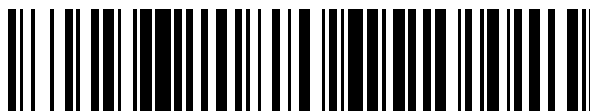


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 560**

51 Int. Cl.:

**C12P 13/00** (2006.01)

**C12P 7/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2015 E 18203096 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3470525**

54 Título: **Producción de anilina a través de antranilato**

30 Prioridad:

**20.02.2014 EP 14155937**

**05.12.2014 EP 14196431**

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

**01.03.2021**

73 Titular/es:

**COVESTRO INTELLECTUAL PROPERTY GMBH & CO. KG (100.0%)**

**Kaiser-Wilhelm-Allee 60**

**51373 Leverkusen, DE**

72 Inventor/es:

**JÄGER, GERNOT;**

**MAGNUS, JORGEN y**

**MOUSSA, AMGAD, SALAH**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 808 560 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

Producción de anilina a través de antranilato

La invención se refiere al campo de la producción de anilina a partir de materia prima de recursos renovables, tal como, por ejemplo, biomasa, a través de un hospedador microbiano adecuado, seguido por la conversión química de un producto intermedio en anilina.

La anilina se produce actualmente en varios millones de toneladas por año a partir de materias primas fósiles, por ejemplo, para producir poliuretanos. Una fuente de la anilina basada en recursos renovables, también llamada "bioanilina", es muy deseable para la industria química para poder independizarse de los recursos fósiles. De manera más importante, hay un fuerte deseo de reducir las emisiones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), tanto para los procedimientos químicos así como mediante el aumento del uso de los recursos renovables en las materias primas. La bioanilina tiene un alto potencial de ahorro de emisiones de CO<sub>2</sub>.

La invención se refiere además al diseño técnico de microorganismos y la producción de compuestos aromáticos a partir de los mismos. En particular, la invención se refiere al campo de la producción de *o*-aminobenzoato (*o*AB) a partir de fuentes renovables tal como, por ejemplo, biomasa, en un hospedador microbiano recombinante adecuado. Normalmente se usa una fuente que contiene una proporción significativa de azúcares fermentables. Estos azúcares pueden incluir polisacáridos tales como disacáridos, por ejemplo, sacarosa, o trisacáridos, por ejemplo, cestosa, así como monosacáridos C-6 tales como glucosa, fructosa o manosa y monosacáridos C-5 tales como xilosa y arabinosa. Una cepa microbiana recombinante capaz de convertir un azúcar a *o*-aminobenzoato (2-aminobenzoato, *orto*-aminobenzoato, *o*-aminobenzoato, *o*AB) permitiría la producción de *o*-aminobenzoato a partir de una amplia gama de recursos renovables, que incluyen la remolacha azucarera y la caña de azúcar, plantas que contienen almidón tales como el maíz, el trigo y el centeno, así como lignocelulosa por ejemplo a partir de paja, madera o bagazo.

Actualmente, no hay una fuente renovable o de origen biológico de *o*-aminobenzoato o el ácido disponible comercialmente correspondiente y no se ha descrito ningún ejemplo conocido de la producción biológica a gran escala de *o*-aminobenzoato. El *o*-aminobenzoato es un intermedio natural de la ruta del ácido shikimato y un precursor para la biosíntesis del aminoácido aromático L-triptófano. La ruta biosintética del *o*-aminobenzoato está relativamente bien entendida tanto en procariotas como en eucariotas. Se puede lograr una conversión química de *o*-aminobenzoato en anilina. Los procedimientos de producción actuales de anilina se basan en la síntesis química a partir de materias primas obtenidas del petróleo. Dichas materias primas obtenidas del petróleo no son renovables en oposición a las materias primas que son renovables, tal como el recurso renovable "biomasa". Varias etapas químicas implicadas en la síntesis química dan lugar a altos costos de producción de los productos químicos. La síntesis química convencional de la anilina puede asociarse con intermedios peligrosos, disolventes y productos de desecho que pueden tener un impacto sustancial sobre el medio ambiente. Las reacciones secundarias no específicas sobre el anillo aromático dan lugar a la reducción del rendimiento del producto. Las materias primas obtenidas del petróleo están afectadas por las fluctuaciones de los costos resultantes del precio mundial del petróleo.

El documento WO 2013/103894 A1 desvela un procedimiento de producción de aminas aromáticas a través de ácido *p*-aminobenzoico (4-aminobenzoato) derivado de forma biológica. Sin embargo, este documento desvela cómo producir el ácido *p*-aminobenzoico, ya sea en *E. coli* o en *S. cerevisiae* y no reconoce las ventajas de *Corynebacterium glutamicum* como un hospedador. Además, este documento tampoco desvela cómo combinar con éxito el procedimiento de fermentación con el procedimiento químico corriente abajo de conversión del ácido *p*-aminobenzoico derivado de forma biológica en aminas aromáticas, por ejemplo, anilina. En cuanto a la tecnología del procedimiento químico corriente abajo de cómo convertir de químicamente o biológicamente el ácido *p*-aminobenzoico producido, este documento solo se refiere a los procedimientos de destilación sin reconocer los beneficios técnicos ventajosos de la combinación de esta parte con la parte corriente arriba de proporcionar el ácido *p*-aminobenzoico en forma de un procedimiento continuo.

Se creía que una fermentación directa de azúcar en anilina como una conversión de una etapa era más rentable si se basaba en una ruta de biosíntesis que incluye una descarboxilación enzimática, *in vivo*, de antranilato en anilina como etapa de reacción final. Dado que a través de ingeniería de proteínas no pudo identificarse o desarrollarse con éxito una aminobenzoato descarboxilasa, la reacción de descarboxilación de antranilato a anilina no se pudo llevar a cabo por medios enzimáticos puros. Dado que un procedimiento de una etapa de este tipo no era técnicamente factible, se tomaron en consideración alternativas de procedimiento para realizar la etapa de reacción final de descarboxilación de antranilato en anilina como la etapa final de la reacción, por ejemplo, por medio de una etapa química, en oposición a una etapa enzimática.

Stevens y col. (1952), Canadian Journal of Chemistry, 30: 529-540 describen la descarboxilación del ácido antranílico. Si bien el intento de descarboxilar el ácido protonado fue satisfactorio, se informó que era imposible descarboxilar su sal de sodio.

Yukawa y col. (2013), documento EP 2 660 313, describen transformantes productores de anilina de bacterias corineformes, en los que se ha introducido un gen que codifica una enzima que tiene actividad de aminobenzoato descarboxilasa.

Por lo tanto, el problema técnico de la invención ha sido proporcionar un procedimiento de producción de anilina basado ya sea en los productos de partida químicos o basado en recursos renovables, que sea superior a los procedimientos químicos y de fermentación existentes y que consiga una gran reducción de las emisiones de dióxido de carbono, una independencia de los recursos fósiles y un costo de producción similar o inferior en comparación con los procedimientos de producción establecidos basados en el petróleo.

La invención ha resuelto adicionalmente dicho problema proporcionando un procedimiento para la producción de anilina, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar o-aminobenzoato, en el que dicho o-aminobenzoato comprende anión antranilato y un catión adecuado,
- b) convertir dicho anión antranilato en anilina mediante descarboxilación térmica,
- c) extraer la anilina producida en la etapa b) en un disolvente orgánico al menos una vez, y
- d) purificar la anilina producida en las etapas b) y c) mediante destilación, en la que dicha destilación produce anilina y una fase acuosa.

El cambio a la producción de anilina basada en recursos renovables, por ejemplo, biomasa o fuentes de carbono fermentables, ofrece las ventajas de reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> de forma significativa, permite la independencia de los recursos fósiles y permite una posible reducción del costo de producción. Una ventaja adicional de la invención es que el uso de productos químicos peligrosos y los residuos resultantes se mantienen a un mínimo. Además, el o-aminobenzoato derivado de forma biológica se puede producir y convertir en anilina en un procedimiento con mucho menos impacto global sobre el medio ambiente.

En lo siguiente, se definen algunos términos usados para describir la invención.

El término "bioanilina" de acuerdo con la invención se refiere a anilina que se basa en materia prima a partir de recursos renovables, tales como la remolacha azucarera, la caña de azúcar, las plantas que contienen almidón, preferentemente el maíz, el trigo y el centeno, y la lignocelulosa, preferentemente la paja, la madera y el bagazo, el glicerol y compuestos de C1, preferentemente CO, o tales como azúcares fermentables, preferentemente monosacáridos C-5, monosacáridos C-6, disacáridos y trisacáridos, en los que los monosacáridos C-5 preferentemente son xilosa y arabinosa, y en los que los monosacáridos C-6 preferentemente son glucosa, fructosa o manosa, y en el que el disacárido es preferentemente sacarosa, y en el que el trisacárido es preferentemente cestosa.

"o-aminobenzoato" de acuerdo con la invención se refiere a *orto*-aminobenzoato (o-aminobenzoato, "oAB", "2-AB"). El o-aminobenzoato puede estar presente en forma de la sal de antranilato que comprende el anión antranilato, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COO<sup>-</sup> y un catión adecuado, tal como NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o Na<sup>+</sup>, o como ácido antranílico, que es el zwitterión C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COO<sup>-</sup> NH<sub>3</sub><sup>+</sup> y C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COO<sup>-</sup> NH<sub>2</sub>. El "o-aminobenzoato" ("oAB", "2-AB") es diferente de "4-aminobenzoato" ("*para*-AB", "*p*-AB") en que el grupo amino está unido al anillo de benceno en la posición C<sub>4</sub> (*para*) en oposición a la posición C<sub>2</sub> (*orto*) en el caso del o-aminobenzoato ("oAB"). El "o-aminobenzoato" de acuerdo con la invención se puede proporcionar ya sea por procedimientos químicos convencionales o como un producto químico que se obtiene comercialmente, o se puede proporcionar de forma biológica mediante un hospedador microbiano recombinante que es capaz de producir o-aminobenzoato mediante fermentación. Un ejemplo de producto químico o-aminobenzoato obtenido comercialmente es el oAB tal como se adquiere en Sigma Aldrich, N.º de catálogo. A89855.

El término "hospedador" dentro del significado de la presente invención puede comprender cualquier hospedador que es capaz de producir o-aminobenzoato mediante fermentación, ya sea de forma natural, o solo después de la transformación como un "hospedador microbiano recombinante", o en adición al o-aminobenzoato presente de forma natural, ya sea en la forma del anión antranilato o como un ácido antranílico, después de la transformación. Un "hospedador microbiano" de acuerdo con la invención se puede seleccionar del grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos. Dicho hospedador se puede seleccionar del grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos, en las que dichas bacterias son preferentemente una cepa de *Escherichia coli*, una cepa de *Corynebacterium* o una cepa de *Pseudomonas*, en la que dicha cepa *Corynebacterium* es preferentemente *Corynebacterium glutamicum* y en la que dicha cepa de *Pseudomonas* es preferentemente *Pseudomonas putida*. Preferentemente, dicho hospedador microbiano puede ser un hospedador microbiano recombinante. Dicho hospedador microbiano recombinante puede ser *E. coli* W3110 *trpD9923*, como se muestra en el **Ejemplo 1**, o puede ser *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 o también puede ser *Pseudomonas putida* KT2440.

La expresión "modificación genética" dentro del significado de la presente invención se refiere a cambios en la secuencia de ácido nucleico de un gen dado de un hospedador microbiano, en comparación con la secuencia de tipo silvestre. Tal modificación genética puede comprender deleciones, así como inserciones de uno o más ácidos desoxirribonucleicos. Tal modificación genética puede comprender deleciones parciales o completas así como inserciones introducidas mediante transformaciones en el genoma de un hospedador microbiano. Tal modificación genética puede producir un hospedador microbiano recombinante, en el que dicha modificación genética puede comprender cambios de al menos uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos individuales en comparación con la secuencia de tipo silvestre del respectivo hospedador microbiano. Por ejemplo, una modificación genética puede ser una deleción o inserción de al menos uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos individuales o una transformación de al menos uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos individuales. Una modificación genética de acuerdo con la invención

puede tener el efecto de, por ejemplo, una expresión reducida del gen respectivo o de, por ejemplo, una expresión potenciada del gen respectivo. En un ejemplo de tal modificación genética de acuerdo con la invención, un hospedador microbiano recombinante, por ejemplo, *Escherichia coli*, puede comprender una modificación genética del gen *trpD* que codifica la enzima antranilato fosforribosil transferasa, en la que dicha modificación genética puede tener el efecto de una expresión reducida del gen *trpD* modificado. Dicho hospedador microbiano recombinante que comprende puede ser *E. coli* W3110 *trpD9923*, como se muestra en el **Ejemplo 1**.

La expresión "fermentación discontinua" dentro del significado de la presente invención se refiere a una reacción de fermentación única que tiene un punto de partida definido y un punto final definido. La fermentación discontinua se puede usar en la etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención en los casos en que las velocidades de producción de los microorganismos no pueden mantenerse a una alta velocidad en el modo de fermentación continua.

La expresión "fermentación alimentada" dentro del significado de la presente invención se define como una técnica operativa en procedimientos biotecnológicos en que se alimentan (se suministran) uno o más nutrientes (sustratos) al biorreactor durante el cultivo y en que el producto (o productos) permanecen en el biorreactor hasta el final de la ejecución. La "fermentación alimentada" se puede usar en la etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención en los casos en los que las velocidades de producción de los microorganismos no pueden mantenerse a una alta velocidad en el modo de fermentación continua.

La expresión "fermentación continua" dentro del significado de la presente invención se refiere a un procedimiento de fermentación en que se añade el sustrato y el producto (es decir, *o*-aminobenzoato, *o*AB) se retira de forma continua durante la fermentación en la etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención.

En lo que sigue, la invención se describe en más detalle.

La invención proporciona un procedimiento para la producción de anilina, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar *o*-aminobenzoato, en el que dicho *o*-aminobenzoato comprende anión antranilato y un catión adecuado,
- b) convertir dicho anión antranilato en anilina mediante térmica,
- c) extraer la anilina producida en la etapa b) en un disolvente orgánico al menos una vez, y
- d) purificar la anilina producida en las etapas b) y c) mediante destilación, en la que dicha destilación produce anilina y una fase acuosa.

En una realización preferida del método de acuerdo con la invención, el *o*-aminobenzoato de la etapa a) de proporción de *o*-aminobenzoato se proporciona de forma química o se produce de forma biológica, preferentemente se produce de forma biológica mediante la fermentación de una materia prima que comprende al menos un sustrato de carbono fermentable utilizando una célula hospedadora microbiana recombinante capaz de convertir dicha materia prima que comprende un sustrato de carbono fermentable en *o*-aminobenzoato mediante fermentación, en el que dicho *o*-aminobenzoato comprende anión antranilato y un catión adecuado. Dicho catión adecuado de la etapa a) puede ser  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{Na}^+$ , como están comprendidos, por ejemplo, en una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  y en una de solución de  $\text{NaCl}$ .

En una realización adicional del método de acuerdo con la invención, la fermentación de la etapa a) de producción de *o*-aminobenzoato puede ser una fermentación discontinua, una fermentación alimentada o una fermentación continua. Dicha fermentación se puede realizar en un reactor de fermentación, en que se cultiva una célula hospedadora microbiana recombinante capaz de convertir la materia prima que comprende un sustrato de carbono fermentable a *o*-aminobenzoato mediante fermentación. Dicho cultivo se puede llevar a cabo en presencia de una fuente de carbono adecuada, por ejemplo, jarabe de maíz, jugo de caña de azúcar, melaza y similares. Dicho cultivo también se puede llevar a cabo en presencia de una fuente de nitrógeno adecuada, por ejemplo, gas amoníaco, solución de hidróxido de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio, licor de maíz fermentado y similares, en presencia de los micronutrientes necesarios para la supervivencia de la célula hospedadora microbiana recombinante. El pH en una fermentación tal se puede mantener a un valor entre 6,5 y 7,5 con la adición de una base, por ejemplo, gas amoníaco, hidróxido de amonio, hidróxido de sodio y similares.

La producción del *o*-aminobenzoato de forma biológica en la etapa a) del procedimiento de la invención se puede realizar mediante fermentación continua, preferentemente en un fermentador que funcione de forma continua. En una fermentación continua tal de acuerdo con la invención, el caldo de fermentación se extrae de forma continua del fermentador y se procesa a través de un dispositivo para separar la biomasa, por ejemplo mediante filtración, una centrifuga, membranas y similares.

Se puede añadir suficiente oxígeno al reactor de fermentación usado en la etapa a), ya sea puro, como el aire, o como aire enriquecido. El caldo de fermentación sin células es esencialmente una solución de sal de *o*-aminobenzoato (*o*AB) con el anión antranilato y un contracatión. La solución de *o*AB puede tener una concentración de entre 5 g/litro y 500 g/litro, preferentemente entre 20 g/litro y 200 g/litro, y muy preferentemente entre 50 g/litro y 150 g/litro de sal de *o*AB.

En una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la etapa a) hasta la etapa d) se pueden ejecutar de forma continua.

El catión de la etapa a) de producción de *o*-aminobenzoato puede ser  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{Na}^+$ .

En una realización particularmente preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el hospedador microbiano recombinante de la etapa a) de producción de *o*-aminobenzoato se puede eliminar antes de la conversión posterior de dicho anión antranilato en anilina mediante descarboxilación térmica en la etapa b). Dicho hospedador microbiano recombinante eliminado se puede realimentar preferentemente a la fermentación de la etapa a) de producción *o*-aminobenzoato. Eso significa que la biomasa que comprende el hospedador microbiano recombinante puede reciclarse al fermentador y la fermentación de la etapa a) después de purgar una pequeña porción de la biomasa que comprende el hospedador microbiano recombinante. Dicha corriente de purga desde la biomasa puede ser útil para evitar la acumulación de biomasa. Por lo tanto, se puede retirar una parte de las células hospedadoras microbianas que se multiplican en el fermentador y las células muertas, para mantener la concentración de las células hospedadoras vivas en el reactor de fermentación de la etapa a) dentro de límites definidos, muy preferentemente constante. Esto puede ser diferente en el caso de la fermentación alimentada, en que las células hospedadoras recombinantes y el producto (o productos) de fermentación permanece en el biorreactor hasta el final de la ejecución, lo que por lo tanto no es una fermentación continua sino una fermentación alimentada.

Cuando se realiza la conversión de dicho anión antranilato en anilina mediante descarboxilación térmica en presencia o ausencia de un catalizador en la etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención, el catalizador, si se usa, puede ser un catalizador ácido heterogéneo, preferentemente una zeolita, muy preferentemente zeolita H-Y, zeolita H-Y (GO257), por ejemplo, como se obtiene de Zeolyst Internacional, N.º de catálogo. CBV600. El catalizador ácido zeolita H-Y (GO257, SiO<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 5,5) tiene un carácter ácido particularmente alto y tiene un tamaño de poro más amplio (0,7 a 0,8 nm) que, por ejemplo, ZSM5-27, que también posee carácter ácido, pero que tiene menor tamaño de poro (0,5 nm), de manera tal que las moléculas de AA no pueden penetrar y, en consecuencia, no tienen acceso a los sitios activos del catalizador ácido.

En una realización adicional, cuando se realiza la conversión de dicho anión antranilato en anilina mediante descarboxilación térmica en presencia o ausencia de un catalizador en la etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención, el catalizador, si se usa, puede también ser un catalizador básico heterogéneo, preferentemente un hidróxido laminar doble, muy preferentemente hidrotalquita Mg-Al, que tiene un carácter básico (HTC, Mg<sub>6</sub>Al<sub>2</sub>(CO<sub>3</sub>)(OH)<sub>16</sub>·4H<sub>2</sub>O).

Cuando se realiza la descarboxilación térmica de la etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención, la solución de *o*-aminobenzoato de la etapa a) que comprende anión antranilato y un catión adecuado se puede alimentar a un reactor químico que puede funcionar a una temperatura de entre 150 °C y 250 °C, preferentemente entre 160 °C y 220 °C, muy preferentemente entre 180 °C y 200 °C.

El tiempo de reacción para realizar la descarboxilación térmica de la etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención debe ser suficiente para una reacción a anilina con un alto rendimiento. De forma más específica, el requisito de tiempo para realizar la descarboxilación térmica de la etapa a) puede estar en el orden de 0,5 horas a 3 horas.

La presión en el reactor, en el que la etapa b) de descarboxilación térmica se puede realizar, se puede seleccionar en función de la cantidad de agua y anilina que se deja evaporar durante la reacción y para dejar el reactor con el CO<sub>2</sub> producido durante la reacción térmica de descarboxilación. El producto de la etapa b) de descarboxilación térmica, es decir, el efluente del reactor, esencialmente puede ser una mezcla homogénea de anilina y agua.

Este efluente del reactor de la etapa b) se puede alimentar directamente a una secuencia de destilación heteroazeotrópica, en que el agua y la anilina se recuperan como productos de fondo. Esta opción se puede realizar si después de la descarboxilación térmica de la etapa b) tiene un alto contenido de anilina, por lo general si está por encima de 120 g/litro. Sin embargo, para una baja concentración de anilina después de la etapa b) de descarboxilación térmica, por ejemplo, 120 g/litro y menos, la separación directa de anilina luego de la etapa b) es prácticamente inviable solo mediante destilación, ya que el consumo de energía se convierte en prohibitivamente grande.

Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende la etapa adicional c) de extracción de anilina producida en la descarboxilación térmica de la etapa b) en un disolvente orgánico al menos una vez, antes de proceder con la etapa d) de purificación de la anilina mediante destilación. De esta manera, la etapa c) de extracción se usa como una etapa de preconcentración antes de la destilación en la etapa d). La mezcla de agua con anilina que es el producto de la descarboxilación térmica de la etapa b) se puede alimentar a un dispositivo de extracción, por ejemplo, un sedimentador mezclador, una columna de pulsos y similares, donde se puede poner en contacto con un disolvente orgánico no polar con una alta afinidad por la anilina, preferentemente uno con un punto de ebullición más alto que el de la anilina, por ejemplo 1-dodecanol. El disolvente orgánico que se usa en el procedimiento de acuerdo con la invención se puede seleccionar del grupo que consiste en alcoholes, fenoles, amidas, éteres e hidrocarburos aromáticos. En una realización preferida de la invención, el alcohol usado como disolvente orgánico es preferentemente 1-dodecanol.

En una realización adicional del procedimiento de acuerdo con la invención, la extracción de anilina en un disolvente orgánico en la etapa c) se puede realizar durante más de una vez para una preconcentración adicional de anilina antes de la destilación, para obtener un rendimiento aún mayor de anilina producida.

El disolvente orgánico usado en la extracción de la etapa c), preferentemente se puede recuperar. Dicha recuperación

- de disolvente orgánico se puede hacer preferentemente mediante destilación. El disolvente orgánico recuperado preferentemente se puede volver a alimentar a la etapa c) del procedimiento para reutilizarlo otra vez para extraer la anilina producida en la etapa b). Esto significa que la mezcla de disolvente orgánico-anilina se puede destilar, en la que la anilina y cualquier molécula de agua arrastradas o disueltas en él y el disolvente no polar se pueden recuperar como un producto de cabecera. La corriente de cabecera que contiene anilina en una gama de concentraciones se alimenta después a la destilación de la etapa d), que puede ser una destilación heteroazeotrópica.
- 5
- Aún en otra realización del procedimiento de acuerdo con la invención, el procedimiento comprende una etapa adicional e) de realimentación de la fase acuosa de la extracción realizada en la etapa c) a la fermentación de la etapa a).
- 10 El procedimiento también puede comprender la etapa adicional de realimentación de la fase acuosa de la destilación realizada en la etapa d) a la fermentación de la etapa a).
- El catión  $\text{NH}_4^+$  que puede usarse como catión adecuado en la etapa de producción a) del procedimiento de acuerdo con la invención se puede recuperar como  $\text{NH}_3$  después de la destilación de la etapa d) y realimentarse a la fermentación de la etapa a).
- 15 Cuando la etapa de producción a) del procedimiento de acuerdo con la invención comprende fermentación, la materia prima que se usará en la fermentación de la etapa a) se puede seleccionar del grupo que consiste en remolacha azucarera, caña de azúcar, plantas que contienen almidón, preferentemente maíz, trigo y centeno, y lignocelulosa, preferentemente paja, madera y bagazo, glicerol y compuestos C1, preferentemente CO.
- 20 Cuando la etapa de producción a) del procedimiento de acuerdo con la invención comprende fermentación, el al menos un sustrato de carbono fermentable comprendido en la materia prima que se usará en la fermentación de la etapa a) se puede seleccionar del grupo que consiste en monosacáridos C-5, monosacáridos C-6, disacáridos y trisacáridos, en los que los monosacáridos C-5 preferentemente son xilosa y arabinosa, y en los que los monosacáridos C-6 preferentemente son glucosa, fructosa o manosa, y en el que el disacárido es preferentemente sacarosa, y en el que el trisacárido preferentemente puede ser cestosa.
- 25 El hospedador microbiano recombinante que se puede usar en la etapa de fermentación a) de producción de  $\alpha$ -aminobenzoato se puede seleccionar del grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos, en las que dichas bacterias preferentemente pueden ser una cepa de *Escherichia coli*, una cepa de *Corynebacterium* o una cepa de *Pseudomonas*, en la que dicha cepa de *Corynebacterium* preferentemente puede ser *Corynebacterium glutamicum* y en la que dicha cepa de *Pseudomonas* preferentemente puede ser *Pseudomonas putida*.
- 30 En una realización preferida de la invención, el hospedador microbiano recombinante que se puede usar en la fermentación de la etapa a) puede ser *Escherichia coli*, preferentemente *E. coli* W3110, aún más preferentemente *E. coli* W3110 *trpD9923* (adquirida del Centro de Recursos Genéticos de *E. coli* en la Universidad de Yale).
- En una realización preferida de la invención, el hospedador microbiano recombinante que se puede usar en la fermentación de la etapa a) puede ser *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, o un hospedador microbiano recombinante adicional que esté basado en esta cepa.
- 35 En una realización preferida de la invención, el hospedador microbiano recombinante que se puede usar en la fermentación de la etapa a) puede ser *Pseudomonas putida* KT2440, o un hospedador microbiano recombinante adicional que esté basado en esta cepa.
- 40 La invención proporciona además el uso de la anilina producida de acuerdo con el procedimiento de la invención como se describe en el presente documento y como se define en las reivindicaciones para la producción de metilendianilina (MDA), en la que la anilina producida se convierte adicionalmente en metilendianilina (MDA) con formaldehído en presencia de agua y un catalizador. La MDA producida se puede convertir adicionalmente en metilendiisocianato (MDI) con fosgeno.

### Figuras y Tablas

- 45 La **Figura 1** muestra el concepto global del procedimiento de acuerdo con la invención que comprende la conversión de materias primas en antranilato en la etapa de fermentación, seguido por una conversión química y purificación a anilina en el procesamiento corriente abajo.
- La **Figura 2** muestra una descripción más detallada del procedimiento de acuerdo con la invención. El catión adecuado de la etapa a) puede ser  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{Na}^+$ , por lo que se puede usar  $\text{NH}_3$  o  $\text{NaOH}$  como tampón en el fermentador.
- 50 La **Figura 3** muestra la integración de un módulo de filtración de fibra hueca con un corte de valor de 750 kDa para la retención de células durante la fermentación continua.
- La **Figura 4** muestra la producción de ácido antranílico en las cepas de la cepa de *E. coli* W3110 *trpD9923*  $\Delta\text{pts Glc}^+$  (con 0,51 mM, mejores resultados), seguido por *E. coli* W3110 *trpD9923* (con casi 0,2 mM menos de  $\text{Glc}^+$

después de 38 h) y la velocidad de producción más baja fue con *E. coli* W3110 *trp*Δ9923 Δpts Glc- (con 5x menos concentración de ácido antranílico producido después de 38 h).

La **Figura 5** muestra la cinética de descarboxilación de A) AA al 0,5 % en peso y de B) NH<sub>4</sub>AA al 3 % en peso en una solución tampón acuosa a 160 °C.

- 5 La **Figura 6** muestra la cinética de descarboxilación de NH<sub>4</sub>AA con diferentes catalizadores, es decir, Zeolita H-Y, Zeolita H-ZSM5 y zirconia sulfatada, como se describe en el **Ejemplo 3**.

La **Tabla 1** muestra los órdenes de reacción y los coeficientes cinéticos de la descarboxilación de ácido antranílico (AA) y NH<sub>4</sub>AA en soluciones tampón a 160 °C y 180 °C mostrados en el **Ejemplo 2**.

- 10 La **Tabla 2** muestra una comparación de las capacidades de absorción de zeolita Y intercambiada con metales con ZSM-5 y de hidroxiapatita, como se muestra en el **Ejemplo 4**.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Experimentos para producir ácido antranílico con *E. coli*

- 15 La cepa de *E. coli* W3110 *trp*D9923 se adquirió en el Centro de Recursos Genéticos de *E. coli* en la Universidad de Yale. La cepa se había creado por mutagénesis aleatoria y contenía un gen de *trpD* mutado llamado *trpD9923*. La enzima truncada relacionada del gen *trpD9923* había perdido su capacidad para catalizar la reacción de la antranilato fosforribosil transferasa, pero había mantenido su actividad de antranilato sintasa. Por lo tanto, la cepa puede sintetizar antranilato, pero no puede metabolizarlo adicionalmente a triptófano y, por lo tanto, es un auxótrofa para triptófano. Esto conduce a un exceso de antranilato.

- 20 Esta cepa se cultivó en matraces de agitación de 50 ml con un volumen de cultivo de 10 ml a 28 °C y 140 rpm. El medio usado fue el medio mineral M9 con triptófano definido como sigue: 10 g/l de glucosa, 6 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g/l de NaCl, 3 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l de NH<sub>4</sub>Cl, 246,5 mg/l de MgSO<sub>4</sub>, 14,7 mg/l de CaCl<sub>2</sub>, 10 mg/l de tiamina (vitamina B1), 20 mg/l de triptófano. La cepa produjo 60 mg/l de ácido antranílico después de 25,5 h, medido mediante HPLC. Las cepas comparadas fueron *E. coli* W3110 *trp*Δ9923; *E. coli* W3110 *trp*Δ9923 Δpts Glc+ y *E. coli* W3110 *trp*Δ9923 Δpts Glc-.

- 25 La auxotrofia de triptófano se confirmó en la cepa *trpD9923*. La fermentación de la cepa con un medio mineral M9 que contiene triptófano produjo 60 mg/l de ácido antranílico.

- 30 La cepa se optimizó adicionalmente mediante la inactivación del sistema de fosfotransferasa, utilizando delección por supresión. La cepa deficiente en pts se adaptó para el crecimiento en glucosa y se analizó en cuanto a la producción de antranilato utilizando una fermentación en un matraz de agitación de 25 ml a 37 °C y 150 rpm con un volumen de cultivo de 10 ml. Se usó el mismo medio que para la cepa positiva para pts. Produjo 69 mg/l después de 25 horas, medido mediante HPLC. La producción de ácido antranílico por las tres cepas de *E. coli* W3110 *trp*Δ9923; *E. coli* W3110 *trp*Δ9923 Δpts Glc+ y *E. coli* W3110 *trp*Δ9923 Apts Glc- vio una mejora significativa después de una incubación previa en medio LB. La mejor cepa de producción de ácido antranílico fue *E. coli* W3110 *trp*Δ9923 Δpts Glc+ (con 0,51 mM), seguida por *E. coli* W3110 *trp*Δ9923 (con casi 0,2 mM menos que Glc+ después de 38 h) y la peor fue *E. coli* W3110 *trp*Δ9923 Δpts Glc- (con 5x menos concentración de ácido antranílico producido después de 38 h), de acuerdo con lo que se puede observar en la **Figura 4**.

### Ejemplo 2 - Cinética de descarboxilación de A) AA al 0,5 % en peso y de B) NH<sub>4</sub>AA sin catalizador

- 40 En este experimento, se estudió la cinética de la descarboxilación térmica de la etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención. Si se añadía una solución de NH<sub>4</sub>OH a la solución tampón de ácido antranílico (AA), el AA se transformaba gradualmente en antranilato de amonio, que tenía una solubilidad mucho mayor (hasta el 10 %) que el AA en sí mismo. En este caso, fue posible descarboxilar el ion antranilato en la anilina (ANL). El AA, u o-aminobenzoato, se proporcionó respectivamente ya sea de forma biológica mediante un hospedador microbiano recombinante como se describe en el **Ejemplo 1**, o se proporcionó de forma química, por ejemplo, se obtuvo comercialmente, por ejemplo, de Sigma Aldrich, N.º de catálogo. A89855.

- 45 Se preparó una solución tampón que contenía (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 g/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 g/l) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g/l) en agua destilada. Después, se suspendió AA al 10 % en peso en esta solución. Se añadió una solución de NH<sub>4</sub>OH (28 a 30 % de NH<sub>3</sub>) gota a gota a esta suspensión hasta que se formó una solución de color amarillo claro. El pH de esta solución de antranilato de amonio (NH<sub>4</sub>AA) fue de alrededor de 7. La solución de antranilato de amonio (3 % en peso) también se preparó utilizando este procedimiento.

- 50 Se transfirieron 80 ml de cada una de las soluciones anteriores a una autoclave de 160 ml y se calentó a 160 °C o 180 °C, y se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo para analizar la velocidad de formación de anilina (ANL). La descarboxilación de AA al 0,5 % en peso y de NH<sub>4</sub>AA al 3 % en peso en una solución tampón acuosa se realizó a 160 °C sin usar ningún catalizador. Los estudios que usaban un modelo dieron lugar a una cinética de pseudo primer orden para ambas reacciones. Los perfiles de estas reacciones se muestran en la **Figura 5**. El modelo de

cinética se estableció utilizando la fórmula de cinética de reacción general a continuación y teniendo en cuenta los datos experimentales para calcular los parámetros optimizados  $k$  y  $n$ , que son el coeficiente cinético y el orden de reacción, respectivamente.

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

5

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

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

10

Como se presenta en la **Tabla 1** a continuación, los órdenes ( $n$ ) de estas reacciones están cerca de 1. El coeficiente cinético ( $k$ ) de la descarboxilación de AA al 0,5 % en peso en agua es 6,8 veces más grande que el de NH<sub>4</sub>AA al 3 % en peso.

Además, se estudió la cinética de descarboxilación de NH<sub>4</sub>AA al 10 % en peso a 160 °C y 180 °C utilizando los datos experimentales y un modelo de simulación.

**Tabla 1. Órdenes de reacción y coeficientes cinéticos de descarboxilación de AA y NH<sub>4</sub>AA en soluciones tampón a 160 °C y 180 °C.**

Reactante	Temperatura de reacción (°C)	$n$	$k$ (h <sup>-1</sup> )
AA al 0,5 % en solución tampón	160	0,9207	0,0519
NH <sub>4</sub> AA al 3 % en solución tampón	160	0,8706	0,00755
NH <sub>4</sub> AA al 10 % en solución tampón	160	1,2758	0,000713
NH <sub>4</sub> AA al 10 % en solución tampón	180	0,9793	0,026

15

Como se observa (**Tabla 1** y **Figura 5**), ambas reacciones siguieron una cinética de pseudo primer orden. Además, el coeficiente cinético de la reacción a 180 °C es 36 veces mayor que a 160 °C. Este número es muy competitivo con el de la descarboxilación de AA al 0,5 % en peso en agua. Lo más importante, hay una gran ventaja de una concentración 20 veces mayor en el caso de NH<sub>4</sub>AA. El **Ejemplo 2** muestra que las sales de oAB se pueden descarboxilar en soluciones acuosas con una reacción que sigue una cinética de primer orden. Por lo tanto, la conversión virtualmente completa de ion antranilato en anilina se puede lograr, por ejemplo, en un reactor de flujo pistón o en una cascada de tanques mixtos.

20

### Ejemplo 3 - Cinética de descarboxilación de NH<sub>4</sub>AA con un catalizador

En este ejemplo se sigue el mismo procedimiento que el Ejemplo 2, excepto en que, a los 80 ml de solución, se añadieron 1,6 g (2 %) de catalizador ácido. Los catalizadores empleados fueron Zeolita H-Y (Zeolyst Internacional, N.º de catálogo. CBV600), Zeolita H-ZSM5 (Süd-Chemie/Clariant N.º de catálogo H-IMF-27) y Zirconia Sulfatada (Mel Chemicals N.º de catálogo MELCat XZO 1720). En la **Figura 6** se comparan los resultados con el experimento sin catalizador (blanco) como se describe en el Ejemplo 2. Los tres experimentos blanco, el de zirconia sulfatada y el de ZSM-5 alcanzaron una conversión comparable de AA del 90-92 %. Solo el catalizador ZSM-5 mostró una mayor conversión de AA en anilina, es decir, hasta el 99 %.

30

### Ejemplo 4 - Absorción/desorción del ácido antranílico en absorbentes minerales

Como se puede observar en el Ejemplo 3 y la **Figura 6**, el catalizador de zeolita-Y, incluso con la más alta actividad catalítica y la conversión, casi sin ácido antranílico restante, no proporcionaba el mayor rendimiento de anilina como producto. El análisis del sólido reveló que la parte faltante del producto de anilina se absorbía fuertemente en el propio catalizador.

35

Se analizó la capacidad de adsorción del AA en diferentes tipos de adsorbentes. Se seleccionaron como las zeolitas la zeolita Y (Zeolyst Internacional, N.º de catálogo. CBV600) y ZSM5 (Sued-Chemie/Clariant N.º de catálogo H-IMF-27), las cuales funcionan como tamices moleculares para diferentes moléculas. Se analizó la hidroxiapatita (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich N.º de catálogo 289396) debido a su capacidad de adsorción del AA y algunos otros compuestos similares en diferentes disolventes.

40

Prueba de adsorción: Los adsorbentes ya se habían calcinado a 300 °C durante 3 h para liberar cualquier resto de humedad. Se preparó una solución de AA (0,5 % en peso) en agua. 20 ml de esta solución se transfirieron a un matraz



de 50 ml que contenía 0,2 g de adsorbente. Después de un cierto período de tiempo en agitación, se analizó mediante HPLC la concentración del AA en el agua. La disminución de la concentración de AA en agua se consideró como el AA adsorbido. Síntesis de zeolita intercambiada con metales: dada la capacidad de adsorción mejorada de la zeolita con Ca incorporado, se prepararon zeolitas intercambiadas con Ca por intercambio iónico para analizarlas en la adsorción del AA. Se añadieron 3 g de zeolita H-Y como polvo a una solución de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,5 M). La suspensión se agitó durante 4 h y después la solución se reemplazó por una nueva, y este procedimiento se repitió dos veces más. Finalmente, los sólidos se separaron mediante centrifugación y se secaron a 80 °C, y se calcinaron a 300 °C durante 3 h. Se prepararon otras cuatro muestras de zeolita Y intercambiada con metales utilizando K, Na, Mg y Fe con el mismo procedimiento como se describe anteriormente. Las muestras se etiquetaron como K-Y, Na-Y, Ca-Y, Mg-Y y Fe-Y.

Los resultados del estudio de absorción se resumen en la Tabla 2 a continuación:

**Tabla 2: Comparación de las capacidades de absorción de zeolita Y intercambiada con metales con ZSM-5 e hidroxiapatita**

Absorbente	HAP	H-ZSM5	H-Y	Na-Y	K-Y	Mg-Y	Ca-Y	Fe-Y
Capacidad de absorción (g AA/kg absorbente)	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

La capacidad de absorción de la zeolita Y es superior en comparación con ZSM-5 y la hidroxiapatita. Esto era probablemente debido al tamaño de poro mayor y la estructura de los poros distinta. Esto también se podría aumentar adicionalmente mediante intercambio con cationes. La tendencia con la carga y el tamaño del catión era evidente, por lo que el procedimiento de absorción era fuertemente dependiente superficial del adsorbedor.

Al poner en contacto el adsorbente cargado con 80 ml de agua con NaOH al 10 %, fue posible para extraer de nuevo en la solución el AA absorbido, con un rendimiento de hasta el 80 %. Al ponerlo en contacto con 80 ml de solución tampón a pH 7, es decir, la misma usada para el procedimiento de absorción, casi no se observó desorción (<10 %). Este ejemplo demuestra que el procedimiento de absorción es un sistema termodinámicamente equilibrado que es dependiente de la carga superficial.

**Ejemplo 5: selección del disolvente para la extracción y el coeficiente de distribución de la anilina entre la fase acuosa y la fase de disolvente (orgánica)**

Se llevó a cabo una exploración de disolventes sobre la base de los cálculos de COSMO. Se empleó el procedimiento COSMO, que tiene las siguientes dos etapas:

- determinación de las cargas superficiales sobre las moléculas rodeadas por un buen medio conductor con cálculos de química cuántica,
- obtener el potencial químico del soluto en diversos disolventes a partir de la distribución de cargas.

Además, se debieron tener en cuenta las siguientes restricciones adicionales: baja solubilidad en agua, viscosidades moderadas, densidad y tensión interfacial que permiten una separación de fases cómoda, alto punto de ebullición con respecto a la anilina. Como resultado, se han encontrado alcoholes de cadena larga y aminas de cadena larga, y mezclas de ambos ( $7 < \text{número de C} < 17$ ).

Los cálculos de Unifac para dos alcoholes se muestran a continuación en la **Tabla 3**.

**Tabla 3**

componente	conc. de disolvente en la fase acuosa [% en peso]	conc. de agua en la fase orgánica [% en peso]
1-decanol	0,018	1,46
1-dodecanol	0,0026	0,19

El uso de una mezcla de isómeros de dodecanol puede ofrecer la ventaja de una baja solubilidad mutua y un punto de fusión inferior.

**Ejemplo 6: Cálculos de diseño para la extracción de anilina del agua**

La composición de la corriente de alimentación en este ejemplo fue de 93 % de agua, 7 % de anilina. La columna usada fue una columna de pulsos. El empaquetamiento se realizó mediante empaquetamiento estructurado metálico

## ES 2 808 560 T3

(debido al alto rendimiento) con una superficie específica de 500 (ejemplos de empaquetamiento: Mellapack 500Y o Montz B1-500). El material fue acero inoxidable.

Las dimensiones fueron las siguientes: para una capacidad de 60 t/h de alimentación acuosa (el caudal del dodecanol se calculó utilizando  $F/S = 2$  p/p):

- 5 • Diámetro activo interno de la columna = 1.200 a 1.300 mm
- Longitud del empaquetamiento activo = 11 a 12 m
- Longitud total de la columna = 14 a 15 m

Para una capacidad de 200 t/h (el caudal del dodecanol se calculó utilizando  $F/S = 2$  p/p):

- 10 • Diámetro activo interno de la columna = 2.300-2.500 mm
- Longitud del empaquetamiento = 15 a 16 m
- Longitud total de la columna = 18 a 19 m

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de anilina, que comprende las etapas de:
  - a) proporcionar o-aminobenzoato, en el que dicho o-aminobenzoato comprende anión antranilato y un catión adecuado,
  - 5 b) convertir dicho anión antranilato en anilina mediante descarboxilación térmica,
  - c) extraer la anilina producida en la etapa b) en un disolvente orgánico al menos una vez, y
  - d) purificar la anilina producida en las etapas b) y c) mediante destilación, en la que dicha destilación produce anilina y una fase acuosa.
2. El procedimiento de reivindicación 1, en el que dicho o-aminobenzoato de la etapa a) se proporciona de forma química o se produce mediante fermentación de una materia prima que comprende al menos un sustrato de carbono fermentable utilizando una célula hospedadora microbiana recombinante capaz de convertir dicha materia prima que comprende un sustrato de carbono fermentable en o-aminobenzoato mediante fermentación, en el que dicho o-aminobenzoato comprende anión antranilato y un catión adecuado.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha fermentación de la etapa a) es una fermentación discontinua, una fermentación alimentada o una fermentación continua.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la etapa a) a la etapa d) se ejecutan de forma continua.
5. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en el que el catión adecuado de la etapa a) es  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{Na}^+$ .
6. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 5, en el que dicho hospedador microbiano recombinante de la etapa a) se elimina antes de la posterior conversión de dicho anión antranilato en anilina mediante descarboxilación térmica en la etapa b).
7. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, que utiliza en la etapa b) un catalizador que es un catalizador ácido heterogéneo.
8. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, que utiliza en la etapa b) un catalizador que es un catalizador básico heterogéneo.
9. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, en el que la extracción de anilina en un disolvente orgánico en la etapa c) se realiza durante más de una vez para una preconcentración adicional de anilina antes de la destilación.
10. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9, que comprende recuperar el disolvente orgánico utilizado en la extracción de la etapa c).
11. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho disolvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en alcoholes, fenoles, amidas, éteres e hidrocarburos aromáticos.
12. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 11, que comprende una etapa adicional e) de realimentación de la fase acuosa de la extracción realizada en la etapa c) y/o la realimentación de la fase acuosa de la destilación realizada en la etapa d) a la fermentación de la etapa a).
13. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 12, en el que el catión  $\text{NH}_4^+$  se recupera como  $\text{NH}_3$  tras la destilación de la etapa d) y se realimenta a la fermentación de la etapa a).
14. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 13, en el que la materia prima de la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en remolacha azucarera, caña de azúcar, plantas que contienen almidón, lignocelulosa, glicerol y compuestos C1.
15. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 14, en el que dicho sustrato de carbono fermentable se selecciona del grupo que consiste en monosacáridos C-5, monosacáridos C-6, disacáridos y trisacáridos.
16. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 15, en el que dicho hospedador recombinante se selecciona del grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos.
17. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 16, que comprende adicionalmente una etapa en la que la anilina producida se convierte en metilendianilina (MDA) con formaldehído en presencia de agua y catalizador.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que la MDA producida se convierte en una etapa adicional en metilendiisocianato (MDI) con fosgeno.

Figuras

Figura 1

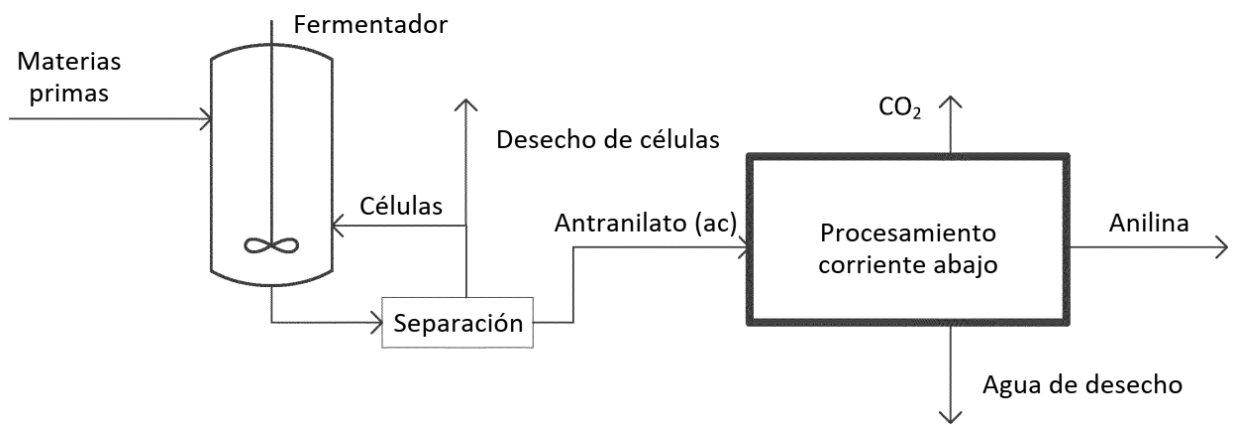


Figura 2

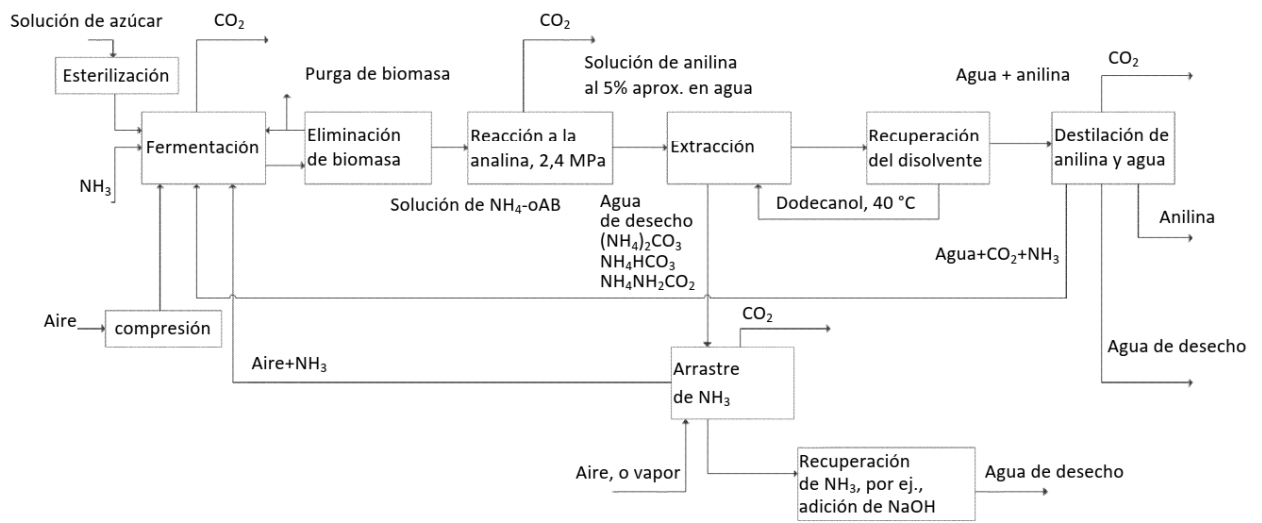


Figura 3

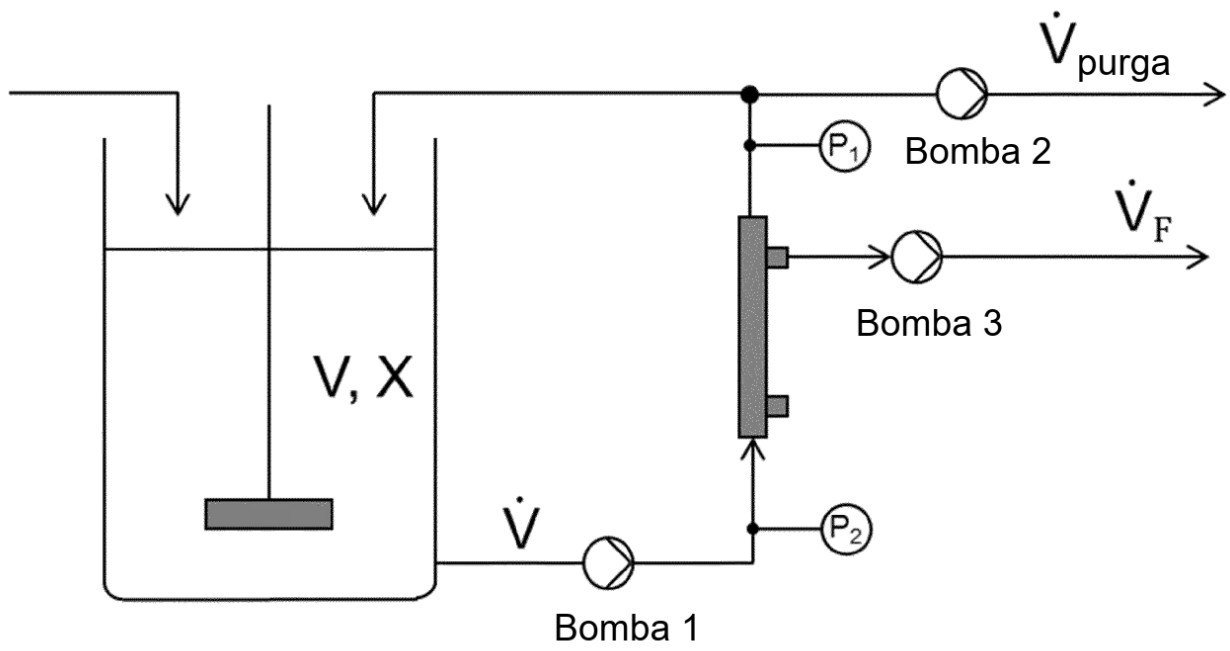


Figura 4

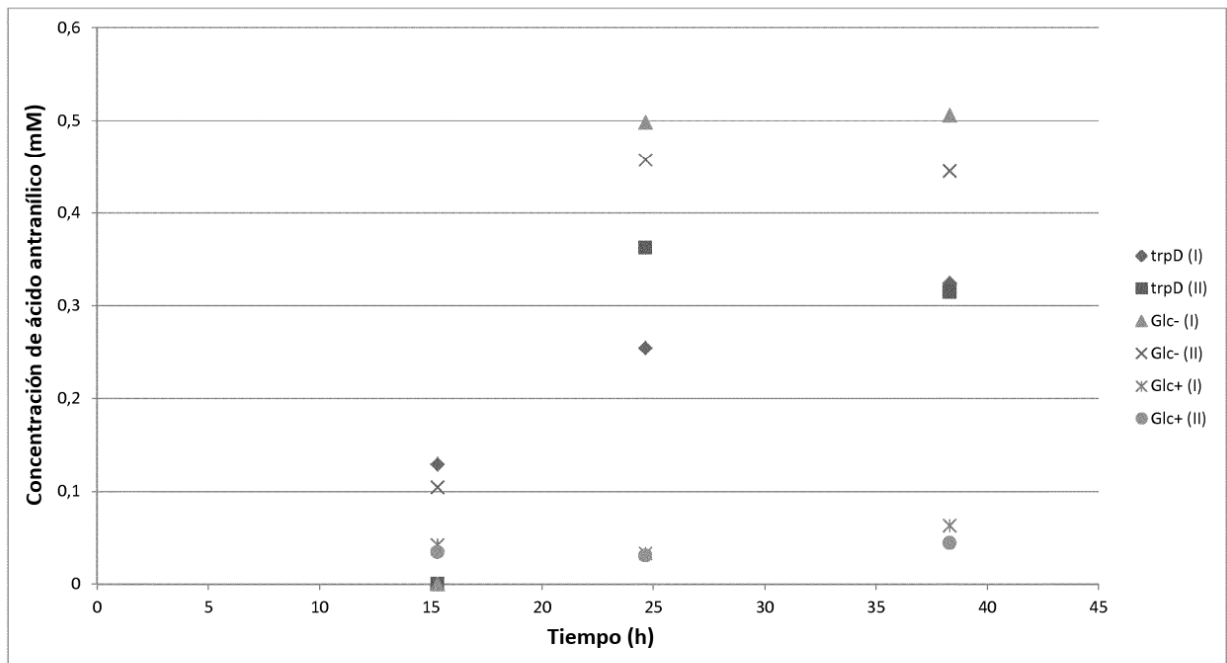


Figura 5

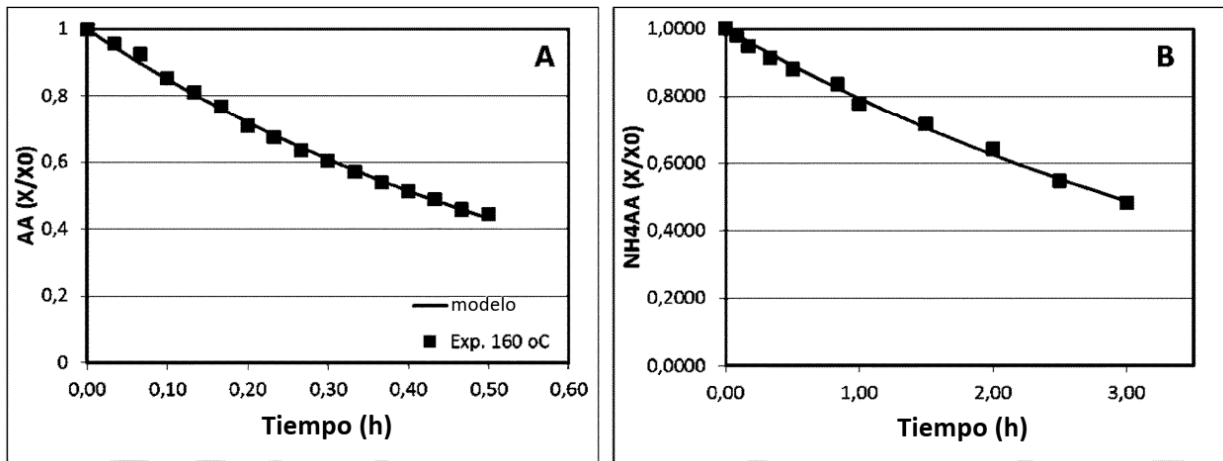


Figura 6



