación de sustratos de carbohidratos utilizando un biocatalizador para producir sal succinato;
 - (b) clarificación del caldo de fermentación para separar el biocatalizador y las materias insolubles;
 - 5 (c) acidificación del caldo de fermentación de la etapa (b) con ácido fosfórico;
 - (d) cristalización controlada de ácido succínico en el caldo de fermentación acidificado de la etapa (c);
 - (e) separación del ácido succínico cristalino del licor madre;
 - (f) disolución de dicho cristal cristalino de ácido succínico de la etapa (e) en un alcohol;
 - (g) esterificación de dicho ácido succínico disuelto en alcohol en la etapa (f); y
 - 10 (h) recuperar el éster de ácido succínico mediante destilación.
2. Un proceso para preparar éster succinato como en la reivindicación 1, en el que dicho alcohol es metanol.
3. Un proceso para preparar éster succinato como en la reivindicación 1, en el que dicho alcohol es etanol.
4. Un proceso para preparar éster succinato como en la reivindicación 1, que comprende además las etapas de:
 - (a) transferir dicho licor madre a un evaporador para producir un licor madre concentrado;
 - 15 (b) transferir dicho licor madre concentrado a un cristizador para producir una suspensión espesa;
 - (c) centrifugar dicha suspensión de la etapa (b) para obtener un precipitado y lavar dicho precipitado en un alcohol para recuperar sulfato de amonio en forma de cristales y una fracción de alcohol que comprende ácido succínico;
 - (d) esterificar dicho ácido succínico en alcohol en la etapa (c); y
 - (e) destilar dicho éster de ácido succínico de la etapa (d).
- 20 5. Un proceso para preparar éster succinato como en la reivindicación 4, en el que dicho alcohol es etanol.
6. Un proceso para preparar éster succinato como en la reivindicación 4, en el que dicho alcohol es metanol.
7. Un proceso para preparar ácido succínico que comprende las etapas de:
 - (a) fermentación de sustratos de carbohidratos utilizando un biocatalizador para producir sal succinato;
 - (b) clarificación del caldo de fermentación para separar el biocatalizador y los insolubles;
 - 25 (c) acidificación del caldo de fermentación de la etapa (b) con ácido fosfórico;
 - (d) cristalización controlada de ácido succínico en el caldo de fermentación acidificado de la etapa (c);
 - (e) separación del ácido succínico cristalino del licor madre;
 - (f) disolución dicho cristal cristalino de ácido succínico de la etapa (e) en un alcohol;
 - (g) transferencia de dicho licor madre a un evaporador para producir un licor madre concentrado;
 - 30 (h) transferencia de dicho licor madre concentrado a un cristizador para producir una suspensión espesa;
 - (i) centrifugación de dicha suspensión de la etapa (h) para obtener un precipitado y lavar dicho precipitado en un alcohol para recuperar sulfato de amonio en forma de cristales y una fracción de alcohol que comprende ácido succínico;
 - (j) combinación de dicha fracción de alcohol que comprende ácido succínico en la etapa (i) con dicho ácido succínico disuelto en alcohol en la etapa (f);
 - 35 (k) esterificación de dicho ácido succínico en alcohol en la etapa (j);
 - (l) destilación dicho éster de ácido succínico de la etapa (k); y
 - (m) hidrólisis del éster de ácido succínico de la etapa (l) para producir ácido succínico.

8. Un proceso para preparar éster succinato que comprende las etapas de:

(a) fermentación de sustratos de carbohidratos utilizando un biocatalizador para producir sal succinato;

(b) clarificación del caldo de fermentación para separar el biocatalizador y los insolubles;

(c) mezclar dicho caldo de fermentación de la etapa (b) con un alcohol para separar la sal succinato;

5 (d) filtración de dicha sal succinato con sal en la etapa (c);

(e) volver a disolver dicha sal succinato salada en la etapa (d) en metanol en presencia de ácido sulfúrico que provoca la precipitación del sulfato;

(f) filtración de dicho sulfato de la etapa (e) y recuperación del filtrado que comprende ácido succínico y succinato de dimetilo;

10 (g) esterificación de dicho ácido succínico en dicho filtrado en la etapa (f); y

(h) recuperación del éster de ácido succínico mediante destilación.

9. Un proceso para preparar éster succinato como en la reivindicación 8, en el que dicho alcohol usado para separar la sal succinato es metanol.

15 **10.** Un proceso para preparar éster succinato según la reivindicación 8, en el que el contenido de azufre de dicho éster succinato está por debajo del nivel de 50 ppm.

11. Un proceso para preparar éster succinato como en la reivindicación 8 en el que el contenido de azufre de dicho éster succinato está por debajo del nivel de 10 ppm.

Figura 1

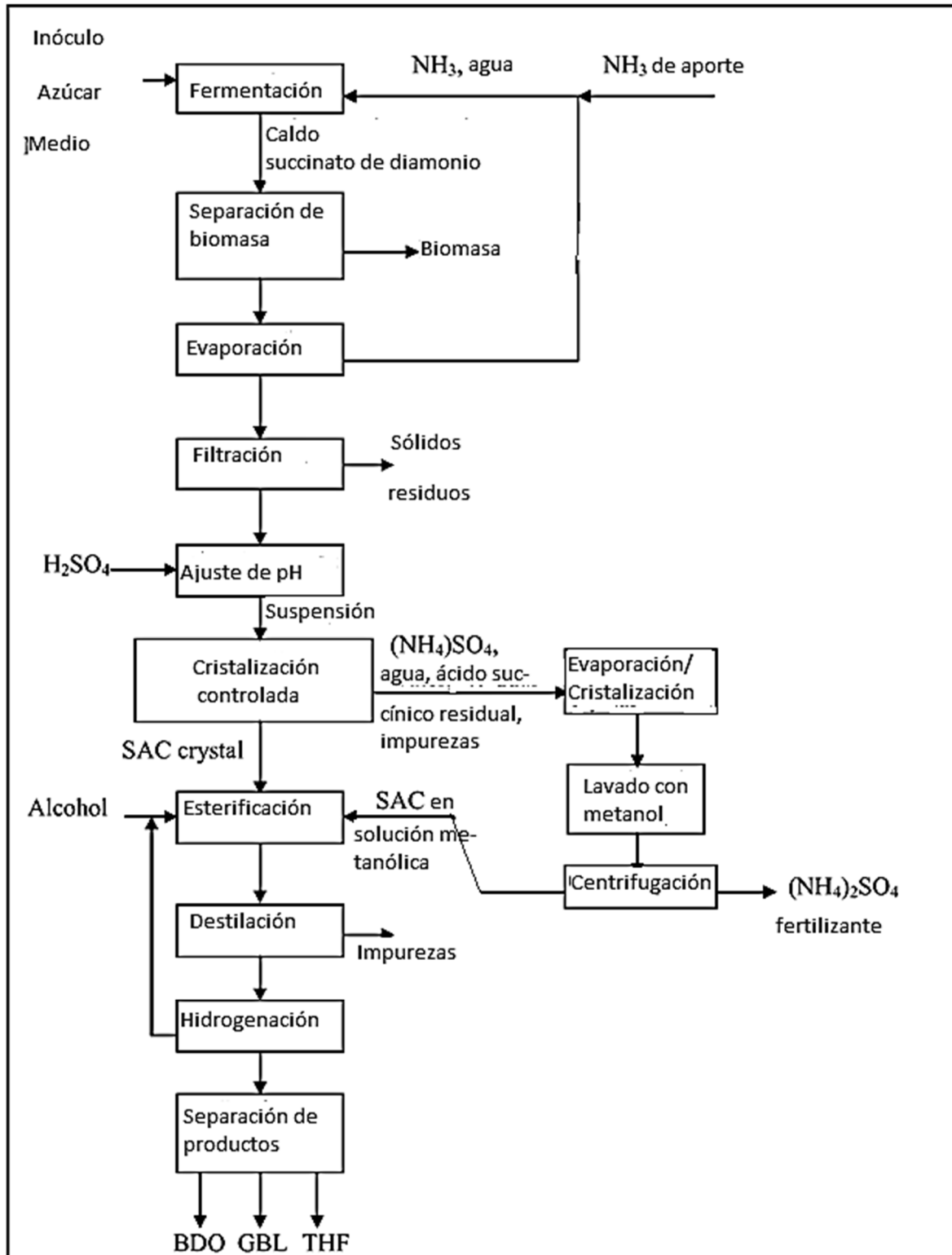


Figura 2

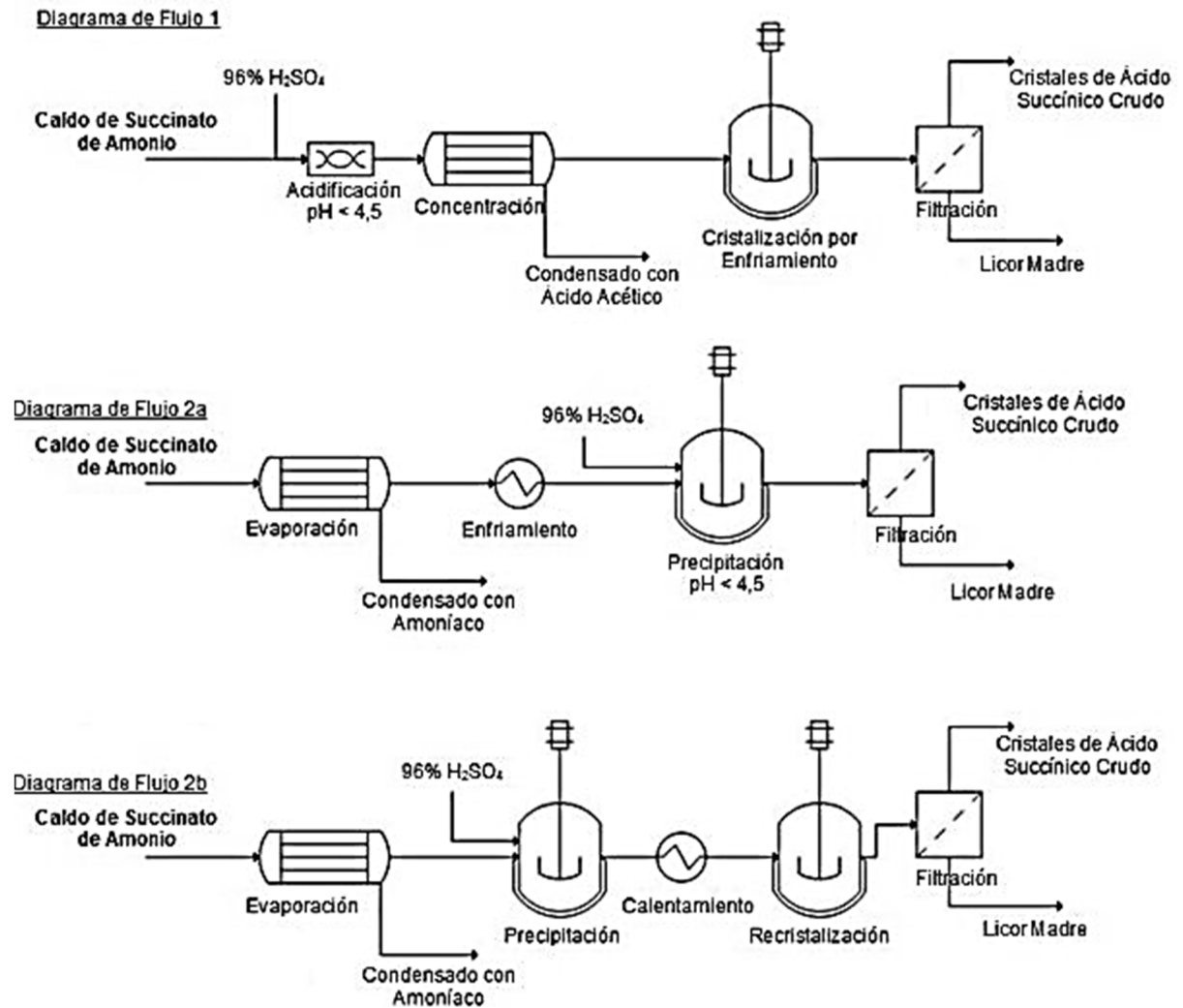
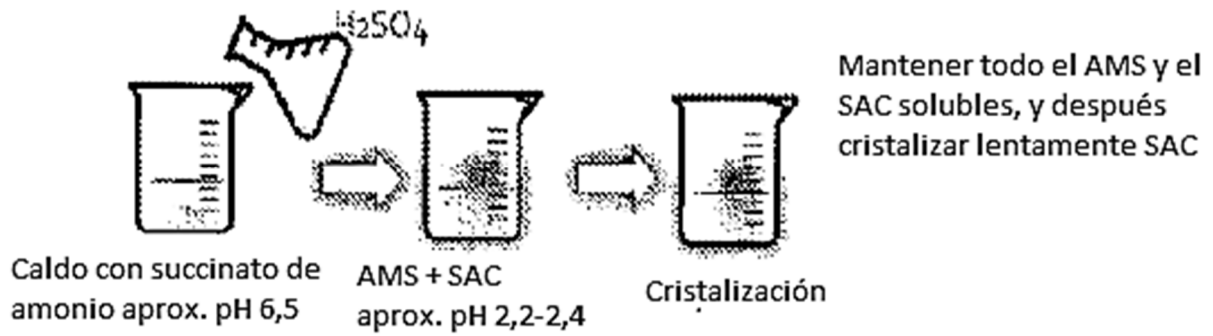


Figura 3

Procedimiento normal :



Cristalización en dos etapas de pH :

Cristalizar una parte de SAC antes de añadir más H₂SO₄

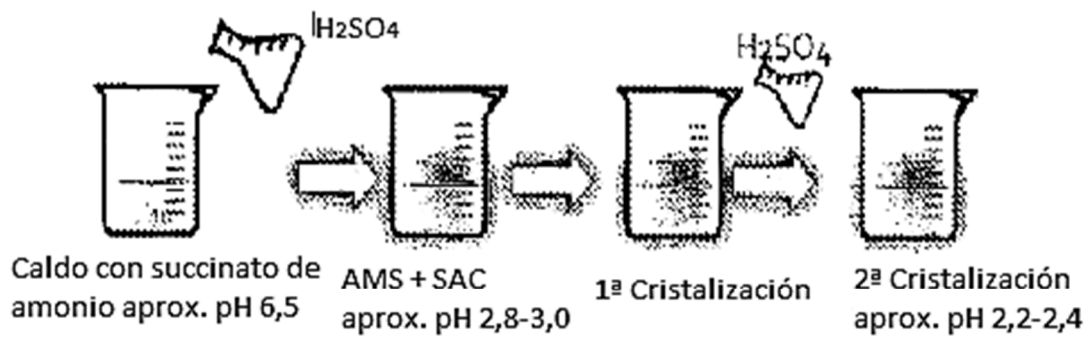


Figura 4A

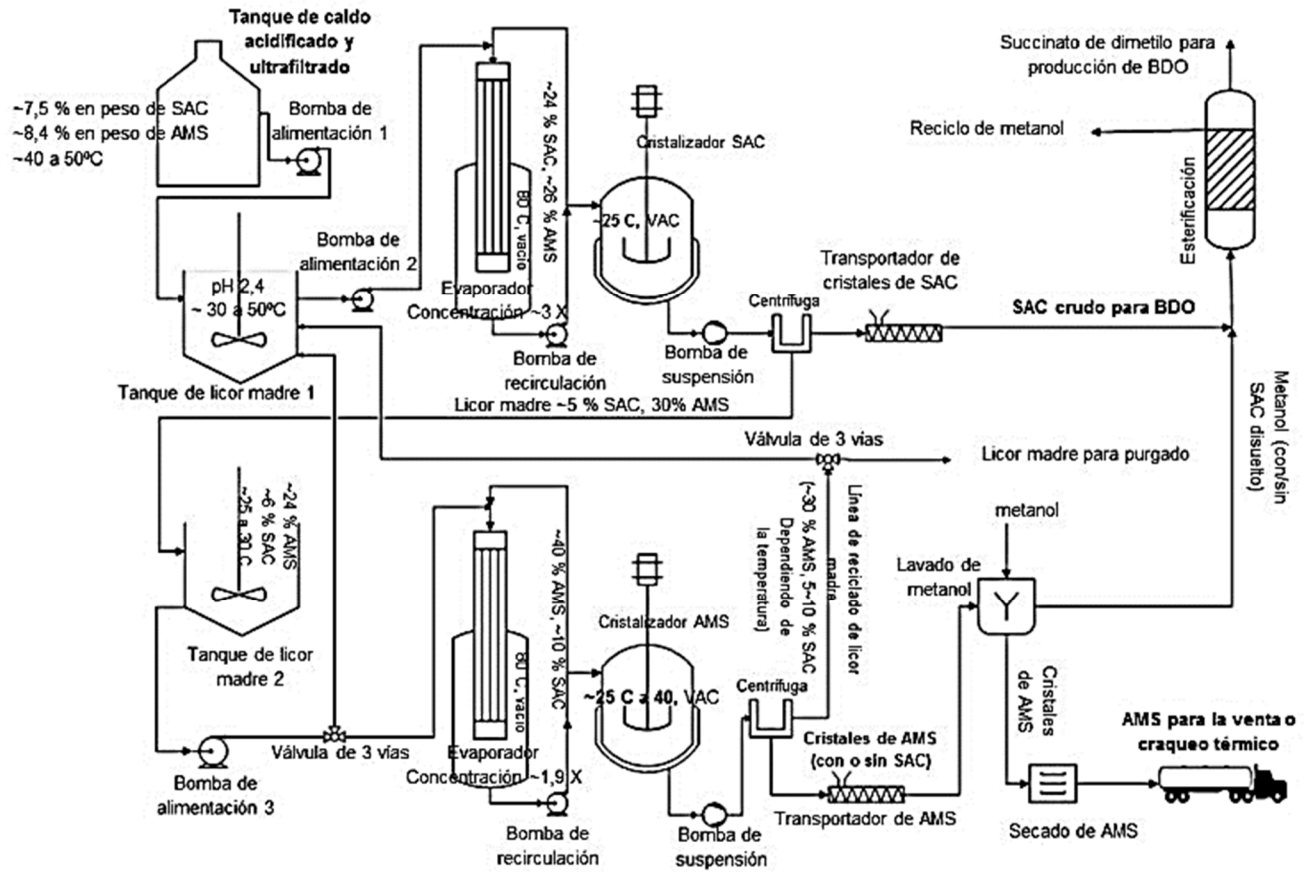


Figura 4B

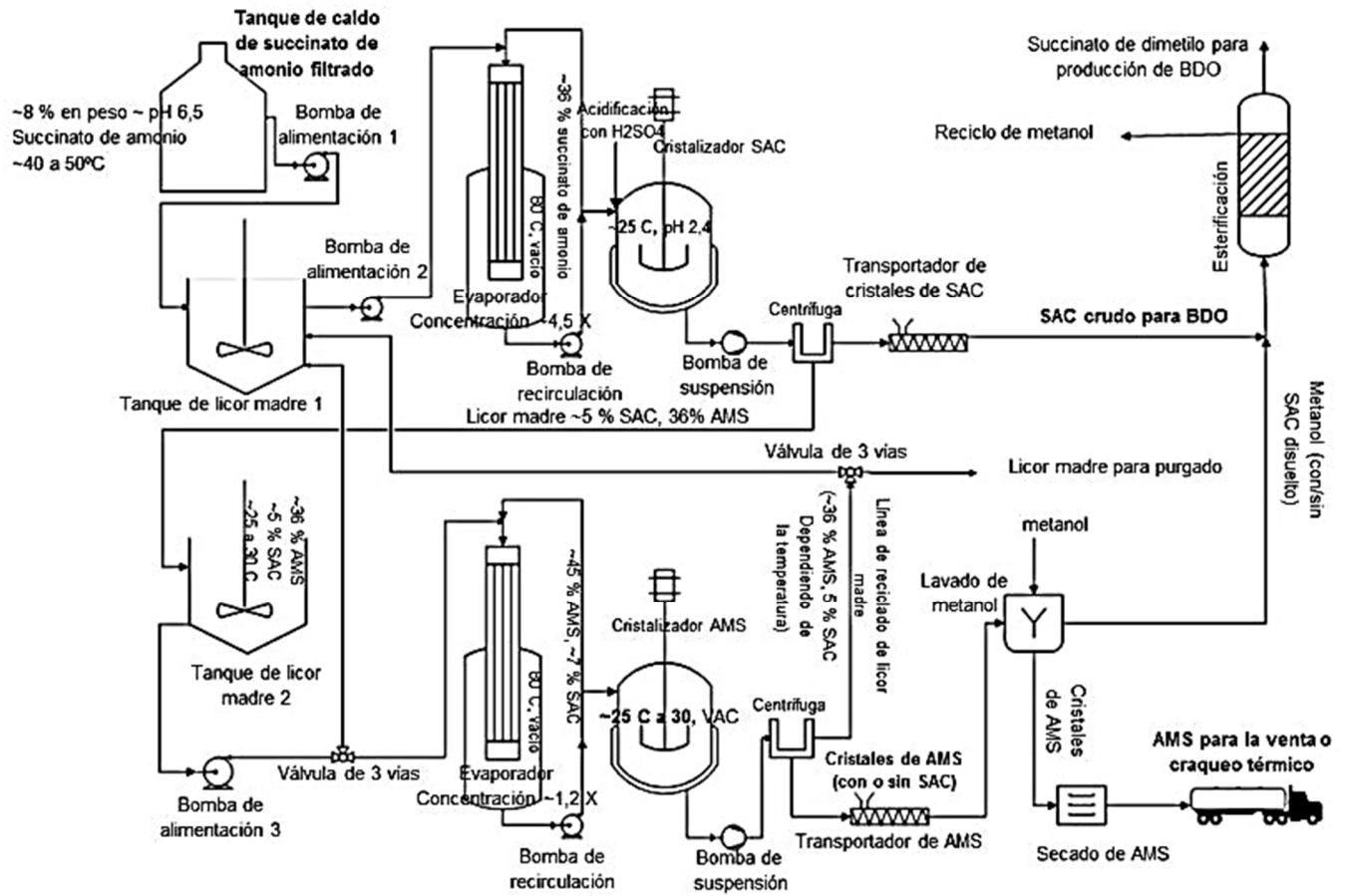


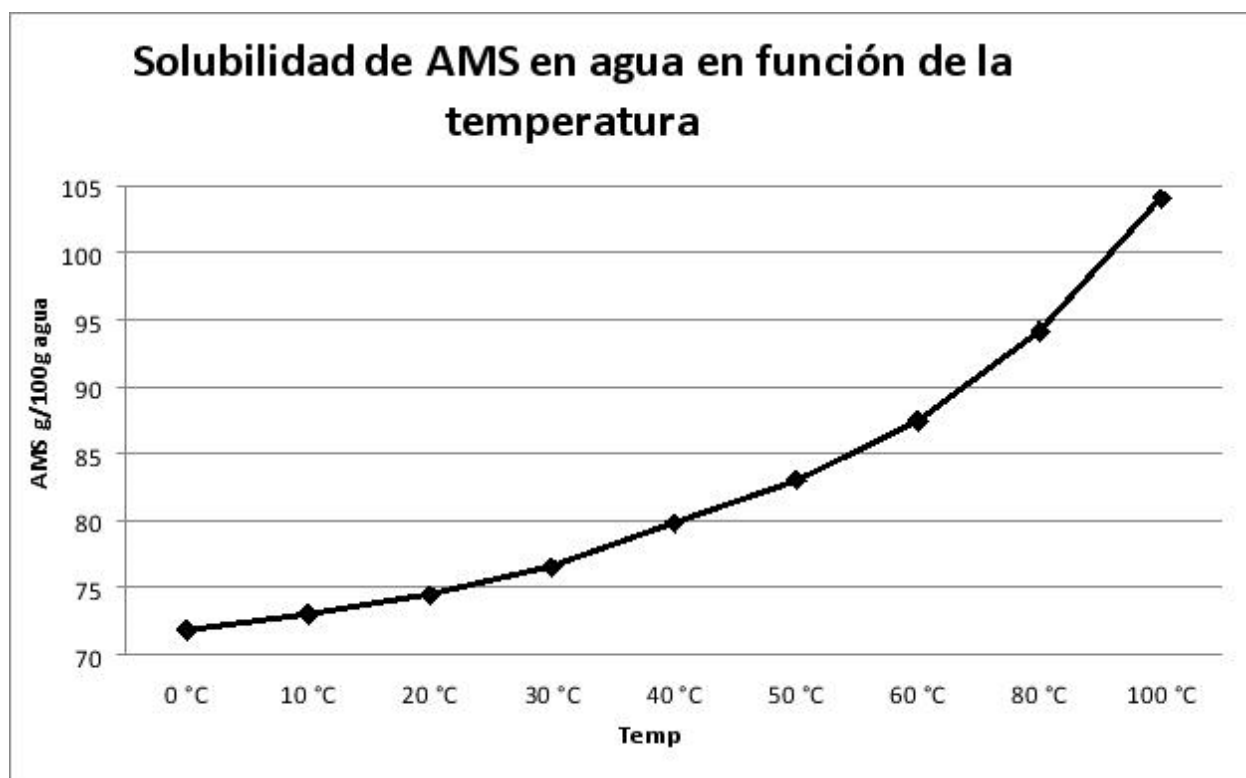
Figura 5

Figura 6A

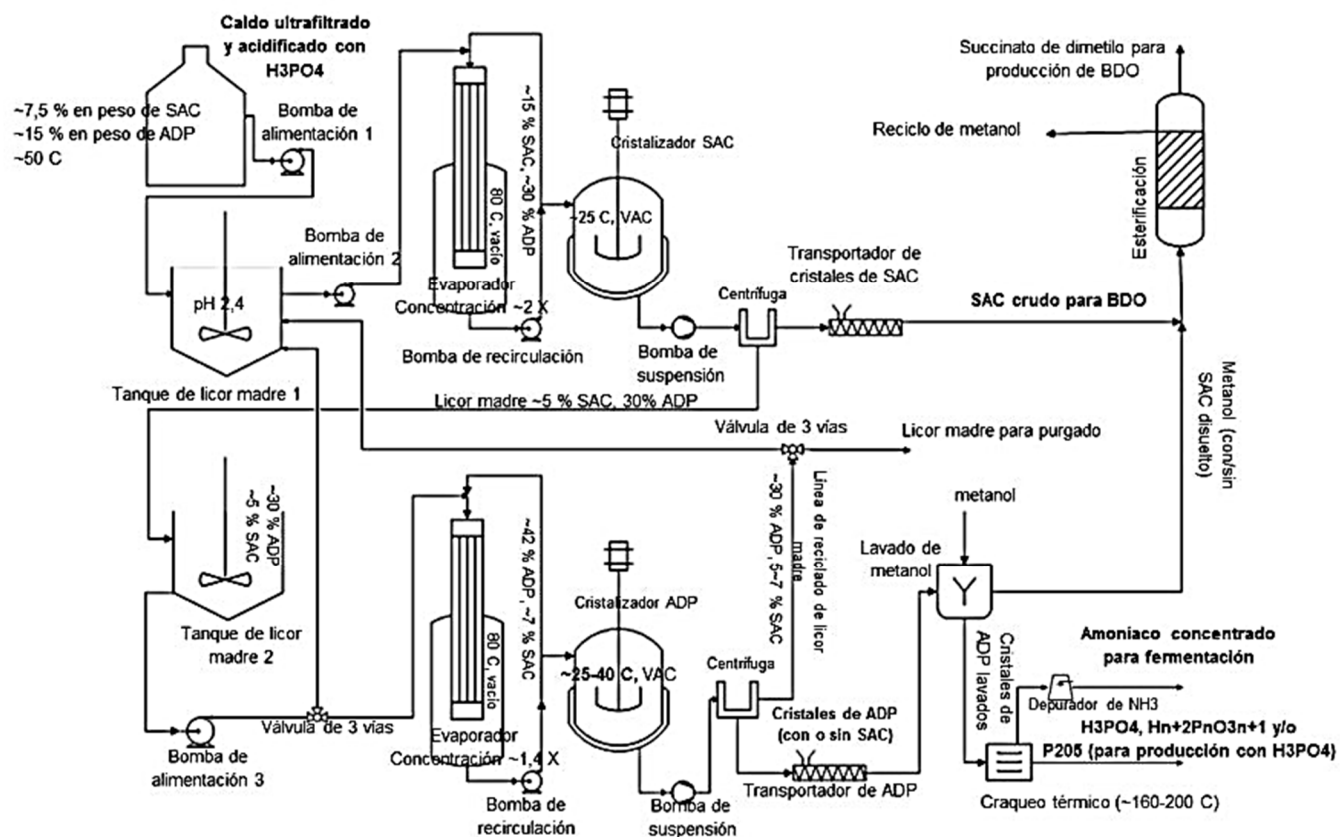


Figura 6B

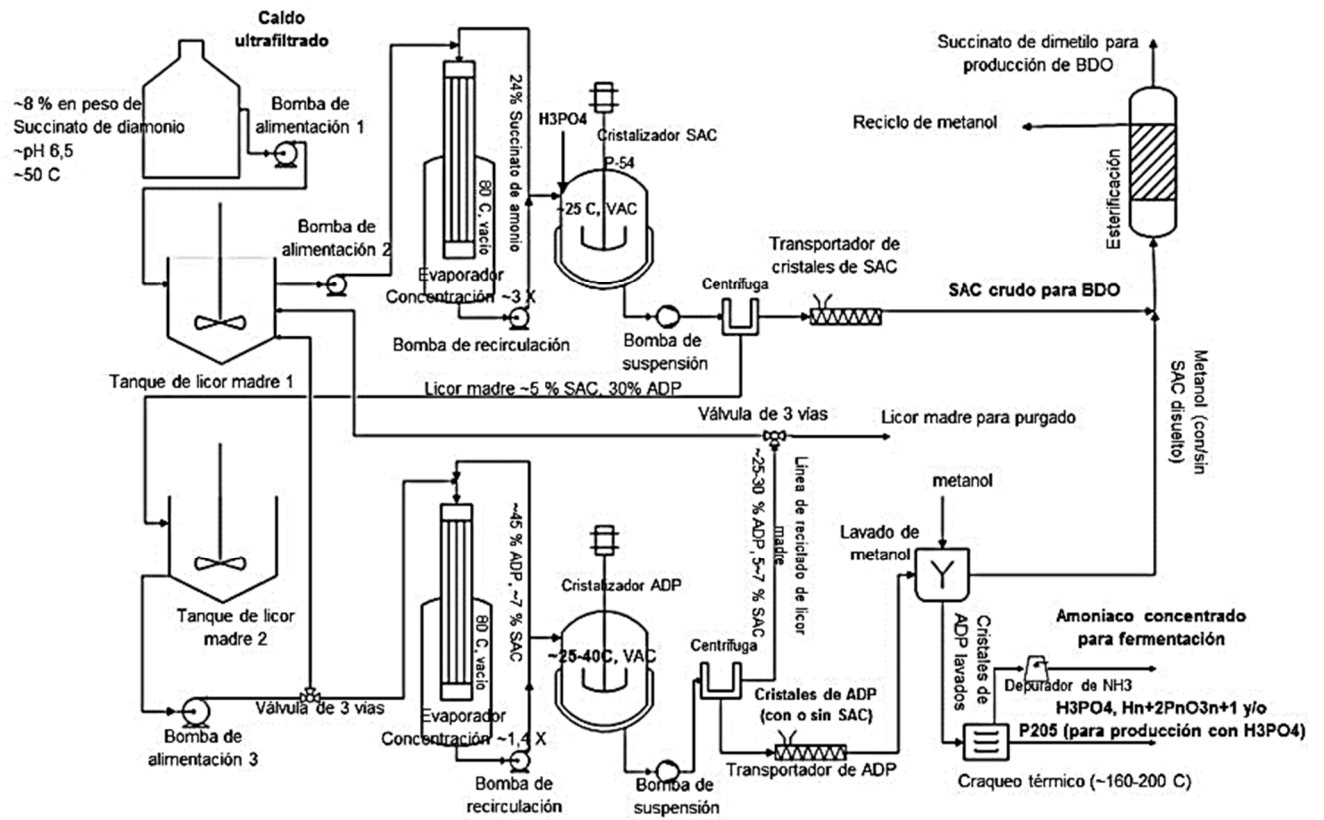


Figura 7

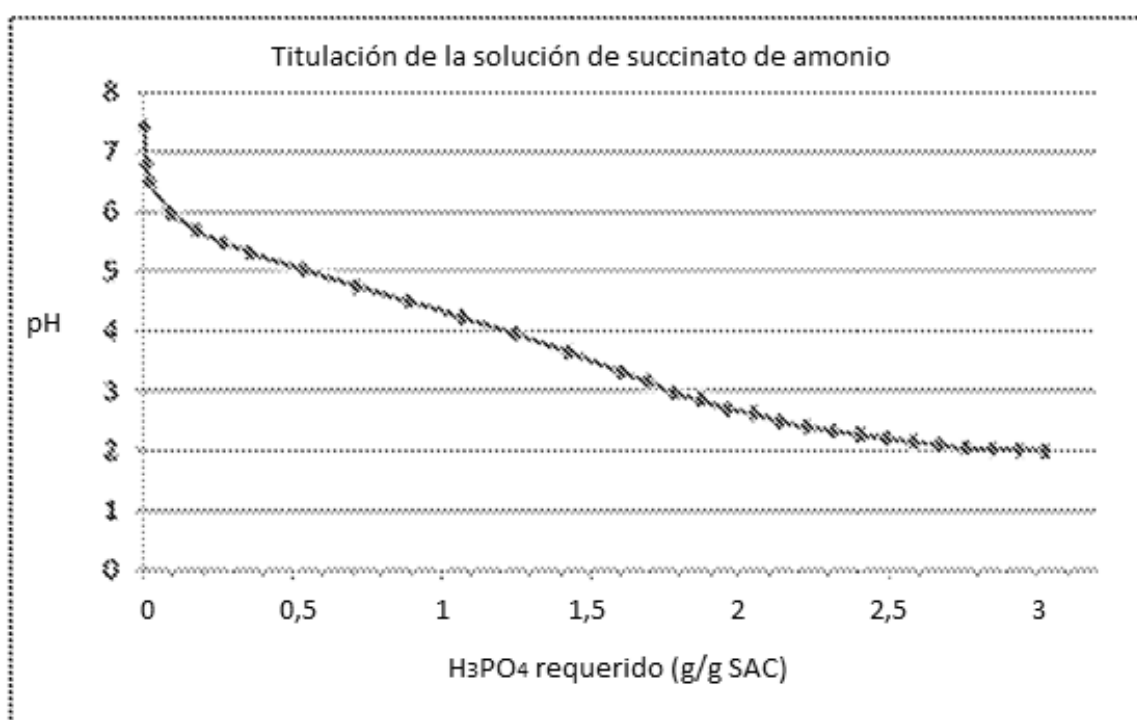


Figura 8

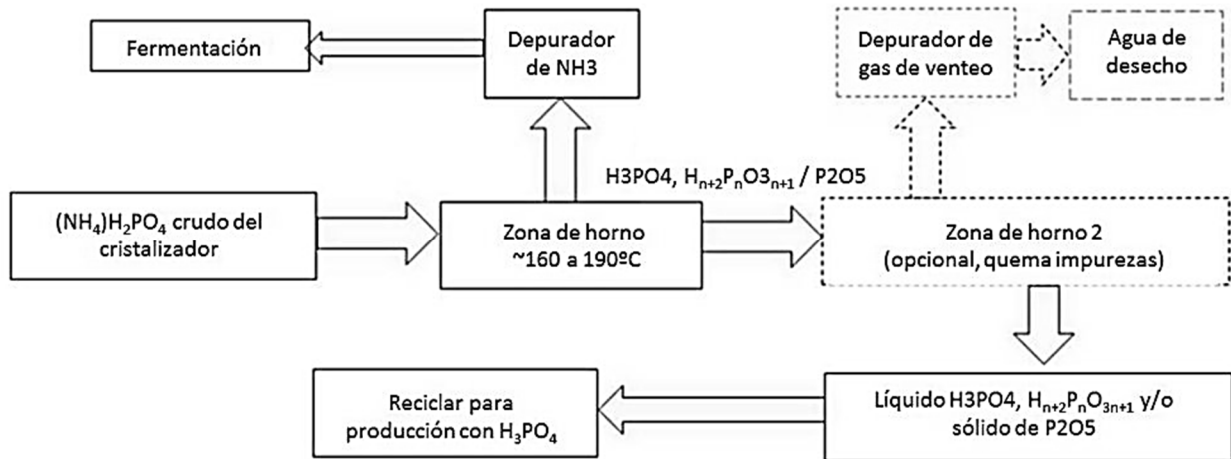


Figura 9

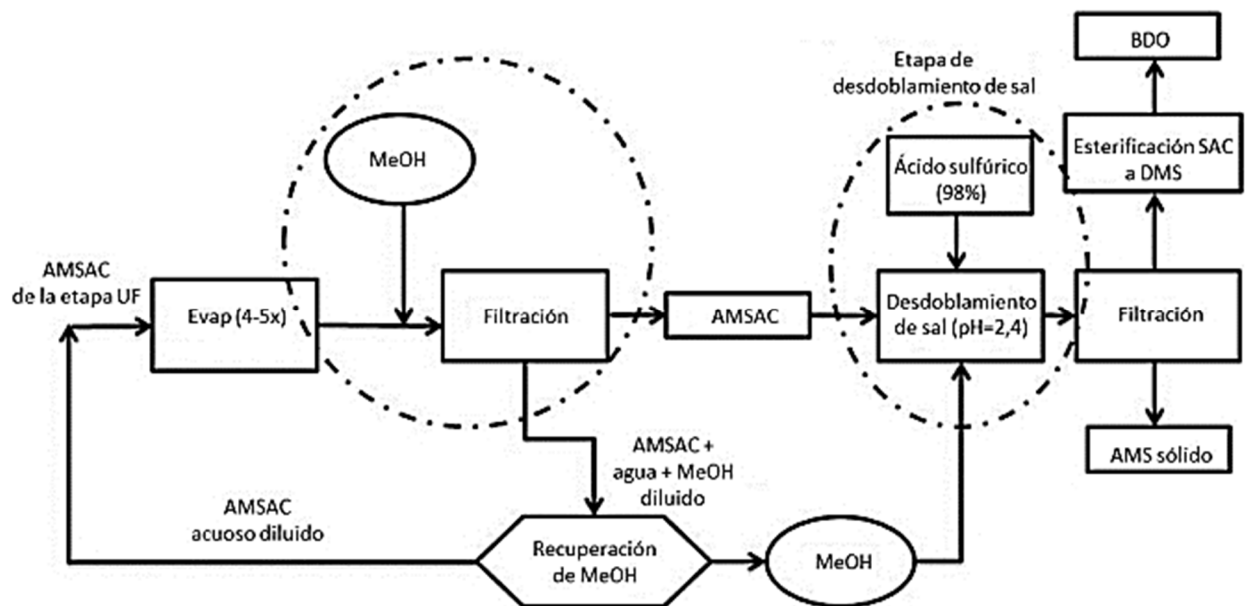


Figura 10

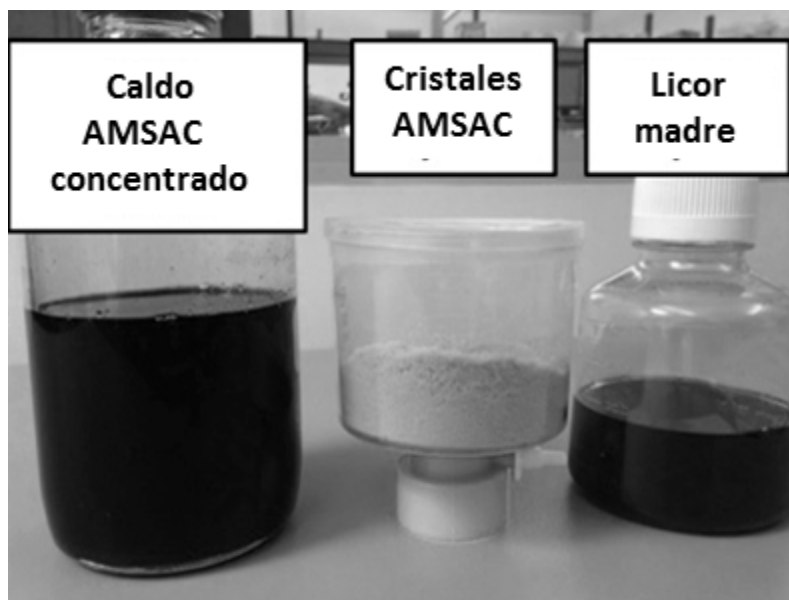


Figura 11



Figura 12



Figura 13A

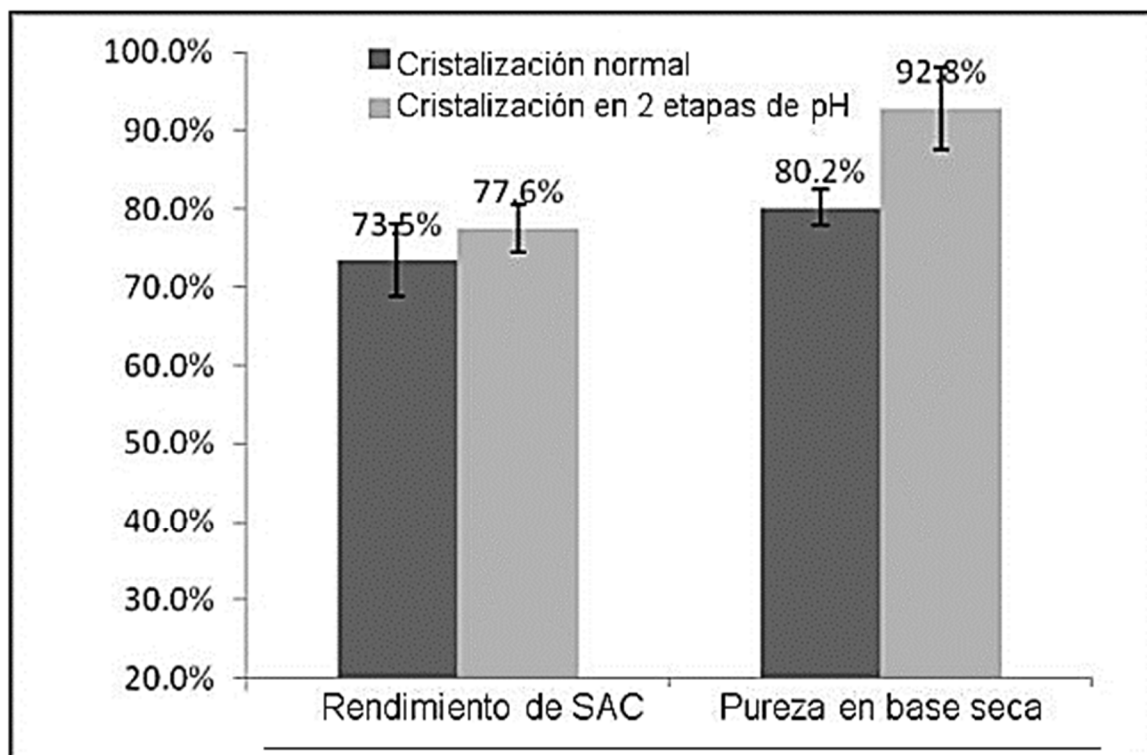


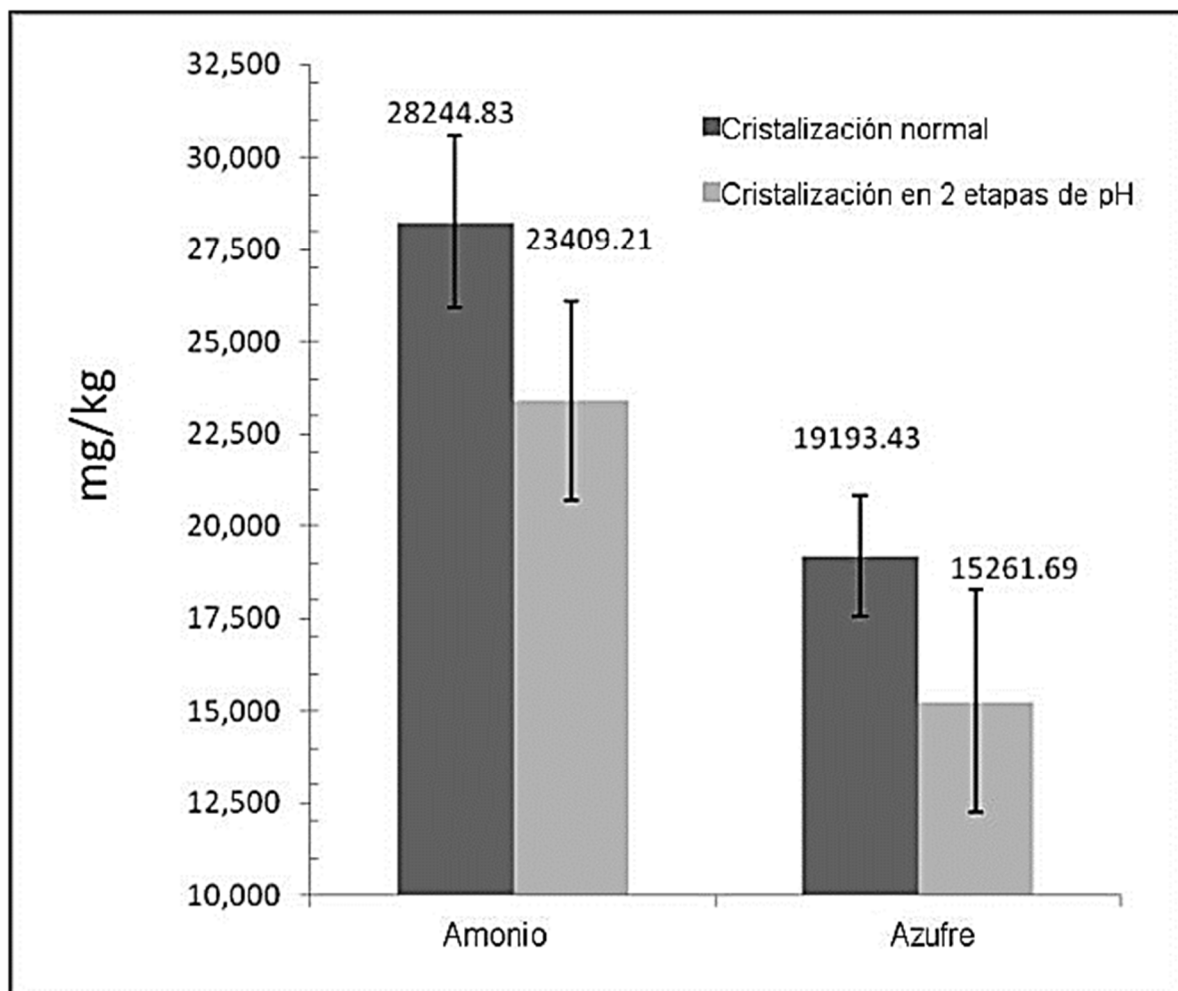
Figura 13B

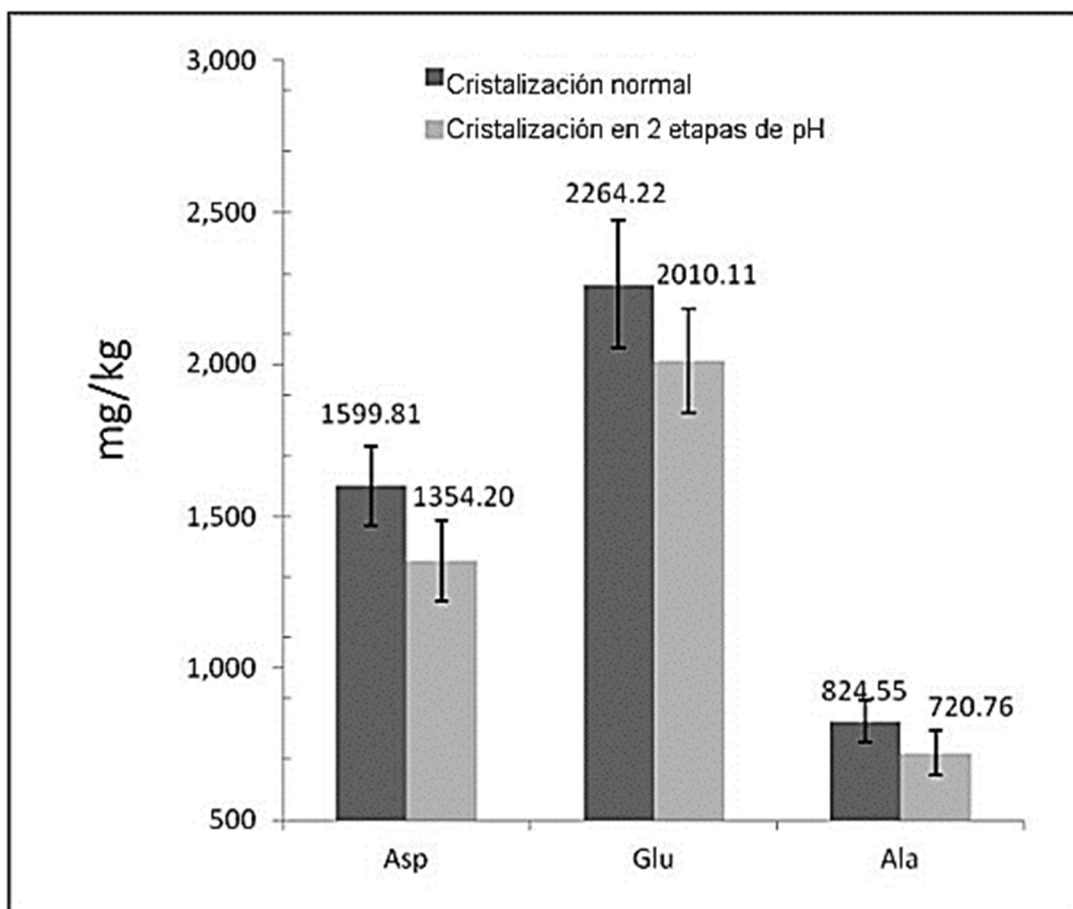
Figura 13C

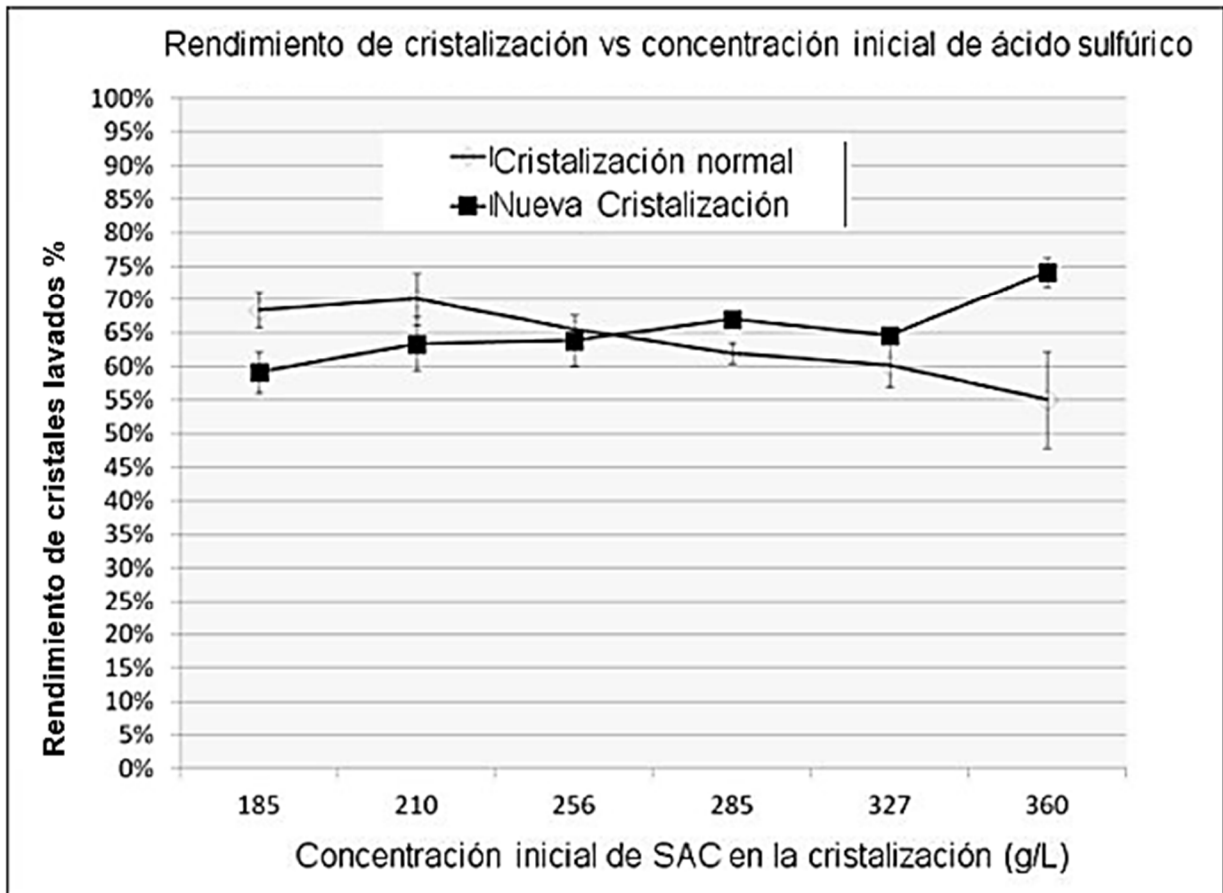
Figura 14

Figura 15A

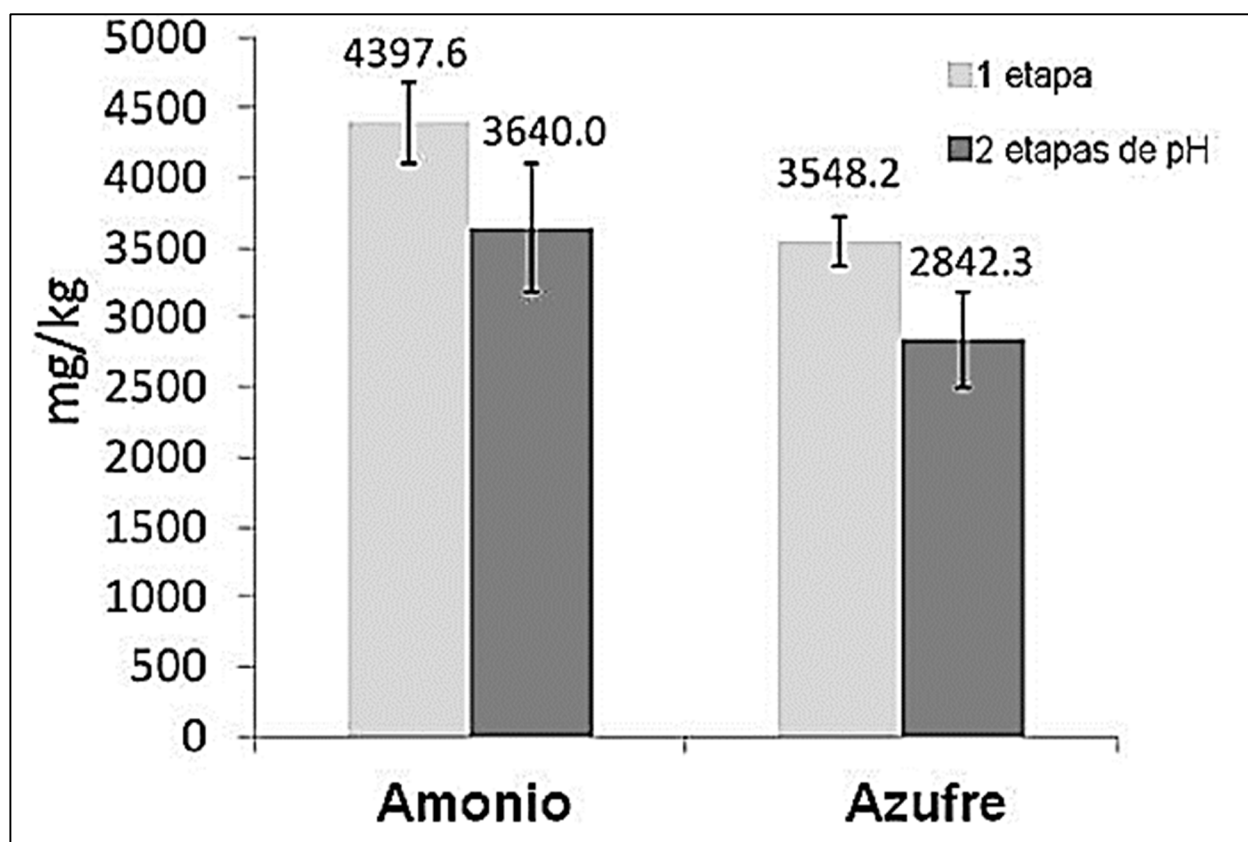


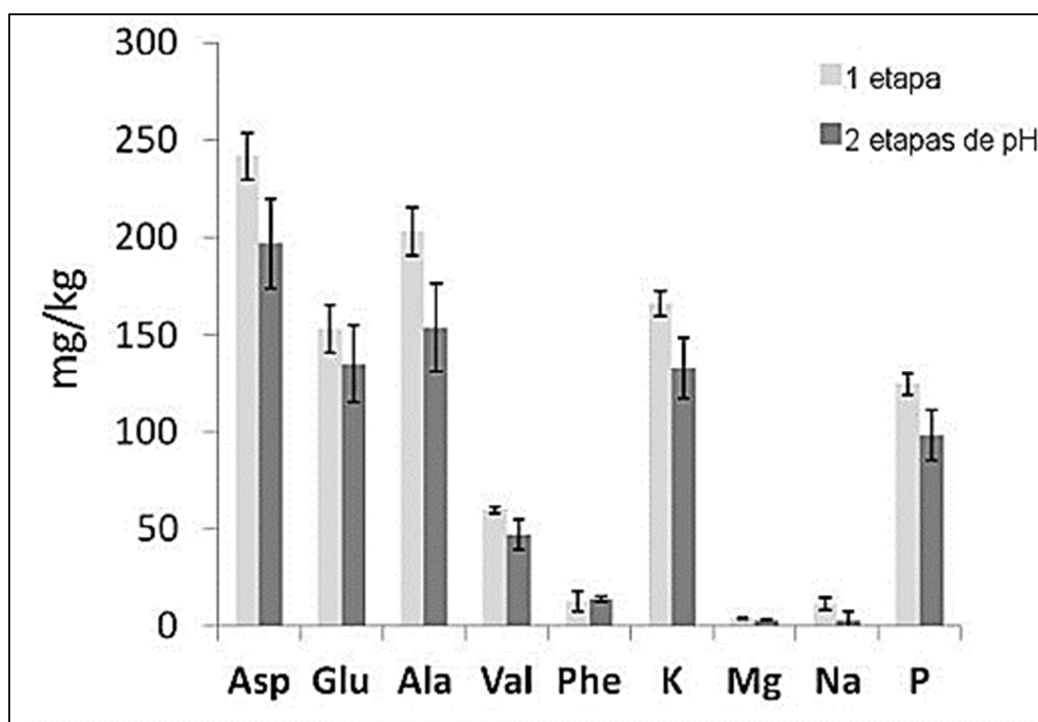
Figura 15B

Figura 15C

