



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



* B R 1 1 2 0 1 6 0 1 9 0 1 2 B 1 *

(11) BR 112016019012-2 B1

(22) Data do Depósito: 19/02/2015

(45) Data de Concessão: 28/11/2023

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE ANILINA ATRAVÉS DE ANTRANILATO

(51) Int.Cl.: C12P 13/00; C12P 7/40.

(30) Prioridade Unionista: 05/12/2014 EP 14196431.2; 20/02/2014 EP 14155937.7.

(73) Titular(es): COVESTRO DEUTSCHLAND AG.

(72) Inventor(es): GERNOT JAEGER; AMGAD SALAH MOUSSA; JORGEN MAGNUS.

(86) Pedido PCT: PCT EP2015053524 de 19/02/2015

(87) Publicação PCT: WO 2015/124686 de 27/08/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 17/08/2016

(57) Resumo: PRODUÇÃO DE ANILINA ATRAVÉS DE ANTRANILATO. A presente invenção se refere a um método para produzir anilina que compreende as etapas de: a) fornecer o-aminobenzoato, em que o dito o-aminobenzoato compreende ânion antranilato e um cátion adequado, b) converter o dito ânion antranilato em anilina através de descarboxilação térmica na presença ou na ausência de um catalisador, c) extrair a anilina produzida na etapa b) em um solvente orgânico pelo menos uma vez, e d) purificar a anilina produzida nas etapas b) e c) através de destilação, em que a dita destilação produz anilina e uma fase aquosa.

MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE ANILINA ATRAVÉS DE ANTRANILATO

[001] A presente invenção se refere ao campo de produção de anilina a partir de matéria-prima de recursos renováveis, tal como, por exemplo, biomassa através de um hospedeiro microbiano adequado, seguida pela conversão química de um produto intermediário em anilina.

[002] A anilina é atualmente produzida em vários milhões de toneladas por ano a partir de matérias-primas fósseis, por exemplo, para produzir poliuretanos. Uma fonte de anilina com base em recursos renováveis, também denominada "bioanilina", é muito desejada para a indústria química, a fim de se tornar independente de recursos fósseis. De modo mais importante, há um grande desejo de reduzir as emissões de dióxido de carbono (CO₂) tanto para os processos químicos quanto aumentando-se o uso de recursos renováveis nas matérias-primas. A bioanilina tem um alto potencial de redução de emissões de CO₂.

[003] A presente invenção se refere adicionalmente à engenharia de micro-organismos e à produção de compostos aromáticos dos mesmos. Em particular, a presente invenção se refere ao campo de produção de o-aminobenzoato (oAB) de fontes renováveis, tais como, por exemplo, biomassa em um hospedeiro microbiano recombinante adequado. Tipicamente uma fonte que contém uma proporção significativa de açúcares fermentáveis é usada. Esses açúcares podem incluir polissacarídeos tais como dissacarídeos, por exemplo, sacarose, ou trissacarídeos, por exemplo, cestose, bem como monossacarídeos C-6 tais como glicose, frutose ou manose e monossacarídeos C-5 tais como xilose e arabinose. Uma cepa microbiana recombinante com capacidade para converter açúcar

em o-aminobenzoato (2-aminobenzoato, *orto*-aminobenzoato, o-aminobenzoato, oAB) possibilitaria a produção de o-aminobenzoato de uma ampla gama de recursos renováveis incluindo beterraba sacarina e cana-de-açúcar, plantas que contêm amido tais como milho, trigo e centeio, bem como lignocelulose, por exemplo, de palha, madeira ou bagaço.

[004] Atualmente, não há fontes biologicamente derivadas ou renováveis de o-aminobenzoato ou do ácido correspondente disponível comercialmente e nenhum exemplo conhecido da produção biológica em grande escala de o-aminobenzoato foi descrita. O o-aminobenzoato é um intermediário natural da via do ácido chiquimato e um precursor para a biossíntese do aminoácido aromático L-triptofano. A via biossintética para o o-aminobenzoato é relativamente bem conhecida tanto em procariotas quanto em eucariotas. Uma conversão química de o-aminobenzoato em anilina pode ser alcançada. Métodos atuais de produção de anilina se baseiam na síntese química de matérias-primas derivadas de petróleo. Essas matérias-primas derivadas de petróleo não são renováveis em oposição a matérias-primas que são renováveis, tais como o recurso renovável "biomassa". Várias etapas químicas envolvidas na síntese química resultam em altos custos de produção dos produtos químicos. A síntese química convencional de anilina pode ser associada a produtos residuais, solventes e intermediários perigosos que podem ter impactos substanciais no ambiente. Efeitos colaterais não específicos no anel aromático resultam na redução de rendimento do produto. As matérias-primas derivadas de petróleo são influenciadas por flutuações de custo que resultam do preço do petróleo global.

[005] O documento WO 2013/103894 A1 revela um método de produção de amins aromáticas através do ácido *p*-aminobenzoico biologicamente derivado (4-aminobenzoato). No entanto, esse documento revela a produção do ácido *p*-aminobenzoico em *E. coli* ou em *S. cerevisiae* e deixa de reconhecer as vantagens de *Corynebacterium glutamicum* como hospedeiro. Além disso, esse documento também não revela como combinar, de modo bem-sucedido, o processo de fermentação com o processo químico a jusante de conversão do ácido *p*-aminobenzoico biologicamente derivado em amins aromáticas, por exemplo, anilina. Em relação à tecnologia do processo químico a jusante de como converter quimicamente ou produzir biologicamente o ácido *p*-aminobenzoico, esse documento meramente se refere a métodos de destilação sem reconhecer os benefícios técnicos vantajosos de combinar essa parte com a parte a montante do fornecimento do ácido *p*-aminobenzoico na forma de um processo contínuo.

[006] Pensou-se que uma fermentação direta de açúcar em anilina como uma conversão de uma etapa fosse a mais eficaz em termos de custos se fosse baseada em uma via biossintética incluindo uma descarboxilação enzimática, *in vivo*, de antranilato em anilina como a etapa de reação final. Visto que uma aminobenzoato descarboxilase pode não ser desenvolvida ou identificada de modo bem-sucedido através da engenharia de proteínas, a reação de descarboxilação de antranilato em anilina pode não ser executada por meios puramente enzimáticos. Visto que tal processo de uma etapa não era tecnicamente viável, alternativas de processo para realizar a etapa de reação final de descarboxilação de

antranilato em anilina como a etapa de reação final foram levadas em consideração, por exemplo, através de uma etapa química, em oposição a uma etapa enzimática.

[007] Portanto, o problema da técnica da presente invenção é fornecer um método de produção de anilina que seja baseado em produtos de partida químicos ou que seja baseado em recursos renováveis que sejam superiores aos produtos químicos existentes e métodos de fermentação e que alcance uma grande redução nas emissões de dióxido de carbono, independência de recursos fósseis e custos de produção semelhantes ou inferiores em comparação com processos de produção baseados em petróleo estabelecidos.

[008] A presente invenção adicionalmente resolve o dito problema através do fornecimento de um método para produzir anilina que compreende as etapas de:

- a) fornecer o-aminobenzoato, em que o dito o-aminobenzoato compreende ânion antranilato e um cátion adequado,
- b) converter o dito ânion antranilato em anilina através de descarboxilação térmica na presença ou ausência de um catalisador,
- c) extrair a anilina produzida na etapa b) em um solvente orgânico pelo menos uma vez, e
- d) purificar a anilina produzida nas etapas b) e c) através de destilação, em que a dita destilação produz anilina e uma fase aquosa.

[009] A mudança para a produção de anilina com base em recursos renováveis, por exemplo, fontes de carbono fermentáveis ou biomassa, oferece as vantagens de reduzir as

emissões de CO₂ significativamente, possibilita a independência de recursos fósseis, e permite uma possível redução no custo de produção. Uma vantagem adicional da presente invenção é que o uso de produtos químicos perigosos e o resíduo resultante são mantidos em um mínimo. Adicionalmente, o o-aminobenzoato biologicamente derivado pode ser produzido e convertido em anilina em um processo com muito menos impacto total no ambiente.

[0010] A seguir, alguns termos usados para descrever a presente invenção são definidos.

[0011] O termo "bioanilina", de acordo com a presente invenção, se refere à anilina que é baseada em matéria-prima de recursos renováveis, tais como beterraba sacarina, cana-de-açúcar, plantas que contêm amido, preferencialmente milho, trigo e centeio, e lignocelulose, preferencialmente palha, madeira e bagaço, glicerol e compostos C1, preferencialmente CO, ou tais como açúcares fermentáveis, preferencialmente monossacarídeos C-5, monossacarídeos C-6, dissacarídeos e trissacarídeos, em que os monossacarídeos C-5 preferencialmente são xilose e arabinose, e em que os monossacarídeos C-6 preferencialmente são glicose, frutose ou manose, e em que o dissacarídeo preferencialmente é sacarose, e em que o trissacarídeo preferencialmente é cestose.

[0012] "O-aminobenzoato", de acordo com a presente invenção, se refere a orto-aminobenzoato (o-aminobenzoato, "oAB", "2-AB"). O o-aminobenzoato pode estar presente na forma do sal de antranilato que compreende o ânion antranilato, C₆H₄COO⁻ e um cátion adequado, tal como NH₄⁺ ou Na⁺, ou como ácido antranílico, que é o zwitterion C₆H₄COO⁻

NH_3^+ e $\text{C}_6\text{H}_4\text{COO}^- \text{NH}_2$. O "o-aminobenzoato" ("oAB", "2-AB") é diferente do "4-aminobenzoato" ("para-AB", "p-AB") em que o grupo amino é unido ao anel benzeno na posição C_4 (para) em oposição à posição C_2 (orto) no caso do o-aminobenzoato ("oAB"). O "o-aminobenzoato", de acordo com a presente invenção, pode ser fornecido através de métodos químicos convencionais ou como um produto químico que seja obtido comercialmente, ou esse pode ser fornecido biologicamente por meio de um hospedeiro microbiano recombinante que tem a capacidade de produzir o-aminobenzoato através de fermentação. Um exemplo para um produto químico, o-aminobenzoato obtido comercialmente, é oAB conforme adquirido junto à Sigma Aldrich, nº de catálogo A89855.

[0013] O termo "hospedeiro", dentro do significado da presente invenção, pode compreender qualquer hospedeiro que tenha a capacidade de produzir o-aminobenzoato através de fermentação, ou naturalmente, ou apenas após a transformação como um "hospedeiro microbiano recombinante" ou, adicionalmente ao o-aminobenzoato naturalmente presente, seja na forma do ânion antranilato ou como ácido antranílico, após a transformação. Um "hospedeiro microbiano", de acordo com a presente invenção, pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em bactérias, leveduras e fungos. O dito hospedeiro pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em bactérias, leveduras e fungos, em que a dita bactéria preferencialmente é uma cepa de *Escherichia coli*, uma cepa de *Corynebacterium* ou uma cepa de *Pseudomonas*, em que a dita cepa de *Corynebacterium* preferencialmente é *Corynebacterium glutamicum*, e em que a dita cepa de *Pseudomonas*

preferencialmente é *Pseudomonas putida*. Preferencialmente, o dito hospedeiro microbiano pode ser um hospedeiro microbiano recombinante. Tal hospedeiro microbiano recombinante pode ser *E. coli* W3110 *trpD9923*, conforme mostrado no **Exemplo 1**, ou pode ser *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, ou também pode ser *Pseudomonas putida* KT2440.

[0014] O termo "modificação genética", dentro do significado da presente invenção, se refere a mudanças na sequência de ácidos nucleicos de um dado gene de um hospedeiro microbiano em comparação com a sequência de tipo selvagem. Tal modificação genética pode compreender deleções bem como inserções de um ou mais ácidos desoxirribonucleicos. Tal modificação genética pode compreender deleções parciais ou completas bem como inserções introduzidas por transformações no genoma de um hospedeiro microbiano. Tal modificação genética pode produzir um hospedeiro microbiano recombinante, em que a dita modificação genética pode compreender mudanças de pelo menos um, dois, três, quatro ou mais nucleotídeos individuais em comparação com a sequência de tipo selvagem do respectivo hospedeiro microbiano. Por exemplo, uma modificação genética pode ser uma deleção ou inserção de pelo menos um, dois, três, quatro ou mais nucleotídeos individuais ou uma transformação de pelo menos um, dois, três, quatro ou mais nucleotídeos individuais. Uma modificação genética, de acordo com a presente invenção, pode ter o efeito, por exemplo, de uma expressão reduzida do respectivo gene ou, por exemplo, de uma expressão acentuada do respectivo gene. Em um exemplo de tal modificação genética, de acordo com a presente invenção, um hospedeiro

microbiano recombinante, por exemplo, *Escherichia coli*, pode compreender uma modificação genética do gene *trpD* que codifica a enzima antranilato fosforribosil transferase, em que a dita modificação genética pode ter o efeito de uma expressão reduzida do gene *trpD* modificado. Tal hospedeiro microbiano recombinante pode ser *E. coli* W3110 *trpD9923*, conforme mostrado no **Exemplo 1**.

[0015] O termo "fermentação em batelada", dentro do significado da presente invenção, se refere a uma reação de fermentação única que tem um ponto de partida definido e um ponto final definido. A fermentação em batelada pode ser usada na etapa a) do método de acordo com a presente invenção em casos nos quais as taxas de produção dos micro-organismos não podem ser mantidas em uma taxa alta no modo de fermentação contínua.

[0016] O termo "fermentação em batelada alimentada", dentro do significado da presente invenção, é definido como uma técnica operacional nos processos biotecnológicos em que um ou mais nutrientes (substratos) são alimentados (supridos) ao biorreator durante o cultivo, e em que o(s) produto(s) permanece(m) no biorreator até o fim da execução. A "fermentação em batelada alimentada" pode ser usada na etapa a) do método de acordo com a presente invenção, em casos nos quais as taxas de produção dos micro-organismos não podem ser mantidas em uma taxa alta no modo de fermentação contínua.

[0017] O termo "fermentação contínua", dentro do significado da presente invenção, se refere a um método de fermentação em que se adiciona substrato e o produto (isto é, o-aminobenzoato, oAB) é removido continuamente durante a

fermentação na etapa a) do método de acordo com a presente invenção.

[0018] A seguir, a presente invenção é descrita em mais detalhes.

[0019] A presente invenção fornece um método para produzir anilina que compreende as etapas de:

- a) fornecer o-aminobenzoato, em que o dito o-aminobenzoato compreende ânion antranilato e um cátion adequado,
- b) converter o dito ânion antranilato em anilina através de descarboxilação térmica na presença ou ausência de um catalisador,
- c) extrair a anilina produzida na etapa b) em um solvente orgânico pelo menos uma vez, e
- d) purificar a anilina produzida nas etapas b) e c) através de destilação, em que a dita destilação produz anilina e uma fase aquosa.

[0020] Em uma modalidade preferencial do método de acordo com a presente invenção, o o-aminobenzoato, na etapa a) de fornecimento do o-aminobenzoato, é fornecido quimicamente ou produzido biologicamente, de modo preferencial, esse é produzido biologicamente através de fermentação de uma matéria-prima que compreende pelo menos um substrato de carbono fermentável com o uso de uma célula hospedeira microbiana recombinante com a capacidade de converter a dita matéria-prima que compreende um substrato de carbono fermentável em o-aminobenzoato através de fermentação, em que o dito o-aminobenzoato compreende ânion antranilato e um cátion adequado. Tal cátion adequado da

etapa a) pode ser NH_4^+ ou Na^+ , como compreendido, por exemplo, em uma solução de NH_4OH e em uma solução de NaCl .

[0021] Em uma modalidade adicional do método de acordo com a invenção, a fermentação da etapa a) de produção de *o*-aminobenzoato pode ser uma fermentação em batelada, uma fermentação em batelada alimentada ou uma fermentação contínua. Tal fermentação pode ser realizada em um reator de fermentação, em que uma célula hospedeira microbiana recombinante com a capacidade de converter a matéria-prima que compreende um substrato de carbono fermentável em *o*-aminobenzoato através de fermentação é cultivada. Tal cultivo pode ser executado na presença de uma fonte de carbono adequada, por exemplo, xarope de milho, suco de cana-de-açúcar, melaços e similares. Tal cultivo também pode ser executado na presença de uma fonte de nitrogênio adequada, por exemplo, gás de amônia, solução de hidróxido de amônio, sulfato de amônio, nitrato de amônio, água de maceração de milho e similares na presença de micronutrientes necessários para a sobrevivência da célula hospedeira microbiana recombinante. O pH em tal fermentação pode ser mantido em um valor entre 6,5 e 7,5 com adição de uma base, por exemplo, gás de amônia, hidróxido de amônio, hidróxido de sódio e similares.

[0022] A produção do *o*-aminobenzoato biologicamente na etapa a) do método da presente invenção pode ser realizada através de fermentação contínua, preferencialmente em um fermentador que seja operado continuamente. Em tal fermentação contínua de acordo com a presente invenção, o caldo de fermentação é retirado continuamente do fermentador

e processado através de um dispositivo para separar a biomassa, por exemplo, através de filtração, uma centrífuga, membranas e similares.

[0023] Pode-se adicionar oxigênio suficiente ao reator de fermentação usado na etapa a), seja puro, como ar, ou como ar enriquecido. O caldo de fermentação livre de células é essencialmente uma solução de um sal de o-aminobenzoato (oAB) com o ânion antranilato e um contracátion. A solução de oAB pode ter uma concentração entre 5 g/litro e 500 g/litro, preferencialmente entre 20 g/litro e 200 g/litro, e com a máxima preferência entre 50 g/litro e 150 g/litro do sal de oAB.

[0024] Em uma modalidade preferencial do método de acordo com a presente invenção, a etapa a) até a etapa d) podem ser executadas continuamente.

[0025] O cátion adequado da etapa a) de produção de o-aminobenzoato pode ser NH_4^+ ou Na^+ .

[0026] Em uma modalidade particularmente preferencial do método de acordo com a presente invenção, o hospedeiro microbiano recombinante da etapa a) de produção de o-aminobenzoato pode ser removido antes da conversão subsequente do dito ânion antranilato em anilina através de descarboxilação térmica na etapa b). Tal hospedeiro microbiano recombinante removido pode preferencialmente ser realimentado à fermentação da etapa a) de produção de o-aminobenzoato. Isso significa que a biomassa que compreende o hospedeiro microbiano recombinante pode ser reciclada para o fermentador e para a fermentação da etapa a) após a purga de uma pequena porção da biomassa que compreende o hospedeiro

microbiano recombinante. Tal corrente de purga da biomassa pode ser útil a fim de evitar o acúmulo de biomassa. Uma porção da célula hospedeira microbiana que se multiplica no fermentador e as células mortas podem, assim, ser removidas a fim de manter a concentração de células hospedeiras vivas no reator da etapa de fermentação a) dentro de limites definidos, com a máxima preferência, constante. Isso pode ser diferente no caso de fermentação em batelada alimentada, em que as células hospedeiras recombinantes e o(s) produto(s) de fermentação permanecem no biorreator até o fim da execução que, portanto, não é não uma fermentação contínua mas uma fermentação em batelada alimentada.

[0027] Quando se realiza a conversão do dito ânion antranilato em anilina através de descarboxilação térmica na presença ou na ausência de um catalisador na etapa b) do método de acordo com a presente invenção, o catalisador, se for usado, pode ser um catalisador de ácido heterogêneo, preferencialmente um zeólito, com a máxima preferência, zeólito H-Y, zeólito H-Y (G0257), por exemplo, conforme obtido junto à Zeolyst International, número de catálogo CBV600. O catalisador ácido zeólito H-Y (G0257, $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 5,5$) tem um caráter ácido particularmente alto e tem um tamanho de poro maior (0,7 a 0,8 nm) do que, por exemplo, ZSM5-27, que também possui caráter ácido, porém tem tamanho de poro menor (0,5 nm), de modo que as moléculas AA não podem penetrar nesses e, conseqüentemente, não têm acesso aos sítios ativos do catalisador ácido.

[0028] Em uma modalidade adicional, durante a realização da conversão do dito ânion antranilato em anilina através de

descarboxilação térmica na presença ou na ausência de um catalisador na etapa b) do método de acordo com a presente invenção, o catalisador, se for usado, também pode ser um catalisador básico heterogêneo, preferencialmente um hidróxido de dupla camada, com a máxima preferência hidrotalcita Mg-Al, que tem um caráter básico (HTC, $Mg_6Al_2(CO_3)(OH)_{16} \cdot 4H_2O$).

[0029] Durante a realização da descarboxilação térmica da etapa b) do método de acordo com a presente invenção, a solução de o-aminobenzoato da etapa a) que compreende ânion antranilato e um cátion adequado pode ser alimentada a um reator químico que pode operar em uma temperatura entre 150 °C e 250 °C, preferencialmente entre 160 °C e 220 °C, com a máxima preferência, entre 180 °C e 200 °C.

[0030] O tempo de reação para realizar a descarboxilação térmica da etapa b) do método de acordo com a presente invenção deve ser suficiente para uma reação em anilina com um alto rendimento. Mais especificamente, a exigência de tempo para realizar a descarboxilação térmica da etapa a) pode ser da ordem de 0,5 hora a 3 horas.

[0031] A pressão no reator, em que a etapa de descarboxilação térmica b) pode ser realizada, pode ser selecionada como uma função de quanto da água e da anilina se permite evaporar durante a reação e deixar o reator com o CO₂ produzido durante a reação de descarboxilação térmica. O produto da etapa de descarboxilação térmica b), isto é, o efluente do reator, pode essencialmente ser uma mistura de água e anilina homogênea.

[0032] Esse efluente de reator da etapa b) pode ser

alimentado diretamente a uma sequência de destilação heteroazeotrópica, em que água e anilina são recuperadas como produtos de fundo. Essa opção pode ser realizada se após a descarboxilação térmica da etapa b) tiver um alto teor de anilina, geralmente acima 120 g/litro. No entanto, para uma baixa concentração de anilina após a etapa de descarboxilação térmica b), por exemplo, 120 g/litro e menos, a separação de anilina direta após a etapa b) é praticamente inviável apenas através de destilação, visto que o consumo de energia se torna proibitivamente grande.

[0033] Portanto, o método de acordo com a presente invenção compreende a etapa adicional c) de extração da anilina produzida na descarboxilação térmica da etapa b) em um solvente orgânico pelo menos uma vez, antecipadamente em relação ao procedimento da etapa d) de purificação da anilina através de destilação. Desse modo, a etapa de extração c) é usada como uma etapa de pré-concentração antecipada de destilação na etapa d). A mistura de anilina e água que é o produto da descarboxilação térmica da etapa b) pode ser alimentada a um dispositivo de extração, por exemplo, um misturador-decantador, uma coluna pulsada e similares, em que se pode colocar um solvente orgânico não polar em contato com uma alta afinidade com anilina, preferencialmente um com um ponto de ebulição mais alto do que aquele da anilina, por exemplo, 1-dodecanol. O solvente orgânico que é usado no método de acordo com a presente invenção pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis, fenóis, amidas, éteres e hidrocarbonetos aromáticos. Em uma modalidade preferencial da presente invenção, o álcool usado como o

solvente orgânico preferencialmente é 1-dodecanol.

[0034] Em uma modalidade adicional do método de acordo com a presente invenção, a extração de anilina em um solvente orgânico na etapa c) pode ser realizada por mais de uma vez para uma pré-concentração adicional de anilina antecipada de destilação a fim de obter um rendimento ainda mais alto de anilina produzida.

[0035] O solvente orgânico usado na extração da etapa c) pode preferencialmente ser recuperado. Tal recuperação do solvente orgânico pode preferencialmente ser realizada através de destilação. O solvente orgânico recuperado pode preferencialmente ser realimentado à etapa c) do método para ser utilizado novamente para extrair a anilina produzida na etapa b). Isso significa que a mistura de anilina e solvente orgânico pode ser destilada, em que a anilina e qualquer água penetrou ou se dissolveu nessa, e o solvente não polar pode ser recuperado como um produto de topo. A corrente de topo que contém anilina em uma concentração variante é, então, alimentada à destilação da etapa d), que pode ser uma destilação heteroazeotrópica.

[0036] Em ainda outra modalidade do método de acordo com a presente invenção, o método compreende a adicionalmente a etapa e) de realimentação da fase aquosa da extração realizada na etapa c) à fermentação da etapa a).

[0037] O método também pode compreender a etapa adicional de realimentação da fase aquosa da destilação realizada na etapa d) à fermentação da etapa a).

[0038] O cátion NH_4^+ que pode ser usado como um cátion adequado na etapa de produção a) do método de acordo com a

presente invenção pode ser recuperado como NH_3 subsequentemente à destilação da etapa d) e realimentado à fermentação da etapa a).

[0039] Quando a etapa de produção a) do método de acordo com a presente invenção compreende fermentação, a matéria-prima a ser usada na fermentação da etapa a) pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em beterraba sacarina, cana-de-açúcar, plantas que contêm amido, preferencialmente milho, trigo e centeio, e lignocelulose, preferencialmente palha, madeira e bagaço, glicerol e compostos C1, preferencialmente CO.

[0040] Quando a etapa de produção a) do método de acordo com a presente invenção compreende fermentação, o pelo menos um substrato de carbono fermentável contido na matéria-prima a ser usada na fermentação da etapa a) pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em monossacarídeos C-5, monossacarídeos C-6, dissacarídeos, e trissacarídeos, em que os monossacarídeos C-5 preferencialmente são xilose e arabinose, e em que os monossacarídeos C-6 preferencialmente são glicose, frutose ou manose, e em que o dissacarídeo preferencialmente é sacarose, e em que o trissacarídeo pode preferencialmente ser cestose.

[0041] O hospedeiro microbiano recombinante que pode ser usado na etapa de fermentação a) de produção de o-aminobenzoato pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em bactérias, leveduras e fungos, em que a dita bactéria preferencialmente pode ser uma cepa de *Escherichia coli*, uma cepa de *Corynebacterium* ou uma cepa de *Pseudomonas*, em que a dita cepa de *Corynebacterium* preferencialmente pode

ser *Corynebacterium glutamicum*, e em que a dita cepa de *Pseudomonas* preferencialmente pode ser *Pseudomonas putida*.

[0042] Em uma modalidade preferencial da presente invenção, o hospedeiro microbiano recombinante que pode ser usado na fermentação da etapa a) pode ser *Escherichia coli*, preferencialmente *E. coli* W3110, ainda mais preferencialmente *E. coli* W3110 *trpD9923* (adquirida junto ao *E. coli* Genetic Resource Center na Yale University).

[0043] Em uma modalidade preferencial da presente invenção, o hospedeiro microbiano recombinante que pode ser usado na fermentação da etapa a) pode ser *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, ou um hospedeiro microbiano recombinante adicional que seja baseado nessa cepa.

[0044] Em uma modalidade preferencial da presente invenção, o hospedeiro microbiano recombinante que pode ser usado na fermentação da etapa a) pode ser *Pseudomonas putida* KT2440, ou um hospedeiro microbiano recombinante adicional que seja baseado nessa cepa.

[0045] A presente invenção adicionalmente fornece o uso da anilina produzida de acordo com o método da presente invenção, conforme descrito no presente documento, e conforme reivindicado nas reivindicações para produzir metilenodianilina (MDA), em que a anilina produzida é adicionalmente convertida em metilenodianilina (MDA) com formaldeído na presença de água e catalisador. A MDA produzida pode ser adicionalmente convertida em metilenodiisocianato (MDI) com fosgênio.

[0046] Será aparente para aqueles versados na técnica que várias modificações podem ser feitas aos métodos e cepas

de hospedeiro recombinante da presente invenção. Assim, pretende-se que a presente invenção cubra tais modificações e variações, desde que estejam dentro do escopo das reivindicações anexas e seus equivalentes.

Figuras e tabelas

[0047] A **Figura 1** mostra o conceito geral do método de acordo com a presente invenção que compreende a conversão de matérias-primas em antranilato na etapa de fermentação seguida por uma conversão química e purificação em anilina no processamento a jusante.

[0048] A **Figura 2** mostra uma visão geral mais detalhada do método de acordo com a presente invenção. O cátion adequado da etapa a) pode ser NH_4^+ ou Na^+ , então NH_3 ou NaOH pode ser usado como um tampão no fermentador.

[0049] A **Figura 3** mostra a integração de um módulo de fermentação de fibra oca com um corte de valor de 750 kDa para a retenção celular durante a fermentação contínua.

[0050] A **Figura 4** mostra a produção de ácido antranílico nas cepas de *E. coli* W3110 trp Δ 9923 Δ pts Glc⁺ (com 0,51 mM, melhores resultados), seguida por *E. coli* W3110 trp Δ 9923 (com quase 0,2 mM a menos do que Glc⁺ após 38 h) e a taxa de produção mais baixa foi com *E. coli* W3110 trp Δ 9923 Δ pts Glc⁻ (com 5x menos concentração de ácido antranílico produzido após 38 h).

[0051] A **Figura 5** mostra a cinética de descarboxilação de A) AA 0,5 % em peso e de B) NH_4AA 3 % em peso em solução tampão aquosa em 160 °C.

[0052] A **Figura 6** mostra a cinética de descarboxilação de NH_4AA com catalisadores diferentes, isto é, Zeólito H-Y,

Zeólito H-ZSM5 e Zircônia Sulfatada, conforme descrito no **Exemplo 3**.

[0053] A **Tabela 1** mostra as ordens de reação e coeficientes de taxa de descarboxilação de ácido antranílico (AA) e NH₄AA em soluções tampão em 160 °C e 180 °C mostrado no **Exemplo 2**.

[0054] A **Tabela 2** mostra uma comparação das capacidades de absorção de zeólito Y trocado por metal com ZSM-5 e Hidroxiapatita, conforme mostrado no **Exemplo 4**.

Exemplos

Exemplo 1 - Experimentos para produzir ácido antranílico com *E. coli*

[0055] A cepa *E. coli* W3110 *trpD9923* foi adquirida junto ao *E. coli* Genetic Resource Center na Yale University. A cepa havia sido gerada através de mutagênese aleatória e continha um gene *trpD* mutado denominado *trpD9923*. A enzima truncada relacionada do *trpD9923* gene havia perdido sua capacidade de catalisar a reação de antranilato fosforribosil transferase, porém havia mantido sua atividade de antranilato sintase. A cepa pode, portanto, sintetizar antranilato, porém não pode metabolizar esse além do triptofano e é, assim, auxotrófico para triptofano. Isso leva a um excesso de antranilato.

[0056] Essa cepa foi cultivada em frascos de agitação de 50 ml com um volume de cultura de 10 ml em 28 °C e 140 rpm. O meio usado foi o meio mineral M9 com triptofano definido conforme a seguir: 10 g/l de glicose, 6 g/l de Na₂HPO₄, 0,5 g/l de NaCl, 3 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de NH₄Cl, 246,5 mg/l de MgSO₄, 14,7 mg/l de CaCl₂, 10 mg/l de Tiamina (vitamina B1), 20 mg/l de triptofano. A cepa produziu 60 mg/l de ácido antranílico após 25,5 h conforme medido através de HPLC. As

cepas comparadas eram *E. coli* W3110 *trp* Δ 9923; *E. coli* W3110 *trp* Δ 9923 Δ pts Glc+; e *E. coli* W3110 *trp* Δ 9923 Δ pts Glc-.

[0057] A auxotrofia para triptofano foi confirmada na cepa *trp* Δ 9923. Em fermentação com meio mineral M9 contendo triptofano, a cepa produziu 60 mg/l de ácido antranílico.

[0058] A cepa foi adicionalmente otimizada através da inativação do sistema de fosfotransferase com o uso de deleção *knock out*. A cepa com deficiência de pts foi adaptada para proliferar em glicose e testada para a produção de antranilato com o uso de fermentação em um frasco de agitação de 25 ml em 37 °C e 150 rpm com um volume de cultura de 10 ml. O mesmo meio para a cepa com pts positivo foi usado. Isso produziu 69 mg/l após 25 horas conforme medido através de HPLC. A produção de ácido antranílico através das três cepas *E. coli* W3110 *trp* Δ 9923; *E. coli* W3110 *trp* Δ 9923 Δ pts Glc+; e *E. coli* W3110 *trp* Δ 9923 Δ pts Glc- apresentaram um aprimoramento significativo após uma incubação prévia em meio de LB. A melhor cepa de produção de ácido antranílico foi *E. coli* W3110 *trp* Δ 9923 Δ pts Glc+ (com 0,51 mM), seguida por *E. coli* W3110 *trp* Δ 9923 (com quase 0,2 mM a menos do que Glc+ após 38 h) e a pior foi *E. coli* W3110 *trp* Δ 9923 Δ pts Glc- (com 5x menos concentração de ácido antranílico produzido após 38 h), como pode ser observado na **Figura 4**.

Exemplo 2 - Cinética de descarboxilação de A) AA 0,5 % em peso e de B) NH₄AA sem catalisador

[0059] Nesse experimento, a cinética da descarboxilação térmica da etapa b) do método de acordo com a presente invenção foi estudada. Se a solução de NH₄OH foi adicionada à solução tampão de ácido antranílico (AA), AA foi gradualmente

transformado em antranilato de amônio, que tinha uma solubilidade muito mais alta (até 10 %) do que a própria AA. Nesse caso, foi possível descarboxilar o íon antranilato em anilina (ANL). AA, ou o-aminobenzoato, respectivamente foi fornecido biologicamente através de um hospedeiro microbiano recombinante conforme descrito no **Exemplo 1**, ou foi fornecido quimicamente, por exemplo, foi obtido comercialmente, por exemplo, junto à Sigma Aldrich, número de catálogo A89855.

[0060] Uma solução tampão contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20 g/l), Na_2HPO_4 (1 g/l) e KH_2PO_4 (1 g/l) em água destilada foi preparada. Então AA a 10 % em peso foi suspenso nessa solução. Uma solução de NH_4OH (28 a 30 % de NH_3) foi adicionada por gotejamento nessa suspensão até uma solução amarelo claro ser formada. O pH dessa solução de antranilato de amônio (NH_4AA) foi cerca de 7. A solução de antranilato de amônio (3 % em peso) também foi preparada com o uso desse método.

[0061] 80 ml de cada uma das soluções acima foram transferidos para uma autoclave de 160 ml e aquecidos a 160 °C ou 180 °C, e amostras foram obtidas em intervalos de tempo diferentes para a análise da taxa de formação de anilina (ANL).

[0062] A descarboxilação de AA 0,5 % em peso e NH_4AA 3 % em peso em solução tampão aquosa foi realizada em 160 °C sem o uso de qualquer catalisador. Os estudos com o uso de um modelo resultaram em cinética de pseudoprimeira ordem para reações de caldo. Os perfis dessas reações são mostrados na **Figura 5**. O modelo cinético foi estabelecido com o uso da fórmula de taxa de reação geral conforme abaixo e

considerando os dados experimentais para calcular os parâmetros n e k e n otimizados que são o coeficiente de taxa e a ordem de reação, respectivamente.

$$r = \frac{d[A]}{dt} = k[A]^n$$

$$d[A] = k [A]^n \times dt$$

$$[A]_{t+\Delta t} = [A]_t - k ([A]_t)^n \times \Delta t$$

[0063] Conforme apresentado na **Tabela 1** abaixo, as ordens (n) dessas reações são próximas de 1. O coeficiente de taxa (k) de AA 0,5 % em peso de descarboxilação em água é 6,8 vezes maior do que de NH_4AA a 3 % em peso.

[0064] A cinética de NH_4AA a 10 % em peso de descarboxilação em 160 °C e 180 °C também foi estudada com o uso de dados experimentais e um modelo de simulação.

TABELA 1. ORDENS DE REAÇÃO E COEFICIENTES DE TAXA DE DESCARBOXILAÇÃO DE AA E NH_4AA EM SOLUÇÕES TAMPÃO EM 160 °C E 180 °C.

Reagente	Temperatura de reação (°C)	n	k (h ⁻¹)
AA a 0,5 % em solução tampão	160	0,9207	0,0519
NH_4AA a 3 % em solução tampão	160	0,8706	0,00755
NH_4AA a 10 % em solução tampão	160	1,2758	0,000713
NH_4AA a 10 % em solução tampão	180	0,9793	0,026

[0065] Conforme é observado (**Tabela 1** e **Figura 5**), reações de caldo sucederam a cinética de pseudoprimeira ordem. Além disso, o coeficiente de taxa de a reação em 180 °C é 36 vezes maior do que em 160 °C. Esse número é muito competitivo com aquele do AA a 0,5 % em peso de

descarboxilação em água. Com a máxima importância, há uma grande vantagem de concentração 20 vezes mais alta no caso de NH_4AA . O **Exemplo 2** mostra que os sais de oAB podem ser descarboxilados em soluções aquosas com uma reação que sucede a cinética de primeira ordem. Assim, a conversão visualmente completa de íon antranilato em anilina pode ser alcançada, por exemplo, em um reator de fluxo pistonado ou em uma cascata de tanques de mistura.

Exemplo 3 - Cinética de descarboxilação de NH_4AA com um catalisador

[0066] Esse exemplo segue o mesmo procedimento do Exemplo 2, exceto pelo fato de que para os 80 ml de solução a 1,6 g (2 %) de catalisador ácido foram adicionados. Os catalisadores empregados foram Zeólito H-Y (Zeolyst International, número de catálogo CBV600), Zeólito H-ZSM5 (Süd-Chemie/Clariant número de catálogo H-MFI-27) e Zircônia Sulfatada (Mel Chemicals número de catálogo MELCat XZO 1720). Na **Figura 6**, os resultados estão em comparação com o experimento sem catalisador (em branco) conforme descrito em Exemplo 2. Todos os três dentre o experimento em branco, zircônia sulfatada e ZSM-5 alcançaram uma conversão comparável de AA de 90 a 92 %. Apenas o catalisador ZSM-5 mostrou uma conversão mais alta de AA em anilina, isto é, até 99 %.

Exemplo 4 - Absorção/Dessorção de ácido antranílico em absorvedores minerais

[0067] Como pode ser observado a partir do Exemplo 3 e da **Figura 6**, o catalisador de zeólito-Y, mesmo com a conversão e atividade catalítica mais alta, com quase nenhum ácido

antranílico restante, não proporcionou o rendimento mais alto de anilina como produto. A análise do sólido revelou que a parte ausente do produto de anilina foi fortemente absorvida no próprio catalisador.

[0068] A capacidade de adsorção de AA em tipos diferentes de adsorventes foi testada. O zeólito Y (Zeolyst International, número de catálogo CBV600) e ZSM5 (Sued-Chemie/Clariant número de catálogo H-MFI-27) foram selecionados como zeólitos, que funcionam como peneiras moleculares para diferentes moléculas. A hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Sigma-Aldrich número de catálogo 289396) foi testada devido a sua capacidade de adsorção de AA e alguns outros compostos semelhantes em solventes diferentes.

[0069] Teste de adsorção: Adsorventes já foram calcinados em 300 °C por 3 h para liberar qualquer umidade remanescente. Uma solução de AA (0,5 % em peso) em água foi preparada. 20 ml dessa solução foram transferidos para um frasco de 50 ml contendo 0,2 g de adsorvente. Após um determinado período de tempo em agitação, a concentração de AA em água foi analisada através de HPLC. A diminuição de concentração de AA em água foi considerada como o AA adsorvido.

[0070] Síntese de zeólito trocado por metal: dada a capacidade de adsorção aprimorada de zeólito incorporado por Ca, zeólitos trocados por Ca foram preparados através de troca iônica para serem testados na adsorção de AA. 3 g de zeólito H-Y como pó foram adicionados a uma solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,5 M). A pasta aquosa foi agitada por 4 h e, então, a solução foi substituída por uma fresca e esse procedimento foi repetido duas outras vezes. Finalmente, os

sólidos foram separados por centrifugação e secos em 80 °C e calcinados em 300 °C por 3 h. Quatro outras amostras de zeólito Y trocado por metal com o uso de K, Na, Mg e Fe foram preparadas com o mesmo método conforme descrito acima. As amostras foram, então, identificadas como K-Y, Na-Y, Ca-Y, Mg-Y e Fe-Y.

[0071] Os resultados do estudo de absorção são resumidos na **Tabela 2** abaixo:

Tabela 2: Comparação de capacidades de absorção de zeólito Y trocado por metal com ZSM-5 e Hidroxiapatita

Absorvente	HAP	H-ZSM5	H-Y	Na-Y	K-Y	Mg-Y	Ca-Y	Fe-Y
Capacidade de absorção (g de AA / kg de adsorvente)	10,8 g/kg	11,6 g/kg	24,8 g/kg	25,0 g/kg	27,4 g/kg	27,6 g/kg	36,8 g/kg	51,2 g/kg

[0072] A capacidade de absorção de Zeólito Y é superior em comparação com ZSM-5 e Hidroxiapatita. Isso foi provavelmente devido ao tamanho de poro maior e estrutura de poro diferente. Isso também pode ser aumentado adicionalmente através da troca com cátions. A tendência com carga e tamanho do cátion foi claro, então o processo de absorção foi fortemente dependente da carga de superfície do adsorber.

[0073] Colocando-se o adsorvedor carregado em contato com 80 ml de 10 % de NaOH aquoso, foi possível extrair o AA absorvido de volta na solução, com um rendimento de até 80 %. Colocando-se em contato com 80 ml de solução tampão em pH 7, isto é, o mesmo usado para o processo de absorção, quase nenhuma dessorção (<10 %) foi observada. Esse exemplo mostra que o processo de absorção é um sistema termodinamicamente

equilibrado que é dependente de carga de superfície.

Exemplo 5: seleção de solvente para a extração e coeficiente de distribuição de anilina entre fase aquosa e fase de solvente (orgânico)

[0074] Uma varredura de solvente na base de cálculos COSMO foi realizada. O método COSMO foi empregado com as seguintes duas etapas:

- a) determinar as cargas de superfície nas moléculas circundadas por um bom meio de condução com cálculos de química quântica.
- b) derivar, da distribuição de carga, o potencial químico do soluto em vários solventes.

[0075] Além disso, as restrições adicionais a seguir tiveram que ser levadas em consideração: baixa solubilidade em água, viscosidades moderadas, densidade e tensão interfacial permitem uma separação de fase confortável, alta ebulição em relação anilina. Como resultado, alcoóis de cadeia longa e aminas de cadeia longa e misturas de ambos foram encontrados ($7 < C\text{-número} < 17$).

[0076] Cálculos Unifac para dois alcoóis são mostrados abaixo na **Tabela 3**.

Tabela 3

componente	conc. de solvente na fase aquosa [% em peso]	conc. de água na fase orgânica [% em peso]
1-decanol	0,018	1,46
1-dodecanol	0,0026	0,19

[0077] O uso de uma mistura de isômeros de dodecanol pode oferecer a vantagem de baixa solubilidade mútua e um ponto de fusão mais baixo.

Exemplo 6: Cálculos de projeto para a extração de anilina da água

[0078] A composição de corrente de alimentação nesse exemplo foi 93 % de água, 7 % de anilina. A coluna usada foi uma coluna pulsada. O recheio foi feito com recheio estruturado de metal (devido ao alto rendimento) com uma superfície específica de 500 (exemplos de recheio: Mellapack 500Y ou Montz B1-500). The material era metal inoxidável.

[0079] As dimensões foram conforme a seguir: para a capacidade de 60 t/h de alimentação aquosa (taxa de fluxo de dodecanol calculada com o uso de $F/S = 2$ em p/p):

- Diâmetro ativo interno de coluna = 1200 a 1300 mm
- Comprimento de recheio ativo = 11 a 12 m
- Comprimento de coluna total = 14 a 15 m

[0080] Para uma capacidade de 200 t/h (taxa de fluxo de dodecanol calculada com o uso de $F/S = 2$ em p/p):

- Diâmetro ativo interno de coluna = 2300 a 2500 mm
- Comprimento de recheio = 15 a 16 m
- Comprimento de coluna total = 18 a 19 m

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir anilina caracterizado por compreender as etapas de:

a) fornecer o-aminobenzoato, em que o dito o-aminobenzoato compreende ânion antranilato e NH_4^+ ,

b) converter o dito ânion antranilato em anilina através de descarboxilação térmica,

c) extrair a anilina produzida na etapa b) em um solvente orgânico, e

d) purificar a anilina produzida nas etapas b) e c) através de destilação, em que a dita destilação produz anilina e uma fase aquosa.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa a) à etapa d) são executadas continuamente.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a descarboxilação térmica é realizada na presença de zeólito como um catalisador.

4. Método, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente extração de anilina em um solvente orgânico na etapa c) para uma pré-concentração de anilina antecipada de destilação.

5. Método, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado por compreender recuperar o solvente orgânico usado na extração da etapa c).

6. Método, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o dito solvente orgânico é selecionado a partir do grupo que consiste em álcoois, fenóis, amidas, éteres e hidrocarbonetos aromáticos.

Figuras

Figura 1

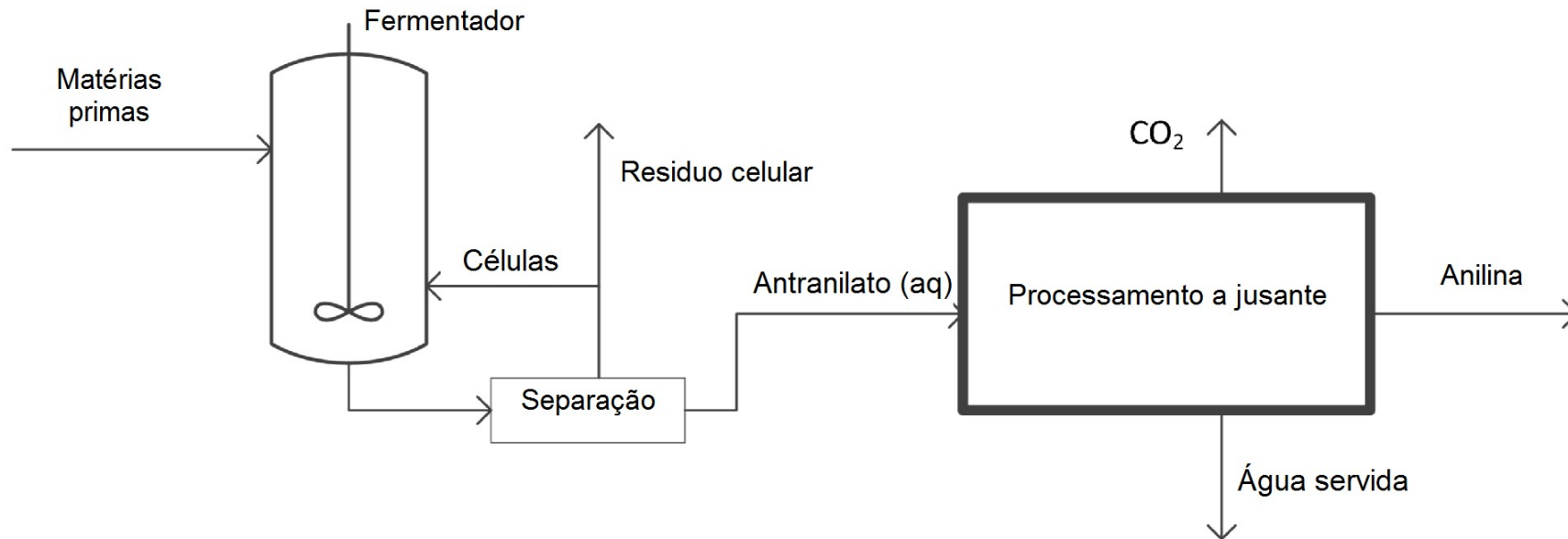


Figura 2

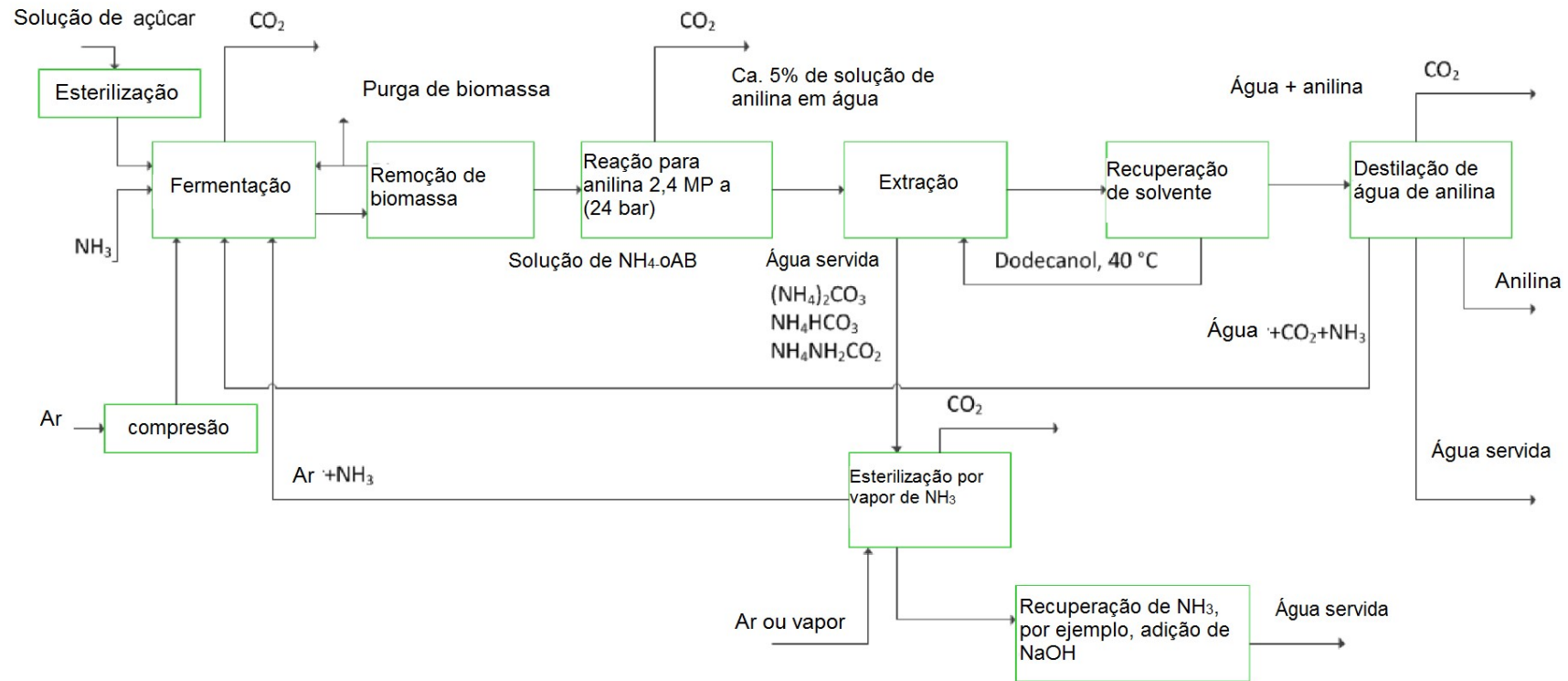


Figura 3

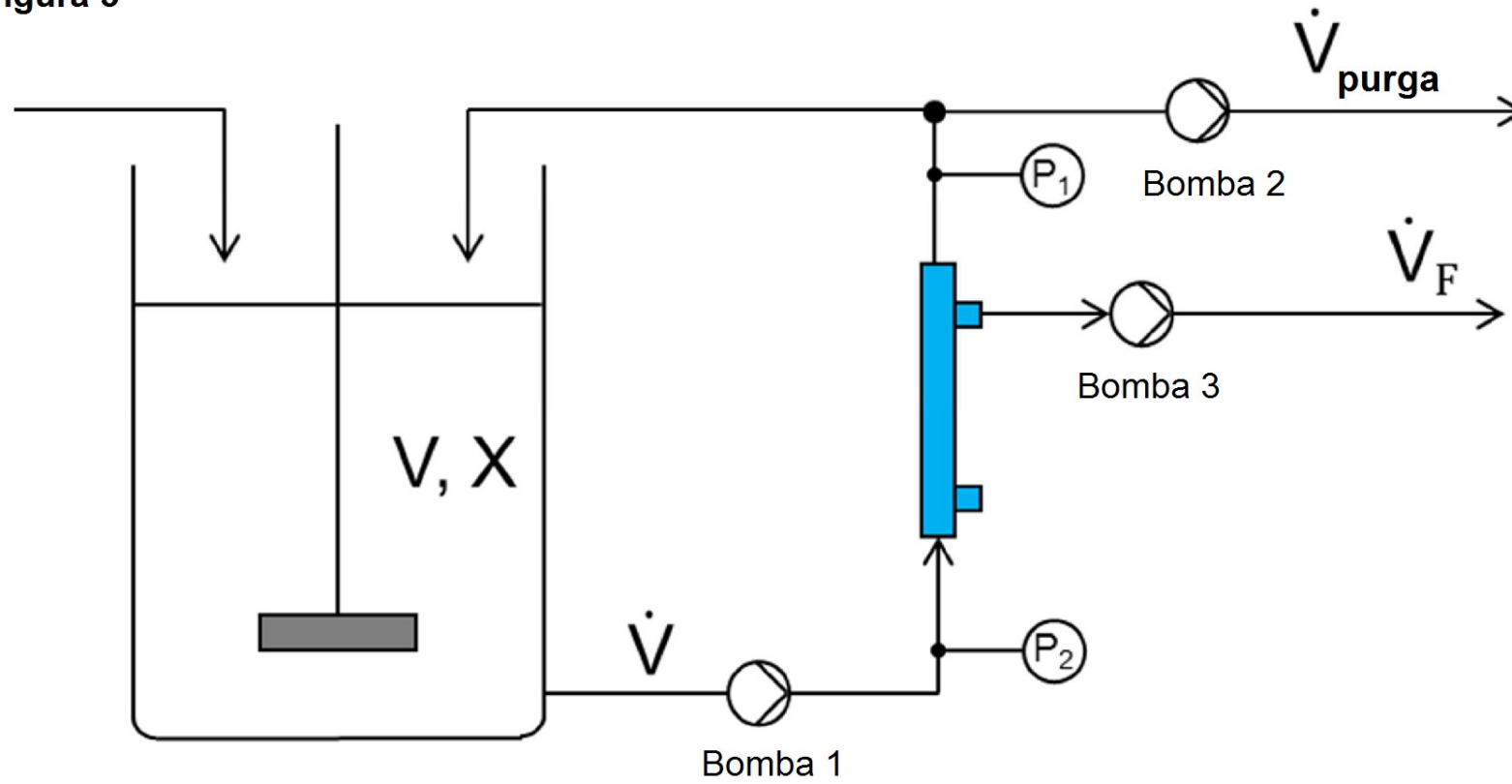


Figura 4

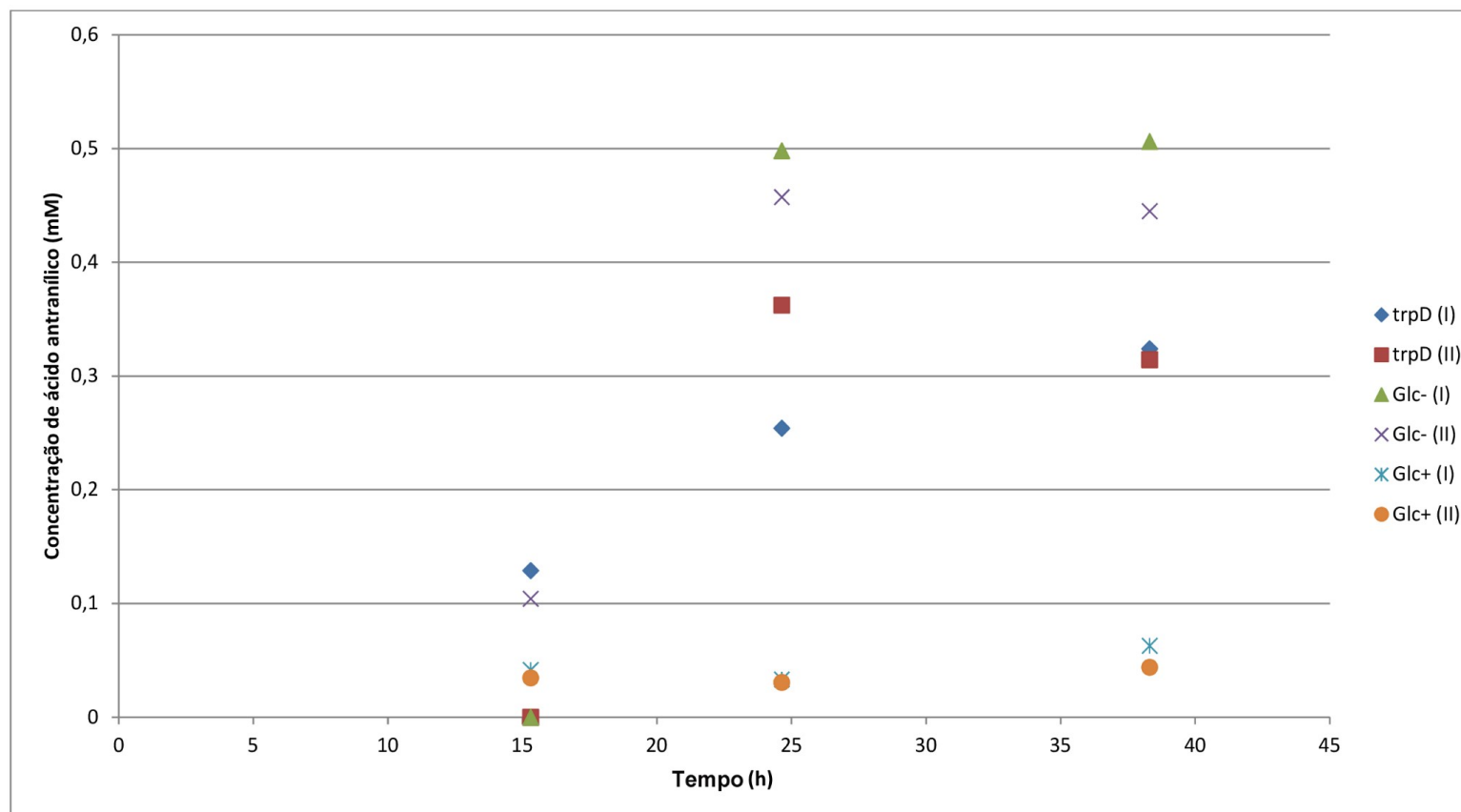


Figura 5

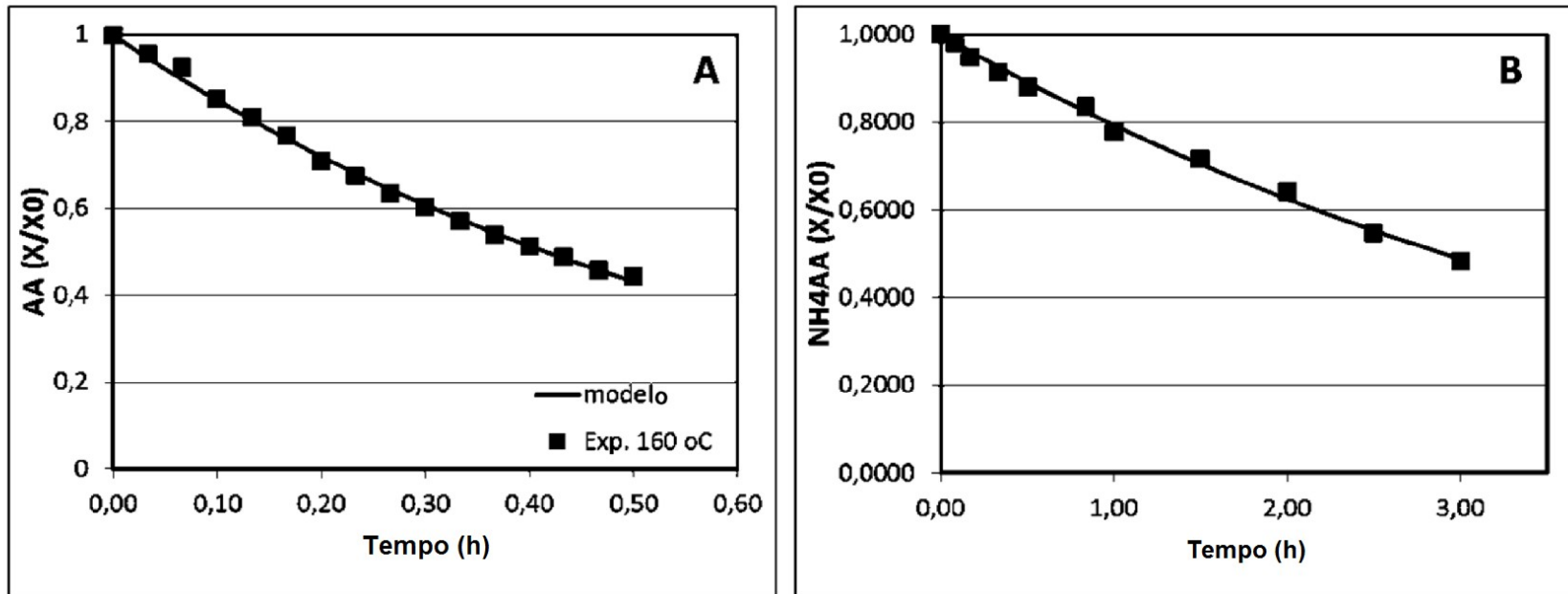


Figura 6

