



**HAL**  
open science

# Compréhension et maîtrise des mécanismes de l'extraction réactive de l'acide 3-hydroxypropionique au regard d'un procédé intégré couplant bioconversion et extraction

Florian Chemarin

► **To cite this version:**

Florian Chemarin. Compréhension et maîtrise des mécanismes de l'extraction réactive de l'acide 3-hydroxypropionique au regard d'un procédé intégré couplant bioconversion et extraction. Génie des procédés. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLA038 . tel-02059642

**HAL Id: tel-02059642**

**<https://theses.hal.science/tel-02059642>**

Submitted on 6 Mar 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Compréhension et maîtrise des mécanismes de l'extraction réactive de l'acide 3-hydroxypropionique au regard d'un procédé intégré couplant bioconversion et extraction

**Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à AgroParisTech**

École doctorale n°581  
Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : Génie des Procédés

Thèse présentée et soutenue à Pomacle, le 21 novembre 2017, par

**Florian Chemarin**

Composition du Jury :

Dominique Pareau Présidente  
Professeure émérite, CentraleSupélec, Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux

João Crespo Rapporteur  
Professeur, Université Nouvelle de Lisbonne, Centre de Chimie Fine et de Biotechnologie

Michel Meyer Rapporteur  
Professeur, INP Toulouse – ENSIACET, Laboratoire de Génie Chimique

Violaine Athès-Dutour Directrice de thèse  
Professeure, AgroParisTech, Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires

Marwen Moussa Encadrant de thèse  
Maître de conférences, AgroParisTech, Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires

Cristian Trelea Invité  
Professeur, AgroParisTech, Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaire

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail et d'y consacrer le temps nécessaire : João G. Crespo (rapporteur), Michel Meyer (rapporteur) et Dominique Pareau (examinatrice).

Merci également aux membres extérieurs de mon comité de thèse : Marie-Laure Lameloise, Moncef Stambouli et François Boué dont les remarques des plus anodines aux plus complexes se sont révélées intéressantes. J'espère que les expériences en cours, réalisées grâce à François Boué, auxquelles j'ai pu participer dans les thèses qui suivent aboutiront sur des résultats intéressants.

J'ai également à cœur de remercier les trois personnes qui m'ont encadré pendant cette thèse : Violaine Athès-Dutour, Marwen Moussa et Cristian Trelea. C'est vraiment un immense plaisir que j'ai eu de travailler avec vous et ma motivation dans ce projet y tient pour beaucoup. J'estime avoir vraiment eu beaucoup de chance. Violaine, pour ton attitude toujours positive et bienveillante, Marwen pour ta présence au quotidien et ton soutien infaillible en toutes circonstances (même les plus extrêmes...), Cristian pour notre connexion scientifique et ta disponibilité. J'ai beaucoup appris grâce à vous, chacun dans des domaines ou à des niveaux très différents. Toutes les longues discussions que nous avons eues m'ont vraiment enrichi sur tous les plans et c'est aussi grâce à cet environnement stimulant que nous avons pu autant valoriser ce travail. C'est avec tristesse que je vois la fin de l'aventure.

Je veux également remercier les biologistes qui ont tourné de près ou de loin autour de ce travail. Tiphaine Clément et Julien Couvreur qui ont directement participé aux cultures microbiennes mais également pour leur temps accordé pour des discussions dans un domaine relativement nouveau pour moi. J'y joins également Mathilde Grandchamp-Leriche. Tiphaine, je n'oublierai pas ces covoiturages toujours agréables à titre gracieux, ni les multiples mises au point pour l'HPLC. Enfin, évidemment je tiens à remercier Claire Saulou-Bérion pour tout son temps consacré à m'expliquer le génie microbiologique, à m'épauler dans mon parcours de thèse, pour sa précision à toute épreuve et pour sa présence très amicale tout au long de mon séjour à Grignon. On n'oubliera pas cet incroyable congrès à Nice notamment.

J'aimerais aussi souligner le soutien sans faille de la Chaire ABI qui m'a permis grâce à l'acquisition d'un nouveau pilote d'augmenter le potentiel des expériences mais également pour tous les congrès et déplacements financés en France ou à l'international. C'est vraiment une chance que j'ai eue. Merci

beaucoup Florent Allais de m'avoir fait confiance pour cofinancer cette thèse et m'accueillir au sein de la Chaire. Un grand merci également à Andreia Teixeira qui s'est vraiment investie dans le design et la mise en route de la nouvelle installation et pour son expérience dans le domaine des membranes. Même si on n'a pas pu collaborer autant qu'on l'aurait voulu, j'en garde un bon souvenir.

Je souhaite également adresser un merci particulier pour tout le personnel technique qui a grandement participé à cette thèse. Au niveau du GMPA, Brigitte Pollet et Pascale Lieben ont fourni un gros travail sur la mise au point de la technique, la quantification et l'identification d'espèces en phase aqueuse. Sans elles, tous les résultats concernant les impuretés des produits commerciaux n'auraient pas été possibles. J'en profite pour remercier les gars de l'atelier du GMPA pour la confection du petit pilote qui a été grandement utile. Et puis évidemment, la GENIAL Magali Bedu, qui a montré un grand enthousiasme dans l'analyse des ions des milieux. Sa bonne humeur et son sens de l'humour ont grandement joué sur ma motivation et mon intérêt pour la réalisation des analyses et les déplacements sur Massy. Encore félicitations pour l'obtention de ta licence professionnelle pleinement méritée et je suis vraiment très heureux d'avoir pu, au moins un peu, te rendre la pareille en y contribuant. Ce ne sont pas une mais deux publications qui sont en jeu.

J'ai eu l'occasion de pouvoir encadrer non pas un, ni deux, mais bien trois stagiaires lors de cette thèse et je les remercie grandement pour leur investissement et le sérieux avec lequel ils ont entrepris leurs missions : Morad Chadni, Thomas Loty et William Buquet. Sans vous, une grande partie de ce travail n'aurait pas pu être entrepris dans le temps imparti et c'est avec plaisir que je vous joins aux publications auxquelles vous avez énormément contribué. Merci pour votre entrain et votre présence au quotidien dans une ambiance très détendue et agréable mais tout de même productive.

Un grand merci à tous mes collègues au jour le jour, doctorants, post-doctorants, et permanents pour l'excellente ambiance dont j'ai pu profiter au GMPA ou à la Chaire ABI. A Grégoire bien sûr pour avoir ouvert les pistes de travail et continuellement distillé son humour. A Julie pour sa bonne humeur et sa fraîcheur au quotidien. A Solenne, Salma, Bernadette et Thomas pour leur agréable compagnie. A Axel en particulier pour avoir illuminé ce séjour à San Francisco de sa sagesse et de sa confiance. A mes collègues de bureau, Louis pour son entrain à rire et ses discussions endiablées et à Jimmy pour ses traits d'esprits, son immense culture et ses engagements profonds. Vous avez tous deux hautement participé au bon déroulement de mon séjour à la Chaire. A Gaëlle pour sa disponibilité et sa douceur. A Fanny pour son tempérament trempé et franc que j'apprécie (merci également pour les multiples trajets) et à Marine pour sa joie de vivre contagieuse. Enfin, merci à Amandine pour son ouverture et

pour tous ces convoitages et discussions quotidiennes traitant de tout et de rien mais toujours intéressantes.

Enfin et non des moindres, je tiens à remercier chaleureusement ma famille et mes amis. A mes parents, à Coralie et à mes deux merveilleuses petites sœurs qui ont accepté mes absences, au sens propre et figuré, pendant de longues périodes mais qui m'ont également permis de recharger mes batteries en n'étant pas trop exigeants. Merci d'avoir toujours été là pour moi, de votre soutien indéfectible et de votre présence depuis le tout début. A tous mes amis, Aurélia, Benjamin, chou, Dimitri, Eloïse, Etienne, lapin, Laura, Maëlle, Maria et tous ceux que je ne cite pas, pour leur soutien, leurs encouragements, la façon dont ils ont pu me changer les idées, pour ces fabuleux voyages à travers la France et l'Europe qui resteront à jamais gravés et ces grands moments partagés dont un essai d'énumération resterait vain et dont la liste continue de s'allonger.

## LISTE DES VALORISATIONS

Le soulignage indique la personne ayant présenté la communication.

### 1) Publications dans journaux à comité de lecture

- **F. Chemarin**, V. Athès, W. Buquet, M. Bedu, F. Allais, A. F. Teixeira, M. Moussa, I.C. Trelea, *Reactive extraction in membrane contactors for in situ product recovery of 3-hydroxypropionic acid: predictive modeling and bioconversion-like experimental implementation*, to be submitted.
- **F. Chemarin**, M. Moussa, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, *Recovery of 3-hydroxypropionic acid from loaded organic phases after reactive extraction with tertiary amines in an alcohol solvent*, to be submitted
- **F. Chemarin**, V. Athès, M. Bedu, T. Loty, F. Allais, I.C. Trelea, M. Moussa, *Towards an in-situ product recovery of bio-based 3-hydroxypropionic: influence of bioconversion broth components on membrane-assisted reactive extraction*, submitted to Sep. Purif. Technol. 2017
- **F. Chemarin**, M. Moussa, F. Allais, V. Athès, I.C. Trelea, *Mechanistic modeling and equilibrium prediction of organic acids reactive extraction with amines: comparative study of 2 complexation-solvation models in the case of 3-hydroxypropionic acid*, Sep. Purif. Technol. 189 (2017) 475–487.
- G. Burgé, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, **F. Chemarin**, M. Kniest, F. Allais, H.-E. Spinnler, V. Athès, *Towards an extractive bioconversion of 3-hydroxypropionic acid: study of inhibition phenomena: Evaluation of bacterial cell inhibition during 3-HP extractive bioconversion*, J. Chem. Technol. Biotechnol. 92 (2017).2425–2432.
- **F. Chemarin**, M. Moussa, M. Chadni, B. Pollet, P. Lieben, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, *New insights in reactive extraction mechanisms of organic acids: An experimental approach for 3-hydroxypropionic acid extraction with tri-n-octylamine*, Sep. Purif. Technol. 179 (2017) 523–532.
- G. Burgé, **F. Chemarin**, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, F. Allais, H.-É. Spinnler, V. Athès, *Reactive extraction of bio-based 3-hydroxypropionic acid assisted by hollow-fiber membrane contactor using TOA and Aliquat 336 in n-decanol*, J. Chem. Technol. Biotechnol. 91 (2016) 2705–2712.
- M. Moussa, G. Burgé, **F. Chemarin**, R. Bounader, C. Saulou-Bérion, F. Allais, H.-E. Spinnler, V. Athès, *Reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid from model aqueous solutions and real bioconversion media. Comparison with its isomer 2-hydroxypropionic (lactic) acid*, J. Chem. Technol. Biotechnol. 91 (2015) 2276–2285.

### 2) Congrès internationaux à comités de sélection

#### a. Communications orales

- **In-situ product recovery using membrane-assisted reactive extraction for bio-based 3-hydroxypropionic acid production**  
**F. Chemarin**, M. Moussa, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, *10<sup>th</sup> World Congress of Chemical Engineering, 11<sup>th</sup> European Congress of Chemical Engineering, 4<sup>th</sup> European Congress of Applied Biotechnology*, Barcelone, Espagne, 1<sup>er</sup> – 5 Octobre 2017

- **In-situ product recovery using membrane-assisted reactive extraction for bio-based 3-hydroxypropionic acid production**  
**F. Chemarin**, M. Moussa, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, *11<sup>th</sup> International Congress on Membranes and Membrane Processes*, San Francisco, Etats-Unis, 29 Juillet – 4 Août 2017
- **Extractive bioconversion of 3-hydroxypropionic acid : insights in extraction and mass transfer mechanisms**  
**F. Chemarin**, M. Moussa, G. Burgé, F. Allais, V. Athès, I.C. Trelea, *6<sup>th</sup> International Conference on Engineering for Waste and biomass Valorization*, Albi, France, 23 – 26 Mai 2016
- **Glycerol bioconversion for 3-hydroxypropionic acid production through an integrated process including in-situ product recovery**  
G. Burgé, **F. Chemarin**, C. Saulou-Bérion, M. Moussa, H.-E. Spinnler, V. Athès, *10<sup>th</sup> European Congress of Chemical Engineering, 4<sup>th</sup> European Congress of Applied Biotechnology*, Nice, France, 27 Septembre – 1<sup>er</sup> Octobre 2015
- **Membrane assisted reactive extraction of biobased 3-hydroxypropionic acid through an integrated process of extractive bioconversion: a step forward for bio-process intensification**  
Moussa, M., Burgé G., **Chemarin F.**, Saulou-Bérion C., Chadni M., Allais F., Spinnler H.E., Athès V. (2015). Euromembrane Conference, Aachen, Germany, September 6th-10th, 2015.

## b. Posters

- **Extractive bioconversion of 3-hydroxypropionic acid: insights in extraction and mass transfer mechanisms**  
**F. Chemarin**, M. Moussa, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, *24<sup>th</sup> European Biomass Conference and Exhibition*, Amsterdam, Pays-Bas, 6 – 9 Juin 2016
- **Reactive liquid-liquid extraction and back-extraction of bio-based 3-hydroxypropionic acid: towards the implementation of an integrated process of extractive bioconversion**  
**F. Chemarin**, M. Moussa, G. Burgé, F. Allais, V. Athès, *10<sup>th</sup> European Congress of Chemical Engineering, 3<sup>rd</sup> European Congress of Applied Biotechnology*, Nice, France, 27 Septembre – 1<sup>er</sup> Octobre 2015
- **Bio-based 3-hydroxypropionic acid production and extraction starting from glycerol: towards a sustainable integrated process**  
G. Burgé, **F. Chemarin**, M. Moussa, C. Saulou, F. Allais, H.-E. Spinnler, V. Athès, *3<sup>rd</sup> International Symposium on Green Chemistry*, La Rochelle, France, 3 – 7 Mai 2015

## 3) Congrès nationaux

### a. Keynote

- **Coupling of production and separation processes in biotechnologies : focus on the case of 3-hydroxypropionic acid**  
**F. Chemarin**, M. Moussa, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, *16<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Génie des Procédés*, Nancy, France, 11 – 13 Juillet 2017

## **b. Communications orales**

- **Extraction réactive en contacteur membranaire: vers l'intégration d'un procédé de bioconversion extractive de l'acide 3-hydroxypropionique**  
F. Chemarin, M. Moussa, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, *Journée des doctorants du Club Français des Membranes*, Paris, France, 7 Avril 2016
- **Compréhension et maîtrise des mécanismes de l'extraction réactive de l'acide 3-hydroxypropionique au regard d'un procédé intégré couplant bioconversion et extraction**  
F. Chemarin, M. Moussa, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, *Séminaire Bloraffinerie des Lignocelluloses*, Massy, France, 11 mars 2016

## **c. Posters**

- **Reactive extraction of bio-based 3-hydroxypropionic acid : towards an integrated process of a membrane-assisted extractive bioconversion**  
F. Chemarin, M. Moussa, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, *French-Nordic research day "Biomass Conversion: Green Chemistry & Innovative Processes"*, Paris, France, 10 Mars 2016
- **Biobased 3-hydroxypropionic acid through a new integrated process of glycerol bioconversion and membrane-assisted reactive extraction**  
G. Burgé, F. Chemarin, C. Saulou-Bérion, H.E. Spinnler, V. Athès, M. Moussa, *French-Nordic research day "Biomass Conversion: Green Chemistry & Innovative Processes"*, Paris, France, 10 Mars 2016



# SOMMAIRE

Remerciements	I
Liste des valorisations	IV
Sommaire	VII
Nomenclature	XI
Liste des tableaux	XII
Liste des figures	XV
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : Synthèse bibliographique</b>	<b>7</b>
<b>1. Production et purification d'acides organiques produits de façon industrielle par voie biotechnologique</b>	<b>8</b>
1.1. L'acide citrique	8
1.1.1. Production et usages de l'acide citrique	8
1.1.2. Procédés de séparation pour la récupération de l'acide citrique	9
1.2. L'acide lactique	10
1.2.1. Production et usages de l'acide lactique	10
1.2.2. Procédés de séparation de l'acide lactique	11
1.2.3. Procédé d'obtention de l'acide polylactique	13
1.3. L'acide succinique	14
1.3.1. Production et usages de l'acide succinique	14
1.3.2. Procédés de séparation pour la récupération de l'acide succinique	15
Références bibliographiques	18
<b>2. L'acide 3-hydroxypropionique (3-HP)</b>	<b>21</b>
2.1. Le 3-HP comme synthon	21
2.2. Les méthodes de production du 3-HP	24
2.2.1. Les méthodes de production chimiques	24
2.2.2. Les méthodes de production biotechnologiques	25
2.3. Les procédés de séparation envisagés pour le 3-HP	30
Références bibliographiques	35
<b>3. La fermentation extractive : un procédé de choix pour les acides organiques</b>	<b>39</b>
3.1. Récupération de produits <i>in-situ</i> (ISPR)	39
3.1.1. Généralités	39
3.1.2. Récupération <i>in-situ</i> d'acides organiques produits par voies Biotechnologiques	42
3.2. Extraction liquide-liquide réactive d'acides organiques	45
3.2.1. Les différents extractants pour l'extraction réactive	45
3.2.2. Mécanismes des amines tertiaires et exemples d'extraction	48

3.2.3. Modélisation de l'état d'équilibre de l'extraction réactive	55
3.3. L'extraction liquide-liquide réactive en ISPR	58
3.3.1. Exemples de mise en œuvre	58
3.3.2. Problème de la toxicité de la phase organique	59
3.4. Les contacteurs liquide-liquide à membrane	62
3.4.1. Généralités	62
3.4.2. Transferts de matière dans les contacteurs liquide-liquide à membrane à fibres creuses	64
3.4.3. Précisions pour le cas de l'extraction réactive	67
Références bibliographiques	69
Conclusion de la synthèse bibliographique	75
<b>Chapitre II : Matériels et méthodologie expérimentale</b>	<b>77</b>
<b>1. Démarche expérimentale</b>	<b>78</b>
<b>2. Les pilotes d'extraction liquide-liquide à membrane</b>	<b>81</b>
<b>3. Produits chimiques et recyclage</b>	<b>86</b>
Références bibliographiques	89
<b>Chapitre III : Résultats et discussion</b>	<b>91</b>
<b>Avant-propos</b>	<b>92</b>
<b>Publication n°1 :</b>	<b>93</b>
<b>Eléments nouveaux dans les mécanismes d'extraction réactive d'acides organiques: approche expérimentale pour l'extraction de l'acide 3-hydroxypropionique par la tri-<i>n</i>-octylamine</b>	
1.1. Introduction	95
1.2. Matériel et méthodes	98
1.2.1. Théorie	98
1.2.2. Produits chimiques	98
1.2.3. Méthodes analytiques	100
1.3. Résultats et discussion	102
1.3.1. Criblage de solvants	102
1.3.2. Extraction physique	104
1.3.3. Effet de la concentration initiale en amine	104
1.3.4. Effet de la concentration initiale en acide	107
1.3.5. Influence des impuretés de la TOA sur les performances d'extraction	108
1.4. Conclusion	113
1.5. Références	115
1.6. Principaux résultats et remarques supplémentaires	119
<b>Publication n°2 :</b>	<b>121</b>
<b>Modélisation mécanistique et prédiction de l'équilibre de l'extraction réactive d'acides organique par des amines : étude comparative de deux modèles de complexation-solvatation pour l'acide 3-hydroxypropionique</b>	

2.1. Introduction	125
2.2. Matériel et méthodes	126
2.2.1. Théorie	126
2.2.2. Modélisation	127
2.2.3. Expériences	133
2.3. Résultats et discussion	135
2.3.1. Nature du complexe acide-amine	135
2.3.2. Calibration du modèle 1	141
2.3.3. Calibration du modèle 2	143
2.3.4. Validation et comparaison des modèles 1 et 2	144
2.4. Conclusion	147
2.5. Références	149
2.6. Principaux résultats et remarques supplémentaires	152

**Publication n°3 : 153**

**Vers un procédé de récupération *in situ* de l'acide 3-hydroxypropionique biosourcé : influence des composants d'un milieu de bioconversion sur l'extraction réactive en contacteur membranaire**

3.1. Introduction	155
3.2. Matériel et méthodes	157
3.2.1. Stratégie expérimentale	157
3.2.2. Produits chimiques	158
3.2.3. Extraction réactive à membrane	158
3.2.4. Paramètres calculés	159
3.2.5. Méthodes analytiques	159
3.3. Résultats et discussion	160
3.3.1. Influence de la concentration initiale en acide	160
3.3.2. Influence du pH initial	161
3.3.3. Influence de la présence de sels	162
3.3.4. Effets des impuretés de la TOA	165
3.3.5. Influence de la présence de protéines	166
3.4. Conclusion	167
3.5. Références	169
3.6. Principaux résultats et remarques supplémentaires	172

**Publication n°4 : 173**

**Récupération de l'acide 3-hydroxypropionique à partir de phases organiques chargées après extraction réactive par des amines tertiaires dans un solvant de type alcool**

4.1. Introduction	175
4.2. Matériel et méthodes	177
4.2.1. Produits chimiques	177
4.2.2. Expérience	177
4.2.3. Définition des paramètres	179
4.2.4. Méthodes analytiques	180
4.3. Résultats et discussion	180
4.3.1. Dés extraction par addition de sels	180
4.3.2. Dés extraction par modulation de solvant	184
4.3.3. Dés extraction par modulation de température	185

4.4. Conclusion	190
4.5. Références	192
4.6. Principaux résultats et remarques supplémentaires	194

**Publication n°5 : 197**

**Extraction réactive en contacteurs membranaires pour la récupération in situ de l'acide 3-hydroxypropionique : modélisation prédictive et mise en œuvre expérimentale en mimant des bioconversions**

5.1. Introduction	202
5.2. Matériel et méthodes	203
5.2.1. Modélisation	203
5.2.2. Stratégie expérimentale	210
5.2.3. Produits chimiques et microorganismes	211
5.2.4. Montages expérimentaux	211
5.2.5. Méthodes analytiques	212
5.3. Résultats et discussion	214
5.3.1. Mesures de viscosité	214
5.3.2. Calibration du modèle et prédictions	214
5.3.3. Ajout progressif de 3-HP	215
5.3.4. Expérience à l'état stationnaire	216
5.3.5. Expériences mimant des bioconversions	218
5.4. Conclusion	224
5.5. Références	225
5.6. Principaux résultats et remarques supplémentaires	229

**Conclusion générale et perspectives 237**

## NOMENCLATURE

### Alphabet latin :

- 1,3-PDO : 1,3-propanediol
- 3-HP : acide 3-hydroxypropionique
- 3-HPA : 3-hydroxypropionaldehyde
- A : surface de transfert ( $m^2$ )
- AH : acide organique non-dissocié
- C : concentration en soluté (mol/L)
- CPX : complexe acide-extractant
- d : diamètre des fibres (m)
- D : coefficient de diffusion moléculaire ( $m^2/s$ )
- e : épaisseur de la membrane (m)
- FDCA : acide furandicarboxylique
- G.R.A.S. : generally recognized as safe
- ISPR: *in-situ* product recovery
- k : coefficient de transfert (m/s)
- K : constante d'équilibre de complexation
- $K_A$  : constante de dissociation d'un acide dans l'eau
- L : longueur des fibres (m)
- MIBK : méthylisobutylcétone
- $NAD^+/NADH$  : nicotinamide adénine dinucléotide
- p : coefficient stœchiométrique relatif à l'acide
- P: coefficient de partage
- PET : polyéthylène téréphtalate
- $pK_A$  : cologarithmique de  $K_A$ , soit  $-\log(K_A)$
- PLA : acide polylactique
- q : coefficient stœchiométrique relatif à l'amine
- r : rayon des pore de la membrane de la membrane (m)
- R : résistance au transfert (s/m)
- $R_3N$  : amine tertiaire
- S : soluté ou agent solvatant phosphoré
- TBP : phosphate de tributyle
- TOA : tri-*n*-octylamine
- TOMAC : chlorure de trioctylméthylammonium

TOPO : oxyde de trioctylphosphine

V : volume ( $\text{m}^3$ )

Alphabet grec :

$\gamma$  : tension de surface (N/m)

$\delta$  : épaisseur de couche limite (m)

$\Delta P_c$  : différence de pression critique (Pa)

$\varepsilon$  : porosité de la membrane

$\tau$  : tortuosité de la membrane

$\varphi$  : fraction volumique du diluant

Indices et exposants :

aq : relatif à la phase aqueuse, côté aqueux

CPX : relatif au complexe acide-extractant

eq : relatif à l'état d'équilibre

int : interne pour les longueurs, relatif à l'interface pour les concentrations

lm : moyenne logarithmique

m : relatif à la membrane, dans les pores de la membrane

org : relatif à la phase organique, côté organique

out : externe

$R_3N$  : relatif à l'amine tertiaire

T : relatif au transfert de matière dans son ensemble, globalement

## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau: Liste issue du premier criblage en 2004 du DoE des 28 composés non-gazeux d'intérêt à produire à partir de biomasse</i>	3
<i>Tableau 1 : Propriétés de l'acide citrique</i>	8
<i>Tableau 2 : Propriétés de l'acide lactique</i>	10
<i>Tableau 3 : Propriétés de l'acide succinique</i>	14
<i>Tableau 4 : propriétés de l'acide 3-hydroxypropionique</i>	21
<i>Tableau 5 : Composition du milieu de fermentation utilisé par Cargill pour convertir le glucose en 3-HP</i>	29
<i>Tableau 6 : Paramètres et résultats du procédé fermentaire de Cargill</i>	30
<i>Tableau 7 : Extraction liquide-liquide de solutions d'acide acrylique (AA) et de 3-HP pour différents solvants</i>	31
<i>Tableau 8 : Exemples de fermentations extractives d'acide lactique par l'utilisation de résines échangeuses d'ions</i>	42
<i>Tableau 9 : coefficients de partage octanol/eau et MIBK/eau des principaux acides carboxyliques avec le cologarithme de leurs constantes de dissociation</i>	44
<i>Tableau 10 : Résultats d'extractions liquides-liquides réactives d'acide lactique obtenus pour différents extractants dans des diluants purs</i>	51
<i>Tableau 11 : résultats d'extractions liquide-liquide réactive d'acide lactique pour des diluants binaires alcool-dodécane</i>	52
<i>Tableau 12 : Exemples de bioconversions extractives par extraction réactive avec des amines</i>	58
<i>Tableau 13 : évaluation de la toxicité d'un milieu saturé en dodécanol sur différents microorganismes</i>	60
<i>Tableau 14 : Evaluation de la toxicité de différents alcools sur différentes bactéries productrices d'acide lactique par ajout de 1%v/v dans le milieu de fermentation</i>	61
<i>Tableau 15 : Caractéristiques du module à fibres creuses Liqui-Cel 2.5x8 et des fibres X50 (*données constructeur)</i>	82
<i>Tableau 16 : Principaux produits chimiques utilisés</i>	86
<i>Table I-1: Physicochemical properties of the studied solvents</i>	103
<i>Table I-2: amount of amines (OA+DOA) found in the aqueous phase after extraction and associated measured (pH<sub>eq</sub>) and calculated (pH<sub>th</sub> and p<i>H</i><sub>th</sub>.) pH, as a function of initial 3-HP and TOA concentrations, for solutions 1 (98.1% of TOA purity), 2 (99.6% of TOA purity) and 3 (&gt;99.6%: purified TOA)</i>	109
<i>Tableau I-3 : Influence de la présence de quelques solvants à niveau de saturation dans l'eau sur la viabilité cellulaire de L. reuteri</i>	120
<i>Table II-1: Experimental calibration and validation sets</i>	134

<i>Table II-2: Parameters determined for Model 1</i>	141
<i>Table II-3: Parameter values determined for Model 2</i>	143
<i>Table II-4: Comparison of model accuracy, in percent of extraction yield</i>	145
<i>Table III-1: summary of yield and kinetics parameters for all experimental conditions</i>	161
<i>Table IV-1: summary of volumes introduced into each tube for different hexane contents and aqueous/organic volume ratios</i>	178
<i>Table V-1: Equations implemented in the model concerning chemical equilibria and kinetics</i>	203
<i>Table V-2: Equations implemented in the model concerning mass balance and flux conservation</i>	205
<i>Table V-3: Characteristics of Liqui-Cel commercial modules used</i>	211



## LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : formule topologique de l'acide citrique</i>	8
<i>Figure 2 : formule topologique de l'acide lactique</i>	10
<i>Figure 3: Procédé de production d'acide lactique à partir de glucose, semblable au procédé Purac</i>	12
<i>Figure 4 : Formule topologique de l'acide succinique</i>	14
<i>Figure 5: Procédé de production d'acide succinique à partir de sucres similaire au premier procédé envisagé par Bioamber</i>	16
<i>Figure 6 : Formule topologique de l'acide itaconique</i>	17
<i>Figure 7 : Formule topologique de l'acide adipique</i>	17
<i>Figure 8 : formule topologique de l'acide 3-hydroxypropionique</i>	21
<i>Figure 9 : Plate-forme de l'acide 3-hydroxypropionique</i>	22
<i>Figure 10 : Procédé de production Lurgi/Nippon Kayaku (Air Liquide) d'acide acrylique à partir de propylène</i>	23
<i>Figure 11 : films de poly(3-HP)</i>	24
<i>Figure 12 : Nombre de publications comportant la mention « 3-hydroxypropionic acid » dans le titre</i>	25
<i>Figure 13 : Schéma réactionnel de la conversion enzymatique du glycérol en 3-HP et 1,3-PDO par <i>L. reuteri</i></i>	26
<i>Figure 14 : Schéma réactionnel de l'oxydation sélective du 1,3-PDO en 3-HP par <i>G. oxydans</i></i>	27
<i>Figure 15 : Voie métabolique de production de 3-HP par l'intermédiaire du malonyl-CoA</i>	28
<i>Figure 16 : Une voie métabolique de production de 3-HP par l'intermédiaire de la <math>\beta</math>-alanine</i>	28
<i>Figure 18 : Schéma de principe du procédé de dissociation thermique extractive du sel d'ammonium</i>	32
<i>Figure 19 : Schéma de principe du procédé de séparation/purification du 3-HP après fermentation par des levures tel qu'envisagé par Cargill</i>	34
<i>Figure 20 : Configurations possibles de procédés ISPR</i>	40
<i>Figure 21 : arbre de décisions pour le choix d'un procédé ISPR adapté au produit à récupérer</i>	40
<i>Figure 22 : formule topologique du TBP</i>	45
<i>Figure 23 : formule topologique du TOPO</i>	45
<i>Figure 24 : formule topologique de la TOA</i>	46
<i>Figure 25 : formule topologique de la tridodécylamine</i>	46

<i>Figure 26 : formule topologique du TOMAC</i>	47
<i>Figure 27 : Représentation des différentes formes limites de la liaison acide-amine avec la liaison hydrogène (A), la liaison intermédiaire à charges partielles (B) et la liaison ionique (C)</i>	48
<i>Figure 28 : formules topologiques limites de complexes de stoechiométries (2;1) et (3;1)</i>	49
<i>Figure 29 : formules topologiques limites de complexes de stoechiométries (3;1) avec stabilisation cyclique</i>	49
<i>Figure 30 : exemple de compétition avec le solvant pour la formation de liaison H avec le complexe</i>	50
<i>Figure 31 : Rendements d'extraction d'acide lactique en fonction de la concentration en extractant pour différents diluants purs (A) et rendement d'extraction en fonction de la fraction volumique de dodécane dans le diluant pour différents solvants actifs avec une teneur en extractant fixe (B)</i>	52
<i>Figure 32 : Schéma résumant les mécanismes d'extraction réactive d'acides par des amines tertiaires</i>	54
<i>Figure 33 : Schéma représentant le principe de fonctionnement d'un contacteur membranaire au niveau des pores de la membrane à l'interface entre les phases</i>	63
<i>Figure 34 : Schéma détaillant le profil de concentration d'un soluté S au voisinage de la membrane lors d'une extraction liquide-liquide par contacteur membranaire</i>	67
<i>Figure 35 : Représentation schématique de la démarche expérimentale, en lien avec les publications présentées dans le manuscrit au chapitre III</i>	78
<i>Figure 36 : Schéma de fonctionnement du module membranaire utilisé et images des fibres observées au microscope pour différents grossissements</i>	82
<i>Figure 37 : Schéma de principe de l'installation de paillasse</i>	83
<i>Figure 38 : Dessin réaliste du pilote d'extraction Seprosys (à l'échelle)</i>	83
<i>Figure 39 : Schéma de procédé du pilote Seprosys en mode extraction liquide-liquide simple</i>	84
<i>Figure 40 : Schéma de procédé du pilote Seprosys en mode extraction liquide-liquide couplée à la dés extraction liquide-liquide</i>	84
<i>Figure 41 : Panneau de commande tactile du pilote Seprosys représentant le schéma de procédé</i>	85
<i>Figure 42 : Précipité de 3-hydroxypropionate de sodium (gauche) et concentré d'acide 3-hydroxypropionique (droite)</i>	88
<i>Figure I-1: Extraction yields for different solvents with 0.46 mol/L of TOA (20% v/v) and 0.011 mol/L of 3-HP (1 g/L). Error bars represent standard deviations (n=2)</i>	102
<i>Figure I-2: Extractions yields as a function of TOA concentration in decanol (open circles) and oleyl alcohol (filled circles), with 0.011 mol/L (1g/L) of 3-HP initially. Error bars represent standard deviations (n=2)</i>	105

<i>Figure I-3: IR spectra of organic phases after 3-HP extraction (53g/L in the organic phase, bold line) and after simple water contact (thin line) (A) and IR spectra of commercial aqueous phases of 3-HP before (bold line) and after (thin line) neutralization with NaOH (B)</i>	105
<i>Figure I-4: Water solubility in the organic phase as a function of TOA concentration (0 – 2.3 mol/L) in decanol at 25°C. Error bars represent standard deviations (n=3) and are masked by the symbols</i>	106
<i>Figure I-5: Extraction yields in decanol (open circles) and oleyl alcohol (filled circles) with 0.46 mol/L TOA (20% v/v) as a function of initial acid concentration. Error bars represent standard deviations (n=2)</i>	107
<i>Figure I-6: water co-extraction in decanol (open circles) and oleyl alcohol (filled circles) with 0.46 mol/L TOA (20% v/v) as a function of the acid concentration in the organic phase after extraction. Error bars represent standard deviations (n=3) and are masked by the symbols</i>	108
<i>Figure I-7: Extraction yields for different TOA solutions (squares: solution 1 (98.1% purity); circles: solution 2 (99.6% purity); triangles: solution 3 (purified TOA)) in decanol as a function of initial acid concentration at 0.46 mol/L TOA (20% v/v) (A) and initial TOA concentration at 0.011 mol/L 3-HP (1 g/L) (B). Error bars represent standard deviations (n=2)</i>	112
<i>Figure II-1: Infrared spectra</i>	136
<i>Figure II-2: Proposed structures for the (1:1) (A) and (2:1) (B) acid-amine complexes</i>	137
<i>Figure II-3: InfraRed spectra of third phases formed after extraction of 1.2 mol/L of aqueous hydrochloric acid with 20% v/v TOA in decane (dotted line) and commercial 3-HP solution with pure TOA (bold line)</i>	138
<i>Figure II-4 : Experimental extraction yields (A) and pH at equilibrium (B) as a function of initial acid concentration (symbols). Calculation with Model 0 assuming a (1 :1) stoichiometry for the acide:amine complex (solid lines)</i>	140
<i>Figure II-5: Experimental yields (A) and pH (B) as a function of initial TOA concentration (symbols) with the calculations of Model 0 (dotted lines), Model 1 (dashed lines) and Model 2 (solid lines)</i>	141
<i>Figure II-6: Experimental yields (A) and pH (B) as a function of initial acid concentration (symbols) with simulations of Model 1 (dashed lines) and Model 2 (solid lines)</i>	142
<i>Figure II-7: Apparent equilibrium coefficient of complexation as a function of the initial concentration of amine</i>	143
<i>Figure II-8: Model 1 (A) and Model 2 (B) predicted yields as a function of experimental yields for the calibration (filled circles) and the validation (open circles) experiments</i>	145
<i>Figure II-9: Extrapolation of Model 1 (A) and Model 2 (B) predictions in the whole range of acid and amine concentrations tested, with superimposed experimental measurements: calibration (filled circles) and validation (open circles)</i>	146
<i>Figure III-1: Process flow diagram of the membrane-assisted reactive extraction experimental set-up</i>	159

<i>Figure III-2: Dimensionless concentration of 3-HP in the aqueous phase over time for different initial acid concentrations</i>	160
<i>Figure III-3: Dimensionless concentration of 3-HP in the aqueous phase over time for different initial pH (initial 3-HP concentration: 1 g/L)</i>	161
<i>Figure III-4: Dimensionless concentration of 3-HP (A) and pH evolution in the aqueous phase (B) over time for different initial Cl<sup>-</sup>/3-HP molar ratios (initial concentration of 3-HP= 1 g/L)</i>	162
<i>Figure III-5: Dimensionless concentration of 3-HP (A) and pH evolution in the aqueous phase (B) over time for different initial H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/3-HP molar ratios (initial concentration of 3-HP = 1 g/L)</i>	163
<i>Figure III-6: Concentrations as a function of time in the case of the presence of potassium biphosphate (A) and potassium chloride (B) with initial KCl/3-HP and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/3-HP molar ratios of 1/1 and 1/2 respectively (initial 3-HP concentration = 1 g/L)</i>	164
<i>Figure III-7: Concentrations in aqueous phase as a function of time in the presence of potassium chloride with a molar ratio 3-HP/KCl of 1/10 (amines = octylamine + dioctylamine)</i>	166
<i>Figure III-8: dimensionless 3-HP concentration in the aqueous phase over time in the presence (8mg/L) and absence of BSA</i>	167
<i>Figure IV-1: Recovery yields for back-extraction experiments using salts in stoichiometric proportions or 20-fold excess of salt at 25°C for 1 g/L of 3-HP initially in the organic phase</i>	180
<i>Figure IV-2: Simplified process diagram of extraction and back-extraction using sodium hydroxide</i>	182
<i>Figure IV-3: Evolution of 3-HP concentration in the aqueous phase during extraction and back-extraction (10 g/L 3-HP in the aqueous phase and 8 g/L 3-HP in the organic phase initially for extraction and back-extraction respectively)</i>	183
<i>Figure IV-4: recovery yield (A) and 3-HP concentration in the recovery phase (B) after diluent swing back-extraction as a function of the volume fractions of hexane and aqueous/organic volume ratios</i>	184
<i>Figure IV-5: Simplified process diagram of extraction and back-extraction using diluent swing with a volatile counter solvent such as hexane</i>	185
<i>Figure IV-6: extraction yield as a function of the initial 3-HP concentration in the aqueous phase and extraction temperature (solid lines for clarity purpose only)</i>	186
<i>Figure IV-7: Van't Hoff plot of the physical partition coefficient (m) of 3-HP between water and decanol</i>	187
<i>Figure IV-8: Van't Hoff plot of the complexation constant between 3-HP initially present in aqueous phase and TOA in organic phase</i>	188
<i>Figure IV-9: Extraction yield of a 5 g/L 3-HP solution calculated from the thermochemical parameters (extrapolated above 140°C)</i>	189
<i>Figure IV-10: Simplified process diagram of extraction and back-extraction using temperature swing with a purification step with cold water in-between</i>	189

<i>Figure V-1: Conceptual view of the boundary layer model with concentration profiles</i>	204
<i>Figure V-2: Process and instrumentation diagram of the plant used for extraction and back-extraction</i>	211
<i>Figure V-3: Organic phase viscosity as a function of 3-HP concentration (25°C)</i>	213
<i>Figure V-4: Experimental and model results of 3-HP extraction for different initial concentrations and experimental devices</i>	214
<i>Figure V-5: Experimental and predicted concentration evolution in the three phases with gradual 3-HP addition in the extracted phase during the first 370 minutes at 2.5 g/L/h</i>	215
<i>Figure V-6: Predicted and experimental pH evolution in the extracted phase with gradual 3-HP addition at 2.5 g/L/h (A) and calculated and measured amount of 3-HP in the system against time (B)</i>	215
<i>Figure V-7: Concentration evolution in the extracted and the back-extraction phases in the steady-state experiment conditions (dotted line: linear regression to calculate the slope)</i>	217
<i>Figure V-8: Concentration evolution with 3-HP gradual addition at 2.5 g/L/h in the extracted (circles) and back-extraction (triangles) phases using a complex medium containing glucose, urea and salts (open symbols) compared to pure water (closed symbols)</i>	218
<i>Figure V-9: Comparison of the amount of salts introduced in the complex medium and recovered in the back-extraction phase at the end of the experiment (A) and kinetics of salts release in the back-extraction phase</i>	219
<i>Figure V-10: Pressure difference between both phases along time at the extraction side (A) and at the back-extraction side (B) when using 7.8 g/L yeasts and concentration evolution with 3-HP gradual addition at 2.5 g/L/h in the extracted (circles) and back-extraction (triangles) phases using an aqueous phase containing yeasts (grey 2.2 g/L, white 7.8 g/L) compared to pure water (black symbols) (C)</i>	220
<i>Figure V-11: 3-HP concentrations evolution with 3-HP gradual addition at 2.5 g/L/h in the extracted (circles) and back-extraction (triangles) phases and glucose concentration in the extracted phase (closed diamonds) using a whole fermentation broth (open symbols) compared to pure water (closed symbols) (A) and nitrogen concentration in the extracted and the back-extraction phases at the end of the experiment (4 days) (B)</i>	221
<i>Figure V-12: pH evolution in the extracted phases of the experiments performed with gradual 3-HP addition at 2.5 g/L/h (1 pure water; 2 pure water with yeast 7.8 g/L; 3 complex medium; 4 complex medium + yeasts 4 g/L)</i>	222
<i>Figure V-13 : Evolution de la concentration en 3-HP dans la phase aqueuse pour différentes concentrations initiales en mode extraction simple (symboles : points expérimentaux, lignes : modèles)</i>	229
<i>Figure V-14 : variation de la concentration en TOA (A) et en complexe (C) en phase organique et de la concentration en 3-HP non-dissocié (B) en phase aqueuse à proximité de l'interface liquide-liquide et dans le bulk correspondant au cours du temps (modèle) et variation de la viscosité (D) de la phase organique à proximité de l'interface et dans le bulk au cours du temps avec la moyenne logarithmique des deux (modèle)</i>	230

*Figure V-15 : variation du coefficient de transfert au cours du temps lors d'une extraction simple pour différentes concentrations initiales en 3-HP dans la phase aqueuse (modèle)* 231

*Figure V-16 : Evolution de la concentration en 3-HP dans la phase aqueuse au cours du temps lors d'un ajout graduel de 2,5 g/L/h avec extraction et désextraction dans le cas de la section 3.3. de la publication n°5 (symboles : points expérimentaux, lignes : modèles) (A) et évolution du coefficient de transfert pendant la même expérience (modèle) (B)* 232

*Figure V-17 : Abaque réalisé à l'aide du modèle permettant d'estimer la concentration stationnaire en 3-HP pour une alimentation de 2,5 g/L/h en 3-HP en fonction de la constante d'équilibre de complexation dans un solvant et la viscosité de ce solvant (symboles : positions de différents solvants dans cet espace)* 233

# **INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

Si les sources d'énergie renouvelables sont nombreuses (hydraulique, solaire, éolien, géothermie, biomasse), les sources de matières premières renouvelables sont constituées seulement par la biomasse. Il s'agit de la seule alternative matérielle renouvelable aux ressources fossiles. Son exploitation industrielle prend donc tout son sens dans un contexte général de recherche de durabilité et de réduction des émissions de gaz à effet de serre initiée par le protocole de Kyoto, suivi par l'amendement de Doha et les accords de Paris (COP21) [1,2].

De plus, l'immense majorité des produits consommés aujourd'hui (plastiques, médicaments, détergents, cosmétiques, caoutchoucs synthétiques, bitumes) est issue du pétrole dont seulement un peu moins de la moitié est dédiée à l'énergie. Les sources hydrocarbonées conventionnelles ralentissent au profit de ressources non-conventionnelles et bouleversent les équilibres actuels de la pétrochimie avec de fortes variations de prix des produits chimiques. Par exemple, la récente croissance de la production de gaz de schiste aux Etats-Unis a fortement influencé le marché des oléfines et plus globalement les marchés pétroliers. L'alimentation des vapocraqueurs par des charges à l'éthane issu des gaz de schiste plutôt que des charges naphta issu de la distillation du pétrole a très fortement augmenté la sélectivité du procédé en éthylène [3,4]. Ceci a eu pour effet de réduire drastiquement la formation de coproduits plus lourds tels que les butènes, molécules largement utilisées par ailleurs, laissant ainsi craindre la pénurie en particulier de butadiène et d'isobutène. En effet, le procédé initial permettait par exemple de fournir 96% de la production mondiale de butadiène. L'industrie s'est donc tournée vers la diversification des ressources avec entre autres le projet Biobutterfly (Michelin) pour produire du butadiène à partir de biomasse [5] ou encore le développement de Global Bioenergies pour la production d'isobutène biosourcé [6].

Les hydrocarbures sont également par nature des produits chimiques réduits et l'obtention de produits fortement oxydés de façon sélective peut s'avérer compliquée par la voie pétrochimique, qui n'est donc pas privilégiée. La biomasse est généralement constituée de composés plutôt oxydés comme des polyols, des esters ou des peptides et les structures moléculaires qui la composent sont différentes de celles des hydrocarbures. Par conséquent, sa valorisation permet d'obtenir certains composés non-obtenus à partir du pétrole ou difficilement synthétisables à des prix compétitifs. Dans ce contexte, la fameuse liste du Department of Energy (DoE) américain, établie en 2004 et présentée dans le Tableau 1, répertorie les molécules à synthétiser en priorité à partir de biomasse et elle contient des molécules oxygénées, majoritairement des acides carboxyliques et des polyols [7].



Tableau: Liste issue du premier criblage en 2004 du DoE des 28 composés non-gazeux d'intérêt à produire à partir de biomasse (classés par ordre alphanumérique, molécules prioritaires en gras) [7]

Acides carboxyliques (* acides aminés)		Polyols	Autres molécules oxygénées
<b>Acide 2,5-furandicarboxylique</b>	<b>Acide lévulinique</b>	<b>Arabinitol</b>	3-hydroxybutanone
<b>Acide 3-hydroxypropionique</b>	<b>Acide malique</b>	<b>Glycérol</b>	<b>3-hydroxybutyrolactone</b>
Acide aconitique	Acide malonique	Lévoglucosan	Furfural
<b>Acide aspartique*</b>	Acide propionique	<b>Sorbitol</b>	
Acide citrique	<b>Acide succinique</b>	<b>Xylitol</b>	
<b>Acide fumarique</b>	Acide xylonique		
<b>Acide glucarique</b>	Lysine*		
<b>Acide glutamique*</b>	Proline*		
<b>Acide itaconique</b>	Sérine*		
Acide lactique	Thréonine*		

Dans ce contexte favorable à l'utilisation de biomasse pour la production de molécules biosourcées, la chaire AgroBiotechnologies Industrielles (ABI) d'AgroParisTech et le département Conception et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture (CEPIA) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) ont co-financé le travail dans lequel s'inscrit cette thèse.

La première est une chaire d'enseignement et de recherche d'AgroParisTech détachée au Centre Européen de Biotechnologie et Bioéconomie (CEBB) sur le pôle de la bioraffinerie de Pomacle-Bazancourt près de Reims. Elle est financée par la région Champagne-Ardenne, le conseil départemental de la Marne et Reims Métropole. Il s'agit donc d'un pôle d'envergure régionale et internationale qui vise à développer de nouveaux matériaux et des molécules d'intérêt à partir d'agroressources et de produits issus de bioraffineries par le biais de la chimie verte, des biotechnologies et du génie des procédés et ainsi à créer de la valeur, maintenir et créer de l'emploi localement [8]. L'INRA est un institut d'échelle nationale et internationale dont l'intérêt principal est l'amélioration et la croissance du domaine agricole par la recherche scientifique et technologique, la génération de connaissances fondamentales et appliquées [9]. Son département CEPIA vise à créer et à diffuser de la connaissance dans le domaine de la transformation et de la valorisation des matières premières végétales ou animales ou des déchets [10]. La thèse s'inscrit dans un des deux défis du département concernant le « développement de procédés et systèmes de production pour des produits durables »[11].

Ainsi, que ce soit au niveau des performances environnementales, stratégiques, économiques, techniques ou parfois même sociales et géopolitiques, la nécessité de valoriser la biomasse semble faire consensus et une bioéconomie se met progressivement en place. Déjà en 2012, plus de 15% des grands intermédiaires issus de la première transformation de la biomasse agricole en France (amidon,

sucres, huiles etc.) étaient dédiés à la chimie et aux matériaux et, d'ici 2020, l'utilisation de produits biosourcés pourrait augmenter de plus d'un tiers [12]. En Europe, en 2011, moins de 10% des produits chimiques de base étaient issus de ressources renouvelables mais, d'ici 2030, 30% pourraient être biosourcés [13]. Ainsi, on estime que le marché mondial de produits biosourcés pourrait passer de 200 à 400 milliards de dollars entre 2015 et 2020 [14].

A partir de ressources issues de la biomasse, des transformations physico-chimiques et/ou biotechnologiques peuvent être mises en œuvre. Les premières emploient les techniques traditionnelles de la chimie en les appliquant à la biomasse, par exemple la transestérification des triglycérides pour obtenir des biodiesels et du glycérol. Les techniques thermo-chimiques comme la torréfaction, la pyrolyse, la gazéification et la liquéfaction hydrothermale sont aussi utilisées. A titre d'exemple, la Chaire ABI travaille sur la lévoglucosénone, molécule obtenue grâce à un procédé de pyrolyse rapide catalysée de biomasse lignocellulosique développé par Circa [15]. La deuxième catégorie de transformations regroupe les procédés biotechnologiques comme les conversions enzymatiques et les fermentations. Elle est utilisée depuis longtemps notamment pour la production d'éthanol dans les procédés de fermentation alcoolique. Les conversions biologiques possèdent comme avantage notamment d'opérer dans des conditions douces avec des sélectivités élevées en mettant en œuvre moins d'opérations unitaires, ce qui peut réduire l'investissement et les dépenses d'exploitation avec un coût à la tonne parfois 20 à 40% moins cher que les procédés chimiques traditionnels [16]. Elles mettent la plupart du temps en œuvre des microorganismes capables de métaboliser des composés issus de la biomasse. Grâce au développement des techniques de génie génétique et des bioprocédés, les biotechnologies industrielles, dites blanches, de transformation microbienne ou enzymatique de la biomasse en produits d'intérêt connaissent un très grand essor. L'intégration de procédés thermo-chimiques et biotechnologiques est également possible comme par exemple la fermentation de gaz de synthèse issu de gazéification de biomasse. Dans tous les cas, il convient d'obtenir des procédés de conversion puis de purification efficaces des molécules cibles. Dans ce contexte, l'intégration des procédés de production et de séparation, en particulier dans le domaine des biotechnologies, semblent un point prometteur d'amélioration.

Dans cette thèse, nous nous intéressons à un procédé de séparation appliqué à la récupération d'acide 3-hydroxypropionique biosourcé produit par voie biotechnologique, un acide carboxylique ciblé par le DoE comme l'une des molécules plate-forme prioritaires à produire à partir de la biomasse (Tableau 1). Le procédé étudié est l'extraction liquide-liquide réactive à membrane que nous souhaitons coupler à un bioréacteur accueillant la production de l'acide en vue de réaliser l'ensemble dans un procédé intégré. Cette intégration vise à extraire l'acide en même temps qu'il est produit afin de réduire l'inhibition due à son accumulation dans le milieu de bioconversion sur les microorganismes producteurs. Cette thèse s'intéresse en particulier à la détermination des mécanismes régissant la

réactivité et les transferts de matière lors de l'extraction réactive de l'acide 3-hydroxypropionique produit par bioconversion en contacteur membranaire en prenant en compte les problématiques liées à un procédé couplé à une bioconversion. On s'attachera également à proposer une modélisation mécanistique des phénomènes identifiés afin de pouvoir prédire le comportement du procédé d'extraction dans plusieurs configurations expérimentales.

Le manuscrit débute par un état de l'art, qui traite dans un premier temps de la production d'acides carboxyliques à partir de biomasse issus de succès industriels, avec la description de leurs procédés de séparation associés, puis dans un deuxième temps de l'acide 3-hydroxypropionique et ses méthodes de production en cours de développement. Enfin, l'intégration des procédés de bioconversion et extraction sera présentée en insistant sur l'extraction liquide-liquide réactive et les contacteurs membranaires. La stratégie expérimentale afin de répondre aux objectifs présentés ci-dessus sera détaillée dans un second chapitre détaillant par ailleurs les deux dispositifs expérimentaux utilisés de contacteur liquide-liquide à membrane. Le troisième chapitre présentera les résultats de l'étude expérimentale et de modélisation sous forme de cinq publications scientifiques traitant de la sélection de solvant et des impuretés des produits commerciaux (publication N°1), de la modélisation des équilibres liés à l'extraction réactive de l'acide (publication N°2), de l'influence des composés d'un milieu de bioconversion sur l'efficacité de l'extraction réactive en contacteur membranaire (publication N°3), des méthodes de récupération de l'acide après son extraction en phase organique (publication N°4), de la modélisation globale d'un procédé d'extraction réactive en contacteur membranaire couplé à la récupération (désextraction) en continu et enfin de la mise en œuvre du procédé dans des conditions mimant de façon la plus proche possible celles d'un procédé de bioconversion industrielle (publication N°5).

## Références

- [1] Kyoto Protocol, United Nation Framework Convention on Climate Change. (2014). [http://unfccc.int/kyoto\\_protocol/items/2830.php](http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php) (accessed June 1, 2017).
- [2] Accords internationaux en matière de lutte contre les changements climatiques, Conseil Européen Conseil de l'Union Européenne. (2016). <http://www.consilium.europa.eu/fr/policies/climate-change/international-agreements-climate-action/> (accessed June 1, 2016).
- [3] S. Latieule, Pétrochimie: Les Etats-Unis bouleversent l'ordre mondial, Info Chimie Magazine. n°519 (2013) 6–7.
- [4] M. Tourigny, Panorama 2014: Pétrochimie et chimie biosourcée, IFP Energies Nouvelles. (2014). <http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/Publications/Analyses-technico-economiques/Notes-de-synthese-Panorama/Panorama-2014> (accessed June 1, 2017).
- [5] Biobutterfly: création d'une filière de production de caoutchoucs synthétiques à partir de biomasse, ADEME. (2013). <http://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/biobutterfly.pdf> (accessed June 6, 2017).
- [6] Le procédé Isobutène, Global Bioenergies. (2017). <http://www.global-bioenergies.com/le-groupe/procede-isobutene-petrole-ressources-renouvelables/> (accessed June 6, 2017).
- [7] T. Werpy, G. Petersen, A. Aden, J. Bozell, J. Holladay, J. White, A. Manheim, D. Elliot, L. Lasure, S. Jones, M. Gerber, K. Ibsen, L. Lumberg, S. Kelley, Top Value Added Chemicals from Biomass, Volume 1—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, TN, 2004.
- [8] Chaire AgroBiotechnologies Industrielles by AgroParisTech, Chaire ABI. (2017). <http://www.chaire-abi-agroparistech.com/> (accessed June 6, 2017).
- [9] Qui sommes-nous?, INRA. (2017). <http://institut.inra.fr/> (accessed June 6, 2017).
- [10] Les départements INRA: Conception et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture, INRA. (2017). <http://www.cepia.inra.fr/> (accessed June 6, 2017).
- [11] CEPIA, Schéma stratégique 2016-2020, (2017).
- [12] Alcimed pour l'ADEME, Marchés actuels des produits biosourcés et évolutions à horizons 2020 et 2030 (synthèse publique), (2015). [http://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/2015\\_ademe-etude-marches-produits-biosources-synthese.pdf](http://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/2015_ademe-etude-marches-produits-biosources-synthese.pdf) (accessed June 6, 2017).
- [13] Star-Colibri, Joint European Biorefinery Vision for 2030, (2011).
- [14] B. Erickson, The Biobased Economy: Measuring Growth and Impacts, BiofuelsDigest. (2017). <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2017/02/28/the-biobased-economy-measuring-growth-and-impacts/> (accessed June 11, 2017).
- [15] G.R. Court, C.H. Lawrence, W.D. Raverty, A.J. Duncan, Method for converting lignocellulosic materials into useful chemicals, US 2012/0111714 A1, 2012.
- [16] S. Jenkins, Facts at your Fingertips: Fermentation, Chemical Engineering. 124, no.3 (2017) 38.

# **CHAPITRE I :**

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

# 1. Production et purification d'acides organiques produits de façon industrielle par voie biotechnologique

La production d'acides organiques biosourcés à grande échelle s'est particulièrement développée et se développe encore à l'heure actuelle. Deux grandes familles de procédés se distinguent : les voies biotechnologiques et les voies thermochimiques/catalytiques. Deux acides de fort intérêt industriel issus de procédés thermocatalytiques de conversion des sucres sont l'acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA) [1] et l'acide lévulinique [2]. Le premier principalement pour la production de polyéthylène furanoate, un bioplastique de substitution pour le polyéthylène téréphtalate (PET) [3], et le second en tant que molécule plate-forme pour la synthèse d'arômes, de plastifiants ou de solvants [4]. Le FDCA peut être purifié par cristallisation [1,5] tandis que l'acide lévulinique est récupéré après extraction par distillation ou filtration membranaire [2,6]. Leur production est actuellement à l'échelle pilote [3,7]. Cependant, nous nous intéressons ici plus particulièrement aux acides produits par voies biotechnologiques. Les exemples marquants sont traités dans cette partie en insistant sur les procédés de séparation associés. Tous les exemples sont tirés de cas ou de brevets industriels.

Les bioconversions sont les voies actuellement les plus développées pour la production d'acides organiques usuels à partir de biomasse dont certains depuis près d'un siècle. Nous détaillons ici trois cas d'importance industrielle, nommément l'acide citrique, l'acide lactique et l'acide succinique.

## 1.1. L'acide citrique

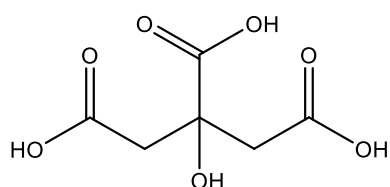


Figure 1 : formule topologique de l'acide citrique

Tableau 1 : Propriétés de l'acide citrique [8,9]

Numéro CAS	77-92-9
Masse molaire	192,13 g/mol
Point de fusion	153°C
Température de décomposition	175°C dégradation en acides aconitique, citraconique...
Masse volumique	1665 kg/m <sup>3</sup>
Solubilité dans l'eau	59,2 %wt (20°C)
pK <sub>A1</sub> ; pK <sub>A2</sub> ; pK <sub>A3</sub> (25°C)	3,13 ; 4,76 ; 6,40

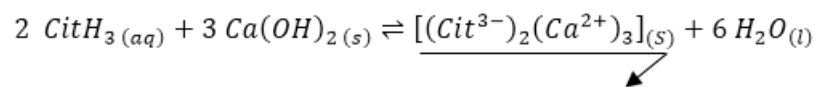
### 1.1.1. Production et usages de l'acide citrique

L'acide citrique (Figure 1) est actuellement l'acide biosourcé majoritaire sur le marché et l'un des plus anciens obtenu industriellement par voie biotechnologique avec une production commerciale dès 1923 [8]. En 2012, il est produit à hauteur de 1,6 Mt/an, intégralement par fermentation [9]. C'est un produit mature mais qui connaît encore une croissance de production soutenue autour de 3-5% par an. Il est synthétisé à l'échelle industrielle à partir de sucres (hydrolysats de maïs, mélasse, saccharose...) majoritairement par un champignon filamenteux, *Aspergillus niger*, capable de croître et de produire de l'acide citrique dans des conditions de pH faible (jusqu'à 2,5) dans un milieu

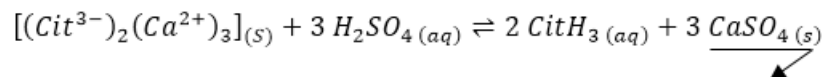
contenant les nutriments appropriés [10]. Son usage principal, à hauteur de 70-75%, est comme correcteur d'acidité et conservateur dans les produits alimentaires et les boissons. Il est également utilisé comme chélatant de cations métalliques et dans diverses formulations détergentes et cosmétiques [8,9].

### 1.1.2. Procédés de séparation pour la récupération d'acide citrique

Il existe deux procédés usuels de récupération industrielle de l'acide citrique à partir du milieu de fermentation. Le premier est le procédé classique dit « au gypse » [8]. Il consiste à neutraliser l'acide produit avec de la chaux (hydroxyde de calcium) en le faisant précipiter sous forme de citrate de calcium.



Le précipité solide est filtré et lavé à l'eau puis resuspendu dans de l'eau pure. Le mélange est ensuite acidifié avec de l'acide sulfurique de façon à régénérer l'acide citrique soluble dans l'eau et à former un sel insoluble de sulfate de calcium également appelé gypse.



Le milieu est ensuite filtré pour éliminer le sulfate de calcium. La solution d'acide citrique est traitée sur du charbon actif pour décoloration et retrait de certaines impuretés. Elle est ensuite désionisée pour enlever les traces de cations. L'acide citrique est alors concentré et purifié par évaporations et cristallisations successives. Au-dessus de 37°C, on formera un cristal d'acide citrique anhydre alors qu'en dessous de 37°C on obtiendra un cristal du monohydrate. Le solide est filtré et finalement séché avant le conditionnement.

Le deuxième procédé est l'extraction liquide-liquide réactive développée dans les années 70, adapté d'un procédé hydrométallurgique initialement utilisé dans l'industrie minière pour récupérer entre autres le nickel, le cuivre et le molybdène des solutions diluées issues des attaques acides des minerais [11]. La phase organique est constituée de tridodécylamine (= trilaurylamine) diluée dans du *n*-octanol et un mélange d'hydrocarbures saturés en C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub>. Les phases aqueuse et organique sont mises en contact à contre-courant. Quand l'acide citrique est extrait dans la phase organique, celle-ci est mise en contact avec une phase aqueuse à plus haute température pour récupérer l'acide et régénérer la phase organique d'extraction. La concentration en acide citrique dans cette nouvelle phase aqueuse peut être notablement supérieure à celle de la solution d'alimentation. Les phénomènes physico-chimiques liés à cette extraction liquide-liquide réactive seront détaillés dans la

partie dédiée (partie 3.2.2. de ce chapitre). La solution d'acide citrique est ensuite lavée avec l'hydrocarbure seul pour retirer les matières organiques solubles puis elle est envoyée vers une colonne d'adsorption chargée en charbon actif pour retirer les traces d'impuretés. La suite du procédé est identique au précédent. Ce procédé présente l'avantage par rapport au procédé « au gypse » de ne pas générer de déchets solides [8].

Il permet d'obtenir un acide citrique « Food-grade » approuvé par la Food and Drug Administration dans les conditions suivantes : *n*-octanol résiduel dans l'acide citrique < 16 ppm (i.e. mg/kg), hydrocarbure isoparaffinique résiduel < 0,47 ppm et tridodécylamine résiduelle < 0,1 ppm [12].

## 1.2. L'acide lactique

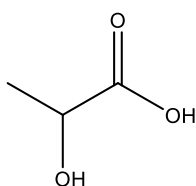


Figure 2 : formule topologique de l'acide lactique

Tableau 2 : Propriétés de l'acide lactique

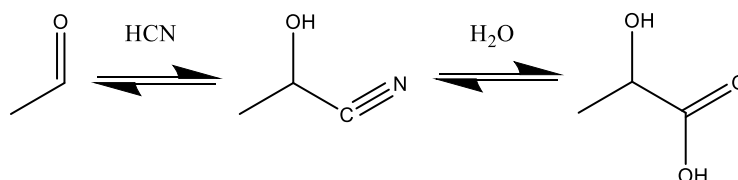
Numéro CAS	79-33-4
Masse molaire	90,08 g/mol
Point d'ébullition	122°C (12 torr)
Masse volumique (25°C)	1206 kg/m <sup>3</sup>
Solubilité dans l'eau	miscible
pK <sub>A</sub> (25°C)	3,86

### 1.2.1. Production et usages de l'acide lactique

L'acide lactique, de son nom IUPAC acide 2-hydroxypropionique (Figure 2), est produit à l'échelle industrielle de façon biotechnologique depuis plus récemment en comparaison de l'acide citrique. Il s'agit d'un isomère de position de l'acide 3-hydroxypropionique (3-HP) objet de notre étude, et à ce titre on lui portera une attention toute particulière. En 2013, la production annuelle mondiale se situait autour de 450 000 t, les deux plus gros producteurs mondiaux étant Natureworks, filiale de Cargill, et Purac, filiale de Corbion avec 180 000 et plus de 100 000 t/an, respectivement [13]. Son utilisation principale est pour la production d'acide polylactique (PLA) ainsi que comme ingrédient pour l'industrie alimentaire. Sa production implique traditionnellement la fermentation de différentes sources de sucres (mélasse, glucose, sucre de canne ou de betterave, sirop de maïs etc.) par des micro-organismes homolactiques tels que *Lactobacillus delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. leichmanii* ou *L. acidophilus* en présence de nutriments dont une partie est apportée par de l'extrait de levure ou de la peptone (sources d'azote notamment) [13]. Pour ce type de microorganismes, le pH du milieu de fermentation doit être régulé entre 5 et 6,5 par ajout d'une base (chaux, carbonate de calcium, ammoniacque, soude etc.) venant neutraliser l'acide lactique produit. C'est indispensable pour maintenir une bonne activité biologique du micro-organisme [13]. Cependant, depuis 2008, Cargill utilise une levure non conventionnelle, *Issatchenkia orientalis*, résistante aux acides organiques, aux pH acides et facilement cultivable dans des milieux simples sels-sucres de composition connue. En modifiant génétiquement cette levure hôte, ils ont pu développer un procédé de production d'acide



lactique à pH 3 avec une productivité élevée (> 5g/L/h) et des titres adéquats pour faciliter la récupération de l'acide (130 g/L). Ce procédé compétitif a remplacé leur procédé bactérien traditionnel sur leur site de Natureworks au Nebraska, Etats-Unis [14]. A titre de comparaison, la voie de synthèse pétrochimique se fait par addition du cyanure d'hydrogène sur l'acétaldéhyde suivie de l'hydrolyse du nitrile :



Contrairement à la voie biotechnologique qui produit souvent l'énantiomère L, la voie chimique conduit au mélange racémique et en 2013 ne représentait plus que 3% de la production mondiale [13].

### 1.2.2. Procédés de séparation pour la récupération de l'acide lactique

Dans le cas de l'acide lactique produit grâce à des bactéries lactiques, celui-ci est présent très majoritairement sous forme d'ions lactate étant donné que son pKa est de 3,86 et que le pH du milieu est régulé à une valeur supérieure à 5. La base généralement choisie pour réguler le pH permet d'obtenir du lactate de calcium et de pouvoir utiliser le procédé au gypse décrit précédemment pour l'acide citrique (cf. partie 1.1.1.2.) afin de retrouver la forme acide. Néanmoins, étant donné que le lactate de calcium est assez soluble dans l'eau (85 g/L à 30°C dans l'eau pure [15]), il ne peut pas être séparé par filtration ni lavé. Après acidification par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et filtration du sulfate de calcium, l'acide lactique se retrouve dans le milieu complexe de fermentation et un passage sur charbon actif et résines échangeuses d'ions est suffisant pour produire un acide lactique dit « technical grade » correspondant à une faible pureté [16]. Dans un bioréacteur à pH 3 avec des levures modifiées génétiquement, le taux de dissociation de l'acide se situe seulement autour de 15%. Dans ce cas, les quantités de base pour la régulation de pH pendant la production et d'acide sulfurique pour la reprotonation consécutive sont drastiquement réduites. La production de gypse est donc par conséquent beaucoup plus limitée, ce qui explique le choix de cette implémentation industrielle.

Pour des applications de l'acide lactique dans le domaine des polymères, la purification doit être plus poussée car des composés contenant des fonctions réactives (acides, sucres, protéines etc.) peuvent entrer en compétition avec l'acide lactique pour la polymérisation et défavoriser la monodispersité, la longueur de chaîne et le rendement. Historiquement, le premier procédé utilisé impliquait l'estérification de l'acide par un alcool à chaîne courte comme le méthanol ou l'éthanol. L'ester était ensuite récupéré par distillation puis hydrolysé pour reformer l'acide lactique et l'alcool qui était éliminé par évaporation puis recyclé [16].

Dans les années 90, Purac met au point un procédé utilisant l'extraction liquide-liquide réactive [17]. La solution d'acide lactique de pureté « technical grade » est mise en contact avec la phase extractante organique constituée d'Alamine 336 (un mélange commercial d'amines tertiaires avec des chaînes octyl et des chaînes décyl), d'octanol et d'isoparaffine. La phase organique est ensuite lavée à l'eau pour enlever les impuretés hydrosolubles. Le passage d'une partie de l'acide lactique dans l'eau est inévitable et donc cette phase aqueuse de lavage est recyclée vers l'étape d'évaporation avant l'échange d'ions. L'acide lactique contenu dans la phase organique est récupéré par mise en contact avec de l'eau chauffée entre 100 et 150°C à une pression entre 2 et 9 bar. La phase organique est ensuite lavée par une solution de soude puis à l'eau avant d'être recyclée pour l'extraction. La solution aqueuse d'acide lactique obtenue est concentrée par évaporation puis envoyée en distillation pour obtention du produit final. Le principal inconvénient de ce procédé est qu'il produit des quantités considérables de sulfate de calcium peu valorisable, environ 1 t pour 1 t d'acide lactique produit dans le cas du procédé traditionnel avec des bactéries lactiques, déchet dont l'élimination peut représenter 11% des coûts de production [18]. Le procédé Corbion Purac de production d'acide lactique est illustré sur la Figure 3.

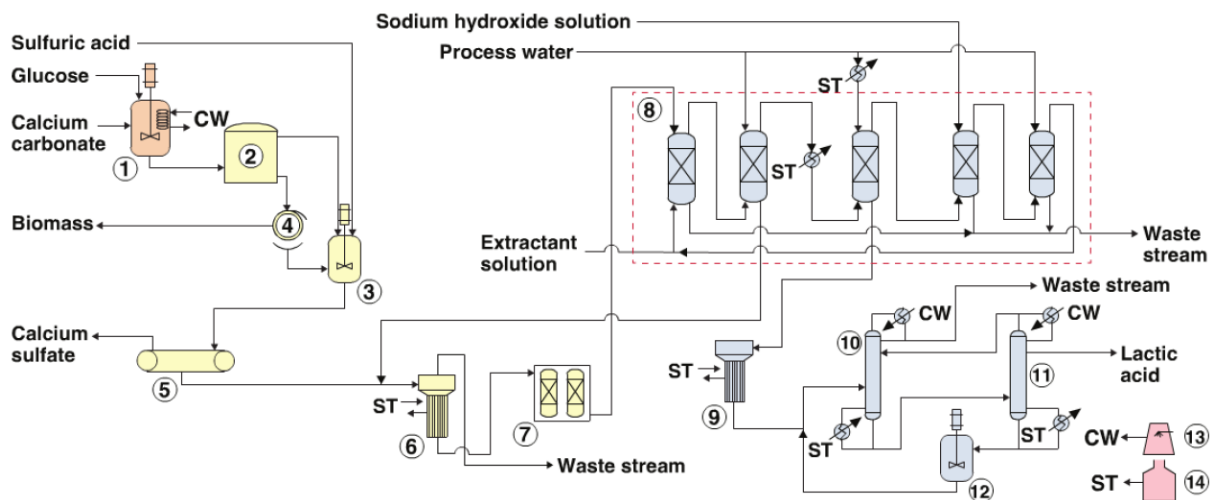


Figure 3 [18]: Procédé de production d'acide lactique à partir de glucose, semblable au procédé Purac avec 1. Fermenteur 2. Décanteur 3. Réacteur d'acidification 4. Filtre rotatif 5. Filtre à bande 6. Evaporateur 7. Résines échangeuses d'ions 8. Système d'extraction (5 colonnes : extraction liquide-liquide réactive, lavage de la phase organique à l'eau, récupération en phase aqueuse, lavage de la phase organique à la soude, puis à l'eau) 9. Evaporateur 10. Colonne d'élimination des composés légers 11. Colonne d'élimination des composés lourds 12. Réacteur d'hydrolyse 13. Tour de refroidissement 14. Chaudière à vapeur. CW eau de refroidissement (Cold Water). ST vapeur d'eau (STeam)

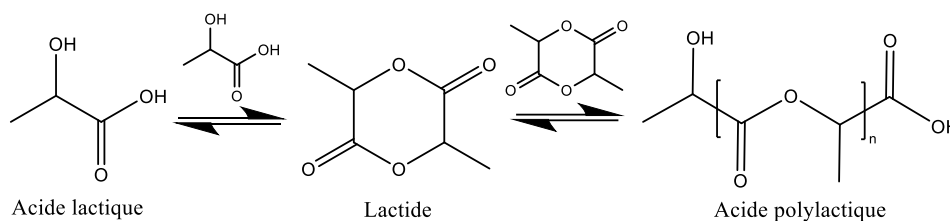
Au début des années 90, Cargill a proposé un procédé d'extraction liquide-liquide réactive permettant d'extraire directement les lactates [19]. La phase extractante est constituée de tridodécylamine, d'octanol et d'isoparaffine comme dans le cas de l'acide citrique. Afin de permettre d'extraire les lactates (et non l'acide lactique), l'extraction est réalisée sous une pression relativement

forte (au moins 3,5 bar) de dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) qui dans l'eau est en équilibre avec sa forme acide carbonique  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (acide très faible). Les résultats de cette extraction sont une phase aqueuse appauvrie en lactate et enrichie en bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ) et une phase organique enrichie en acide lactique. Les bicarbonates précipités (ex  $\text{NaHCO}_3$ ) sont récupérés, séchés et chauffés ce qui produit du  $\text{CO}_2$  qui peut être recyclé dans le procédé et des carbonates (ex  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) pouvant être utilisé comme régulateur de pH pour la fermentation. L'acide lactique est récupéré en phase aqueuse de la même manière que l'acide citrique avec une élévation de température et de pression. Ce procédé peut paraître attractif car il produit un acide lactique pur à partir d'une solution de lactates et évite l'utilisation d'acide sulfurique et la production de gypse. Mais selon Purac, les gains engendrés ne compenseraient pas le surplus de coût lié à l'utilisation de  $\text{CO}_2$  dans l'étape d'extraction [17].

Des procédés membranaires ont également été brevetés dès la fin des années 80 et le début des années 90 pour concentrer et récupérer l'acide lactique en utilisant l'électrodialyse et l'électrodialyse bipolaire. L'électrodialyse bipolaire est une technique membranaire permettant de générer d'une part l'acide à partir de son sel et d'autre part la base ayant servi à la production du sel. Une étude prometteuse a été présentée pour l'acide lactique par l'entreprise française Eurodia en 2002 qui stipule que le coût d'exploitation d'un procédé impliquant l'élimination des cellules par microfiltration, l'élimination des ions divalents (déméralisation), la concentration par électrodialyse, la conversion du lactate de sodium en acide lactique par électrodialyse bipolaire et la purification de l'acide par résines échangeuses d'ions revenait à 0,48€/kg [20]. Ce coût comprend le remplacement des consommables, la consommation d'énergie, la consommation de produits chimiques et d'eau, la dépréciation et les économies réalisées par la production concomitante d'hydroxyde de sodium. Il est à mettre en comparaison avec le prix de vente de l'acide lactique à l'époque situé entre 1,4 et 1,8€/kg et le fait qu'en 2015 les matières premières représentent près de la moitié du coût de production dans le procédé Corbion Purac aux Etats-Unis [18].

### 1.2.3. Procédé d'obtention de l'acide polylactique

La production d'acide lactique de NatureWorks est intégralement effectuée sur un seul site aux Etats-Unis (Nebraska) afin de réaliser d'importantes économies d'échelle. En effet, sa production d'acide lactique est entièrement dédiée à la production d'acide polylactique (PLA), un polymère biodégradable et renouvelable qui, pour concurrencer les plastiques issus du pétrole (polyéthylène téréphtalate, polystyrène, polypropylène...), doit être relativement bon marché. La production de PLA est la plus importante source de consommation d'acide lactique et il trouve des applications dans les emballages notamment alimentaires. Il est produit par polymérisation par ouverture de cycle du lactide précédemment synthétisé par dimérisation de l'acide lactique (autocondensation) :



### 1.3. L'acide succinique

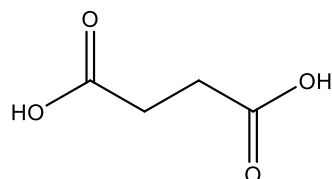


Figure 4 : Formule topologique de l'acide succinique

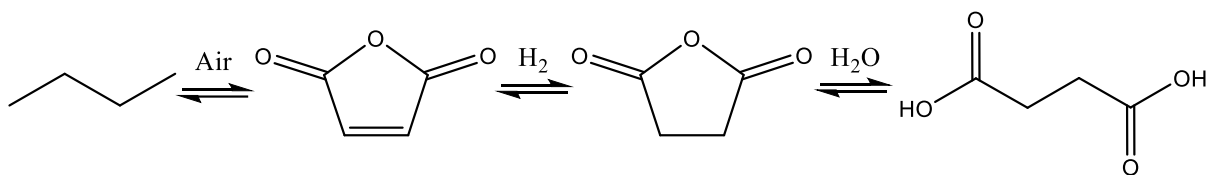
Tableau 3 : Propriétés de l'acide succinique [21–23]

Numéro CAS	110-15-6
Masse molaire	118.09 g/mol
Point de fusion	188°C
Point d'ébullition	A 235°C se déshydrate en anhydride succinique qui se vaporise
Masse volumique (25°C)	1572 kg/m <sup>3</sup>
Solubilité dans l'eau	2.8%wt (0°C) ; 5.8%wt (20°C) ; 7.71%wt (25°C) ; 54.8 %wt (100°C)
pK <sub>A1</sub> ; pK <sub>A2</sub> (25°C)	4.16 ; 5.61

#### 1.3.1. Production et usages de l'acide succinique

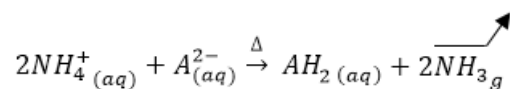
L'acide succinique est un diacide carboxylique aliphatique à 4 atomes de carbones (Figure 4). Il a une multitude d'applications mais son coût de production élevé par les procédés traditionnels de la pétrochimie a limité son utilisation principalement à l'industrie pharmaceutique et comme additif dans l'agroalimentaire ou la formulation (revêtements, peintures) [24]. Ces dernières années, la production industrielle d'acide succinique biosourcé par voie biotechnologique de façon compétitive a été lancée par de nombreux acteurs, par exemple : Bioamber au Canada avec une capacité de 30 000 t/an [24], Reverdia, « joint-venture » entre DSM et Roquette Frères, en Italie avec une capacité de 10 000 t/an [25], Myriant aux Etats-Unis avec une capacité de 13 600 t/an [26] et Succinity, « joint-venture » entre BASF et Corbion Purac, en Espagne avec une capacité de 10 000 t/an [27]. Ces deux dernières entreprises utilisent un procédé fermentaire impliquant des bactéries, respectivement *Escherichia coli* et *Basfia succiniciproducens*, transformant des sources de sucres ou du glycérol. Le pH peut être régulé avec les bases conventionnelles mais l'ammoniac est préféré. Bioamber a tout d'abord mis au point son procédé avec l'organisme de recherche privé Agro-Industrie Recherche et Développement (ARD) en utilisant également la bactérie *E. coli* génétiquement modifiée. Une unité de démonstration de 3000 t/an a été implantée en 2009, sur le site de la bioraffinerie de Pomacle-Bazancourt où la chaire ABI est installée. Cependant, avant la construction de son usine en Ontario (Canada), elle s'est alliée avec l'entreprise Cargill pour tirer parti de sa levure hôte génétiquement modifiée pour produire de l'acide succinique, capable de réaliser cette production à un pH faible tout en maintenant un rendement et une productivité élevés [24]. Reverdia utilise également une levure (*Saccharomyces cerevisiae*)

génétiqumment modifiée pour produire l'acide succinique à pH 3. Ils stipulent qu'opérer à pH faible constitue un avantage car le procédé est ainsi plus robuste du fait de la réduction des risques de contamination bactérienne à pH faible, de la diminution de la production de déchets salins et de la simplification de la purification tout en réduisant l'empreinte carbone [28]. Bioamber précise que l'utilisation de levures, de par la diminution du risque de contamination et une meilleure résistance de ces micro-organismes au cisaillement dû à l'agitation et à la variabilité du procédé, leur permet d'utiliser des fermenteurs plus grands et de conception standardisée ce qui réduit également les coûts d'investissement [24]. L'acide succinique pétrosourcé quant à lui est produit principalement par oxydation catalytique à l'air du *n*-butane en anhydride maléique suivie par une hydrogénation en anhydride succinique et de son hydrolyse en acide succinique [29] :



### 1.3.2. Procédés de séparation pour la récupération d'acide succinique

Comme dans le cas des autres acides carboxyliques, le type de procédé utilisé dépend de la méthode de production. Par voie bactérienne, l'acide peut être neutralisé pendant la bioconversion par de l'ammoniaque et il se retrouve alors dans le milieu de bioconversion sous forme de succinate d'ammonium divalent. Pour sa première génération de procédé bactérien, Bioamber proposait la méthode de purification suivante [30] : l'ammoniac étant un produit très volatile, il est possible de dissocier thermiquement le sel d'ammonium en produisant un flux gazeux d'ammoniac d'une part et en régénérant l'acide succinique d'autre part :



Cette étape se réalise à une température supérieure à 100°C et en surpression. Conjointement, une grande partie de l'eau est évaporée de sorte à ne garder que 20% du volume initial et l'acide succinique est ainsi concentré à température élevée. La grande variation de la solubilité de l'acide succinique dans l'eau en fonction de la température est mise à profit pour une étape de cristallisation à froid (Tableau 3). L'acide succinique cristallisé est récupéré puis séché. Une étape de décoloration au charbon actif peut être ajoutée avant le craquage thermique du sel d'ammonium et l'ammoniac peut être recyclé pour la neutralisation du milieu. Un schéma correspondant à ce procédé est présenté en Figure 5.

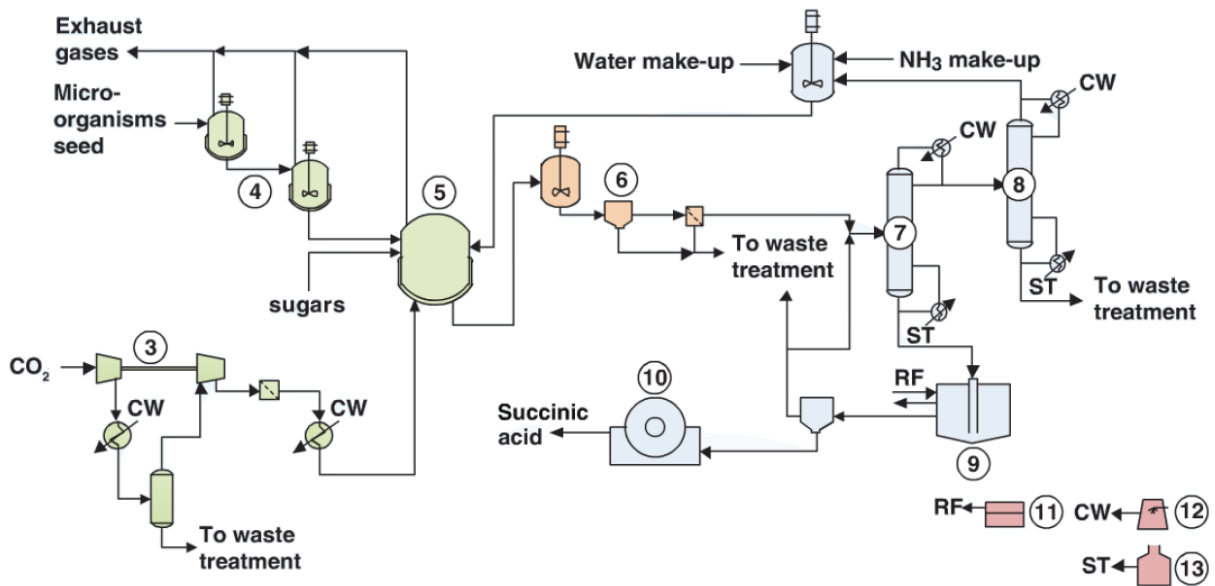


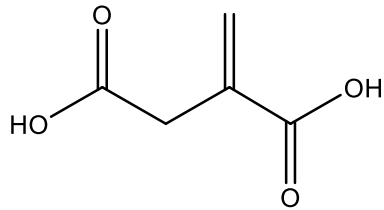
Figure 5 (adaptée de [31] et [32]) : Procédé de production d'acide succinique à partir de sucres similaire au premier procédé envisagé par Bioamber 3. Compresseurs 4. Production des microorganismes 5. Fermenteur 6. Centrifugation des cellules 7. Colonne de concentration et salt-splitting 8. Colonne de récupération de l'ammoniaque 9. Cristallisation 10. Séchage 11. Unité de réfrigération 12. Tour de refroidissement 13. Chaudière à vapeur. CW eau de refroidissement (Cold Water). ST vapeur d'eau (STeam)

Myriant propose, à la place du craquage thermique, d'utiliser des résines échangeuses d'ions cationiques fortes pour remplacer les ions ammonium par des ions hydronium  $H^+$  afin de reprotonner l'acide succinique. La résine est régénérée par une solution d'acide sulfurique qui libère les ions ammonium de la résine en les échangeant de nouveau contre des ions  $H^+$  tout en générant un effluent de sulfate d'ammonium qui est par la suite cristallisé et valorisé en tant que fertilisant. L'acide succinique est également récupéré par cristallisation. Une étape de décoloration par nanofiltration est également proposée [33].

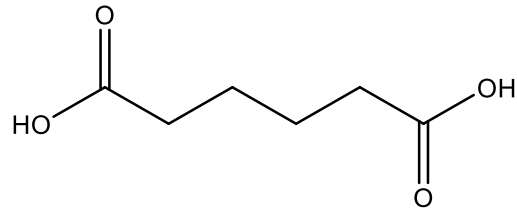
Les procédés de production impliquant des levures génétiquement modifiées conduisent à des milieux de fermentation avec des pH inférieurs à 3 dans lesquels l'acide succinique est déjà sous forme protonnée. Reverdia, après retrait des micro-organismes par centrifugation, propose donc de le concentrer directement par évaporation puis de le cristalliser. Le solide est récupéré puis dissous et recristallisé [28].

Aux côtés des trois acides dont les procédés d'obtention ont été détaillés ci-dessus, d'autres acides organiques sont envisagés pour une production par voie biotechnologique. L'acide itaconique (CAS 97-65-4) par exemple, diacide carboxylique comportant une insaturation en chaîne latérale, est produit industriellement depuis 1955 par fermentation avec *Aspergillus terreus*, un champignon

capable de produire l'acide à pH 2,1 [34]. Bien d'autres acides d'intérêt sont en voie de commercialisation comme l'acide adipique (CAS 124-04-9), diacide carboxylique linéaire à 6 carbones utilisé dans les polymères, notamment le nylon, et qui peut être produit à pH faible également [24]. Tous deux sont purifiés de manière similaire à l'acide succinique. On voit donc que la grande tendance dans les productions biotechnologiques d'acides organiques industrialisables est l'utilisation de micro-organismes relativement tolérants aux pH faibles pour obtenir des milieux de fermentation contenant l'acide sous forme non-dissociée.



*Figure 6 : Formule topologique de l'acide itaconique*



*Figure 7 : Formule topologique de l'acide adipique*

## Références

- [1] E. Mazoyer, A.S. Vagueiro De Sousa Dias, B. McKay, H.J. Baars, V.P.C. Vreeken, G.J.M. Gruter, D.L. Sikkenga, Process for the preparation of 2,5-furandicarboxylic acid, WO 2014163500 A1, 2014.
- [2] R.F.M.J. Parton, M.P.W.M. Rijkers, J.A. Kroon, Continuous production of furfural and levulinic acid, EP 2 537 841 A1, 2012.
- [3] Synviva press release, Avantium. (2017). <https://www.avantium.com/press-releases/synviva-press-release> (accessed August 23, 2017).
- [4] Levulinic Acid Is A Recognized Versatile Platform Molecule To Address A Large Market Potential, GFBiochemicals. (2017). <http://www.gfbiochemicals.com/products> (accessed August 23, 2017).
- [5] A.R. Martins Guerreira Rocha Almeda, Z. Martinus Mathilda Pieter, A.S. Vagueiro De Sousa Dias, Process for the preparation of a purified acid composition, WO 2016195499 A1, 2016.
- [6] H.D. Hoving, A. De Rijke, G.M.C. Wagemans, R.F.M.J. Parton, K. Babic, Process for the separation of a bio-based product by distillation and permeation, WO2013034763 A1, 2013.
- [7] Bringing Biobased Levulinic Acid To The Market Through Technology Innovation, GFBiochemicals. (2017). <http://www.gfbiochemicals.com/technology> (accessed August 23, 2017).
- [8] R. Lopez-Garcia, Citric acid, in: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 2010.
- [9] F.H. Verhoff, Citric Acid, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2014.
- [10] M. Berovic, M. Legisa, Citric acid production, in: Biotechnology Annual Review, Elsevier, 2007: pp. 303–343. doi:10.1016/S1387-2656(07)13011-8.
- [11] National Research Council, Separation and Purification: Critical Needs and Opportunities, The National Academies Press, Washington, DC, 1987. doi:10.17226/19188.
- [12] Food and Drug Administration, Title 21, Chapter I, Subchapter B, Part 173, §173.280 Solvent extraction process for citric acid, Electronic Code of Federal Regulations. (2017). [https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-id?SID=784ecd064964685173dd7a4b6f194b18&mc=true&node=se21.3.173\\_1280&rgn=div8](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-id?SID=784ecd064964685173dd7a4b6f194b18&mc=true&node=se21.3.173_1280&rgn=div8) (accessed June 7, 2017).
- [13] J.N. Starr, G. Westhoff, Lactic Acid, in: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (Ed.), Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2014: pp. 1–8. [http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a15\\_097.pub3](http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a15_097.pub3) (accessed November 22, 2016).
- [14] C. Miller, A. Fosmer, B. Rush, T. McMullin, D. Beacom, P. Suominen, Industrial Production of lactic acid, in: Comprehensive Biotechnology, 2nd ed., Elsevier, 2011: pp. 179–188.
- [15] M. Vavrusova, R. Liang, L.H. Skibsted, Thermodynamics of Dissolution of Calcium Hydroxycarboxylates in Water, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 62 (2014) 5675–5681. doi:10.1021/jf501453c.
- [16] R. Datta, Hydroxycarboxylic acids, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. (2004). <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471238961.0825041804012020.a01.pub2/full> (accessed November 22, 2016).
- [17] B.I. Veldhuis-Stribos, J. Van Breugel, W.J. Groot, B.M. Dierdorp, Continuous process for preparing lactic acid, WO 01/27064 A1, 2001.
- [18] S. Jenkins, Technology Profile: Lactic Acid Production via Glucose Fermentation, Chemical Engineering. 122, no.8 (2015) 37.
- [19] A.M. Baniel, A.M. Eyal, J. Mizrahi, B. Hazan, R.R. Fisher, J.J. Kolstad, B.F. Stewart, Lactic acid production, separation and/or recovery process, US 5,510,526, 1996.
- [20] M. Bailly, Production of organic acids by bipolar electro dialysis: realizations and perspectives, Desalination. 144 (2002) 157–162.



- [21] C. Fumagalli, Succinic acid and succinic anhydride, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. (2006).  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471238961.1921030306211301.a01.pub2/full> (accessed November 22, 2016).
- [22] B. Cornils, P. Lappe, U. by Staff, Dicarboxylic Acids, Aliphatic, in: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (Ed.), Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2014: pp. 1–18.  
[http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a08\\_523.pub3](http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a08_523.pub3) (accessed November 22, 2016).
- [23] D.L. Lide, CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84th ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 2003.
- [24] Bioamber Inc., Annual Report on Form 10-K, United States Securities and Exchange Commission, 2014.
- [25] Growing Our Leadership Position in the Bio-succinic Market, Reverdia. (2015).  
<http://www.reverdia.com/technology/commercial-plants/> (accessed August 22, 2017).
- [26] Integrated Acid: A Commercial Reality, Myriant. (2017).  
<http://www.myriant.com/platform/operating-plants.cfm> (accessed August 22, 2017).
- [27] Succinity produces first commercial quantities of biobased succinic acid, BASF. (2014).  
<https://www.basf.com/en/company/news-and-media/news-releases/2014/03/p-14-0303-ci.html> (accessed August 22, 2017).
- [28] Biosuccinium Technology, Reverdia. (2015). [www.reverdia.com/technology/technology-overview](http://www.reverdia.com/technology/technology-overview) (accessed August 22, 2017).
- [29] J. Lee, M.-S. Han, S. Choi, J. Yi, T. Lee, S. Lee, Organic Acids: Succinic and Malic Acids, in: Comprehensive Biotechnology, 2nd ed., Elsevier, 2011: pp. 149–161.
- [30] O.S. Fruchey, B.T. Keen, B.A. Albin, N.A. Clinton, D. Dunuwila, B.D. Dombek, Processes for producing succinic acid from fermentation broths containing diammonium succinate, US8246792 B2, 2012. <http://www.google.com/patents/US8246792> (accessed August 24, 2017).
- [31] Technology profile: Production of Bio-based Succinic Acid, Chemical Engineering. 121, n°4 (2014) 37.
- [32] Technology Profile: Bio-based adipic acid, Chemical Engineering. 121, n°6 (2014) 29.
- [33] S.J. Gerberding, R. Singh, Purification of succinic acid from the fermentation broth containing ammonium succinate, WO 2011082378 A2, 2011.
- [34] K. Kirimura, Y. Honda, Y. Hattori, Gluconic and itaconic acids, in: Comprehensive Biotechnology, 2nd ed., Elsevier, 2011: pp. 143–147.



## 2. L'acide 3-hydroxypropionique

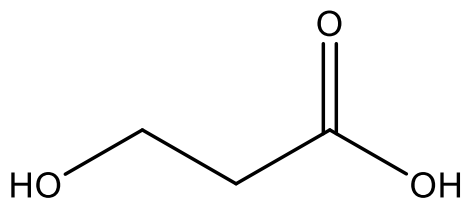


Figure 8 : formule topologique de l'acide 3-hydroxypropionique

Tableau 4 : propriétés de l'acide 3-hydroxypropionique

Numéro CAS	503-66-2
Masse molaire	90,08 g/mol
Point d'ébullition	se décompose en acide acrylique
Masse volumique	1,0474 kg/m <sup>3</sup>
Solubilité dans l'eau	Très soluble, certainement miscible
pKa (25°C)	4,51

L'acide 3-hydroxypropionique, usuellement raccourci en 3-HP, est un petit acide carboxylique linéaire à 3 atomes de carbone avec une fonction hydroxyle en position terminale (Figure 8). C'est ainsi un isomère de position de l'acide lactique mais contrairement à celui-ci le 3-HP n'est pas chiral. Si on omet les variantes « propanoïque », il est également connu sous les noms d'acide  $\beta$ -hydroxypropionique et d'acide hydracrylique. Par effet inductif, la présence du groupe hydroxyle en position  $\beta$  rend le 3-HP ( $pK_A=4,51$ ) légèrement plus fort que l'acide propionique ( $pK_A=4,87$ ) mais plus faible que l'acide lactique ( $pK_A=3,86$ ) où le groupe hydroxyle est en position  $\alpha$ . Les données sur les propriétés physicochimiques du 3-HP sont extrêmement parcellaires. Cela vient certainement du fait que les hydroxyacides « purs » s'oligomérisent (autocondensation) en libérant de l'eau à l'image de l'acide lactique qui n'existe sous forme monomère qu'à hauteur de 32% lorsqu'il est « pur » ou bien que le 3-HP se déshydrate spontanément sous l'action de la chaleur en formant l'acide acrylique à « ébullition » [1–3]. La plupart des données accessibles sont erronées et présentent celles d'isomères (formate de 2-hydroxyéthyle sur la base de données SciFinder) ou d'autres composés proches (3-hydroxypropionate d'éthyle sur SciFinder ou  $\beta$ -propiolactone) en faisant faussement référence au 3-HP. Il s'agit d'un liquide visqueux, qualifié de sirop. C'est un composé hydrophile du fait de la présence d'un groupe hydroxyle et d'un groupe carboxyle sur une petite chaîne propyle, de ce fait il est très soluble dans l'eau et selon toute vraisemblance miscible avec l'eau. La présence des deux fonctions chimiques rend ce composé très réactif et facilement transformable en une multitude d'autres composés d'intérêt. On parle ainsi de molécule plate-forme ou synthon. Nous présentons tout d'abord la plate-forme de l'acide 3-hydroxypropionique puis ses méthodes de production.

### 2.1. Le 3-HP comme synthon

L'intérêt du 3-HP réside principalement dans ses multiples molécules dérivées et comme monomère facile à polymériser du fait de son caractère bifonctionnel. Les principales molécules d'intérêts obtenues à partir du 3-HP apparaissent en Figure 9.

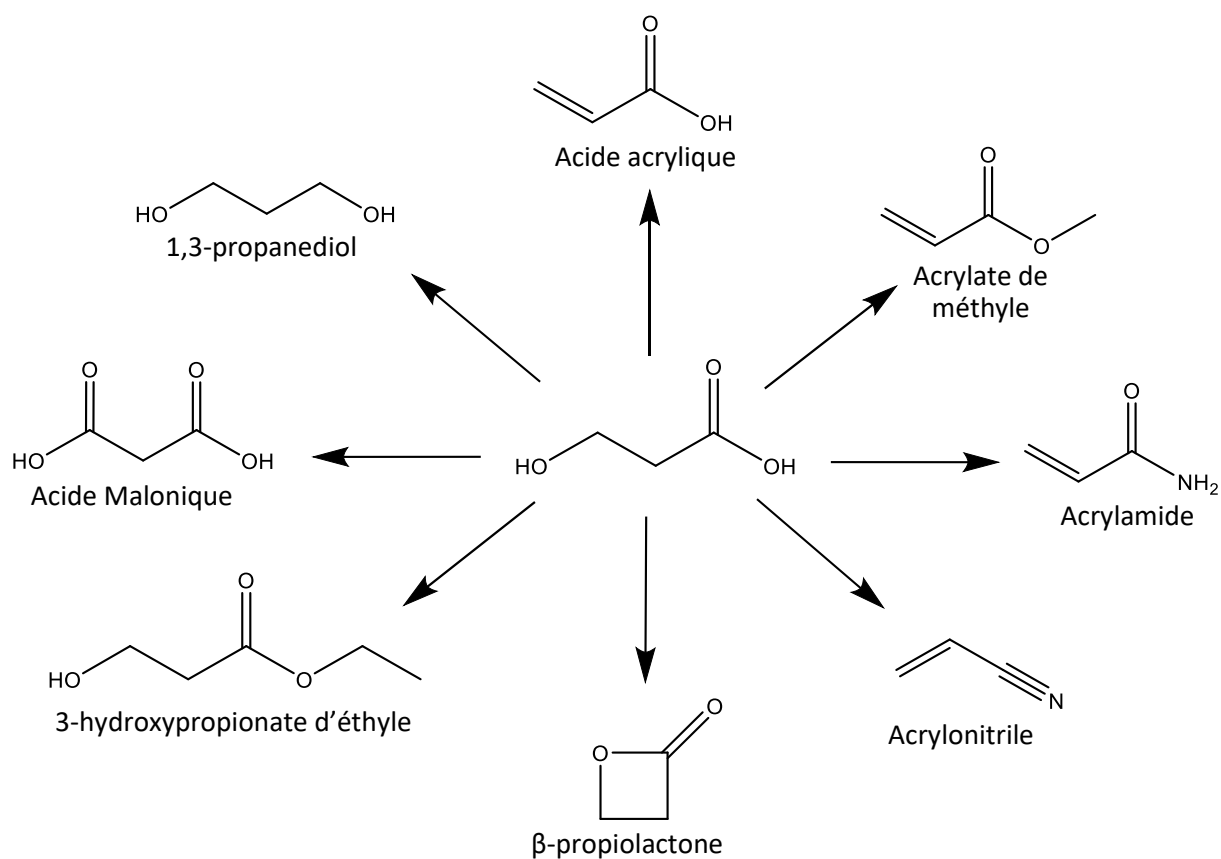
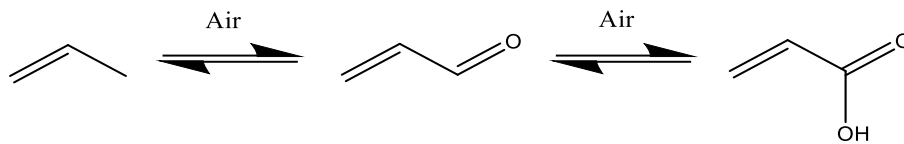


Figure 9 : Plate-forme de l'acide 3-hydroxypropionique (adaptée de [4])

La production de 3-HP a surtout et avant tout attiré un intérêt industriel afin d'obtenir de l'acide acrylique biosourcé avec plusieurs projets industriels comme Cargill et Novozyme dès 2008 (ajout de BASF en 2012 puis retrait en 2015), Dow Chemical et OPX Biotechnology suivi du rachat de OPX par Cargill en 2015 ou encore Perstorp AB. Il s'agit du dérivé de 3-HP avec le plus grand marché potentiel. En 2014 la demande s'élevait autour de 5,75 Mt/an et les prévisions pour 2022 chiffrent une demande autour de 8,75 Mt/an pour un marché global de près de 22,6 milliards de dollars [4]. La raison de l'engouement autour du 3-HP est liée à la simplicité d'obtention de l'acide acrylique à partir de 3-HP, avec une déshydratation utilisant des catalyseurs tels que l'acide phosphorique en catalyse homogène entre 120 et 160°C et 3 à 8 bar [5] ou le dioxyde de titane en catalyse hétérogène à 180°C où le taux de conversion et la sélectivité sont proches de 100% [6]. La conversion du 3-HP en autres composés acrylés peut se réaliser de façon similaire [6].

D'autres procédés de production d'acide acrylique biosourcé ont été mis au point comme la déshydratation d'acide lactique qui se montre étonnamment difficile, ou la déshydratation oxydante catalytique du 1,3-propanediol [7] ou du glycérol. Par exemple, Arkema était sur le point de commercialiser un procédé catalytique à partir de glycérol en 2010. Cependant, l'augmentation du prix du glycérol par rapport à un procédé compétitif utilisant du propylène a été rédhibitoire et le procédé

ne dépassera pas l'échelle pilote pourtant fructueuse arguant que les clients n'étaient pas prêts à payer 15% de plus par rapport au procédé actuel pétrosourcé pour un produit biosourcé [8]. La voie actuelle de production d'acide acrylique est l'oxydation à l'air du propylène en deux étapes en passant par l'intermédiaire acroléine :



Le schéma de procédé correspondant est montré ci-dessous (Figure 10):

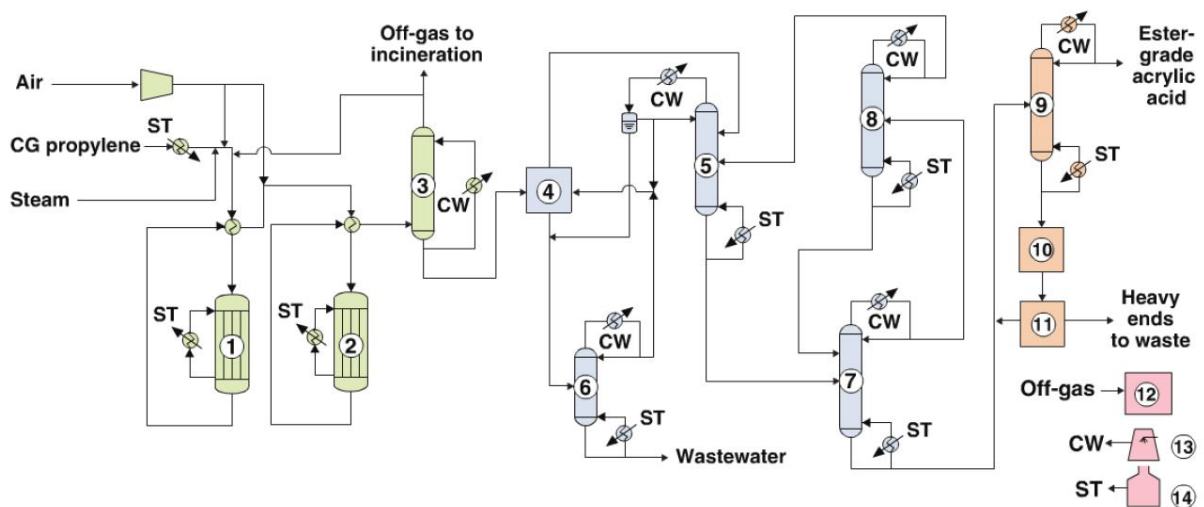


Figure 10 : Procédé de production Lurgi/Nippon Kayaku (Air Liquide) d'acide acrylique à partir de propylène [9]

**1.** Premier réacteur d'oxydation **2.** Second réacteur d'oxydation **3.** Tour de quenching **4.** Extraction liquide-liquide **5.** Colonne de récupération du solvant **6.** Stripping du raffinat **7.** Colonne de l'acide acrylique brut **8.** Colonne de récupération **9.** Colonne de purification **10.** Réacteur de dédimérisation **11.** Colonne de stripping **12.** Incinérateur **13.** Tour de refroidissement **14.** Chaudière à vapeur **CW** eau de refroidissement **ST** vapeur d'eau

D'autres produits d'intérêt peuvent être obtenus à partir du 3-HP par des réactions usuelles de chimie organique qu'on ne détaillera pas ici. Par exemple, la 1,3-propanediol obtenu par réduction du 3-HP est utilisé comme monomère notamment dans la production de fibres textiles [10]. Toutefois, il est déjà directement produit par voie biotechnologique à partir de sucres par Dupont Tate&Lyle aux Etats-Unis [11]. L'acide malonique, obtenu par oxydation du 3-HP, est utilisé comme agent de synthèse (réaction de type condensation de Knoevenagel) dans l'industrie pharmaceutique ou des arômes [12]. Et les esters de 3-HP pourraient servir de solvants verts. L'autre principal intérêt du 3-HP est en tant que monomère pour la confection de polyesters [10].

L'homopolymère du 3-HP, le poly acide 3-hydroxypropionique (poly(3-HP)), est un plastique transparent aux propriétés intéressantes. Une illustration est fournie en Figure 11 tirée de [13]. Son point de fusion faible de l'ordre de 77°C, sa température de transition vitreuse de -22°C et un allongement de 634% avant rupture lui donne de très bonnes propriétés thermomécaniques. Sa ductilité et flexibilité lui permettent d'être envisagé pour le soufflage de films, le thermoformage, le moulage par injection ou soufflage, le coulage de film perméable aux gaz et de revêtement. Sa biodégradabilité et biocompatibilité en font un candidat dans le domaine pharmaceutique pour la fabrication de capsules [14]. Il peut être synthétisé à partir de 3-HP par polymérisation par ouverture de cycle après synthèse d'oligomères cycliques de 3-HP par exemple [15]. Le poly(3-HP) peut également être utilisé en mélange avec d'autres polymères et le monomère 3-HP peut être utilisé en tant que co-monomère pour diminuer la fragilité et améliorer les propriétés d'autres polymères [14].



Figure 11 (tirée des informations supplémentaires à la référence [13]) : films de poly(3-HP)

## 2.2. Les méthodes de production du 3-HP

### 2.2.1. Les méthodes de production chimiques

Il existe plusieurs méthodes de chimie traditionnelle pour synthétiser le 3-HP par voie pétrochimique : l'hydratation d'acide acrylique qui ne présente évidemment aucun intérêt si l'intention est d'obtenir des dérivés acrylés à partir de 3-HP a été étudiée. Elle a été brevetée par Cargill : une solution aqueuse d'acide acrylique à 30% est chauffée entre 170 et 200°C avec une pression de CO<sub>2</sub> comme catalyseur entre 7 et 35 bar. Dans ces conditions, l'acide acrylique s'hydrate en 3-HP avec formation d'une impureté notable, le dimère éther du 3-HP. Le 3-HP est ensuite récupéré par distillation de l'eau et de l'acide acrylique à pression réduite en dessous de 100°C en présence de dodécane où le 3-HP se concentre. Ce « rétentat » (terme employé dans le brevet) est ensuite distillé sous vide entre 110 et 150°C pour récupérer le 3-HP [16]. Une autre méthode de purification de la solution de 3-HP brevetée par Cargill est l'extraction liquide-liquide, l'acide acrylique ayant une bien meilleure affinité pour les phases organiques [17,18]. Une autre méthode est l'hydrolyse du nitrile correspondant au 3-HP, l'éthylène cyanohydrine (i.e. 3-hydroxypropionitrile), produit par la substitution nucléophile du

cyanure de sodium sur l'éthylène chlorhydrine qui fait intervenir des produits polluants et toxiques [2]. Cette hydrolyse peut se faire par voie biocatalytique [19]. En fin, l'ouverture de la propiolactone est également possible mais ce produit est connu comme étant cancérigène et est produit à partir de réactifs toxiques. Ces deux dernières réactions peuvent être employées surtout à l'échelle laboratoire [20].

De nouvelles méthodes de synthèse à partir de substrats biosourçables ont également été mises au point. On peut par exemple citer l'oxydation sélective à l'air en milieu alcalin du 1,3-propanediol ou de l'alcool allylique par un catalyseur à l'or [20]. Une autre voie mettant en œuvre un substrat biosourcé est la conversion de l'acide lévulinique en 3-HP par la simple action de l'eau oxygénée en conditions basiques. Les prévisions estiment que le coût de production de l'acide lévulinique pourraient tomber entre 0,10 et 0,20 \$/kg à l'avenir. Ceci, combiné à la simplicité de la synthèse, pourrait rendre cette méthode assez intéressante [21].

### 2.2.2. Les méthodes de productions biotechnologiques

Suite à la parution du 3-HP dans la liste du DoE des molécules plate-formes à produire à partir de biomasse [10], les procédés biotechnologiques ont été massivement étudiés par les milieux académiques et industriels. De nombreuses voies ont été investiguées à partir d'un grand nombre de substrats comme le glycérol, le glucose, le 1,3-propanediol (1,3-PDO), le xylose et le dioxyde de carbone. Seuls les trois premiers seront traités ici, les deux derniers substrats conduisant encore pour le moment à des productivités et titres limités.

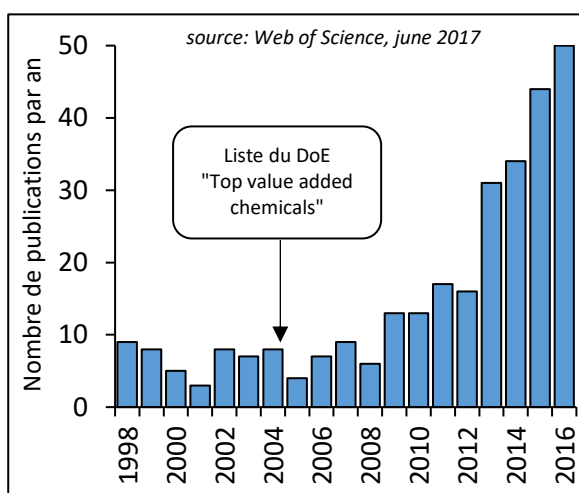


Figure 12 : Nombre de publications comportant la mention « 3-hydroxypropionic acid » dans le titre

La production de 3-HP à partir de glycérol peut être effectuée par des microorganismes naturellement producteurs comme *Lactobacillus reuteri* ou *L. collinoides*, des bactéries lactiques. Deux produits sont obtenus de façon équimolaire, le 3-HP et le 1,3-PDO, en passant par un intermédiaire métabolique, le 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA). En effet, l'équilibre des cofacteurs d'oxydo-réduction est maintenu dans la cellule par l'oxydation du 3-HPA en 3-HP de façon concomitante avec sa réduction en 1,3-PDO permettant de régénérer les cofacteurs NAD<sup>+</sup>/NADH en continu (Figure 14). Le rendement molaire maximum en 3-HP par rapport au glycérol est donc de 50% [22]. Le pH du milieu doit être

maintenu entre 5,0 et 7,0 par une base. L'ammoniaque semble en particulier avoir une influence positive [23].

La première étape de cette voie de biosynthèse du 3-HP à partir du glycérol implique une enzyme dépendante de la vitamine B12, une glycérol déshydratase. L'avantage de *L. reuteri* est qu'elle est naturellement productrice de ce cofacteur en plus d'être un micro-organisme G.R.A.S. (« generally recognized as safe »). De plus, elle est capable de convertir le glycérol sans croître, on parlera alors de bioconversion, et sans apport d'aucun nutriment. Cependant, l'intermédiaire aldéhyde 3-HPA est une molécule extrêmement inhibitrice, notamment pour le micro-organisme producteur, et son accumulation dans le milieu doit être évitée. Pour cela, des stratégies d'apport de glycérol en mode « fed-batch » ont été implémentées avec succès dans la littérature et des titres jusqu'à 11 g/L en 3-HP pour une productivité de l'ordre de 0,7 g/L/h à 37°C et pH régulé à 7 par de l'ammoniaque ont été obtenus [22]. Les résultats de notre équipe sont similaires avec des rendements molaires proches de 50% et des ratios 3-HP/1,3-PDO autour de 1 [23].

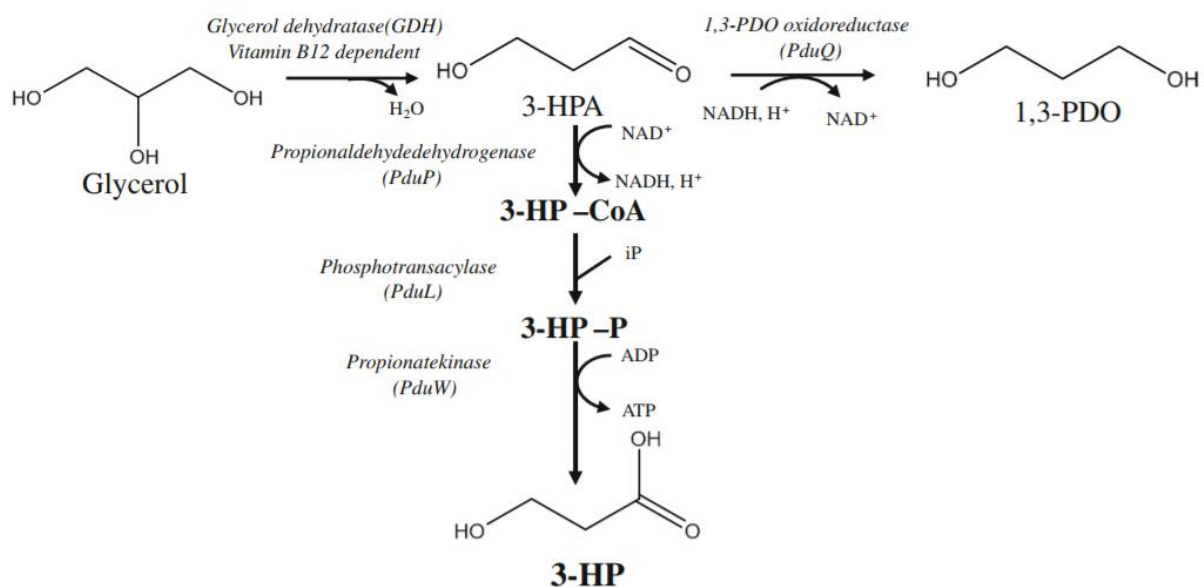


Figure 13 : Schéma réactionnel de la conversion enzymatique du glycérol en 3-HP et 1,3-PDO par *L. reuteri*

Cependant, ces résultats ne sont pas idéaux pour une mise à l'échelle, le DoE préconisant une productivité de l'ordre de 2,5 g/L/h et des titres autour de 100 g/L pour assurer une production biotechnologique économiquement rentable [10]. Des microorganismes génétiquement modifiés ont donc été mis au point pour la conversion de glycérol en 3-HP avec de meilleurs rendements, titres et productivités. Un titre très élevé de 75-85 g/L pour des productivités de 1,2-1,5 g/L/h a été obtenu grâce à une souche de *Klebsiella pneumoniae* génétiquement modifiée, mais avec un rendement molaire par rapport au glycérol de seulement 50%. De plus, les coproduits engendrés sont non seulement trop nombreux mais également proches structuralement du 3-HP [24] ce qui peut gêner la



purification. Une souche de la bactérie *Escherichia coli* modifiée génétiquement et capable de produire près de 72 g/L de 3-HP pour une productivité de 1,8 g/L/h à pH 7 et 35°C a également été implémentée. Cependant la méthode nécessite l'ajout de vitamine B12 au milieu, molécule extrêmement coûteuse, et aucune mention des coproduits n'est faite [25].

Un autre substrat étudié pour la production biotechnologique de 3-HP est le 1,3-propanediol. Il est connu que les bactéries acétiques peuvent convertir l'éthanol en acide acétique lors de la production de vinaigre à partir d'alcool. Certaines bactéries peuvent oxyder sélectivement un groupe hydroxyle dans un polyol pour produire un hydroxyacide. Par exemple, le 2-méthyl-1,3-propanediol a été converti en acide 3-hydroxy-2-methylpropionique [26] et le triméthylolpropane en acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)butyrique [27,28] par une souche de *Gluconobacter oxydans* (une bactérie acétique) et de *Mycobacterium sp. MS1601* [29] respectivement. L'idée a donc été reprise d'oxyder sélectivement le 1,3-PDO en 3-HP grâce à des bactéries acétiques [30–32]. Une stratégie étudiée est de réaliser un procédé en deux étapes, en convertissant d'abord du glycérol en 1,3-PDO puis en convertissant ce 1,3-PDO en 3-HP [30,31,33]. D'autre part, le 1,3-PDO est déjà produit industriellement par bioconversion du glucose grâce à la bactérie *E. coli* [11]. Pour cette oxydation sélective du 1,3-PDO, des souches de *G. oxydans* [30,31] et d'*Acetobacter aceti* [32,33] peuvent être utilisées. Le schéma réactionnel est donné en figure 14. La température optimale se situe entre 25 et 30°C et le milieu doit être très fortement aéré (conditions oxydantes) pour assurer un état physiologique optimal des bactéries. La productivité est supérieure à 3 g/L/h dans une plage de pH allant de 7 à 4,5 (valeurs plus faibles non testées) avec des rendements molaires supérieurs à 95%. Toutefois l'inhibition de la production de 3-HP par le substrat a été montrée pour les deux bactéries acétiques [30,33]. L'intérêt de ces bactéries, en plus d'une productivité élevée, est de résister à des pH plus faibles que ceux habituellement mis en œuvre dans les procédés utilisant d'autres bactéries, notamment les bactéries lactiques. *A. aceti* immobilisée sur un support alginate a montré de bonnes capacités de production (55% du 1,3-PDO d'une solution à 50g/L transformée en 3-HP pour un rendement sur 1,3-PDO consommé de plus de 83%) à un pH aussi faible que 3 [32].

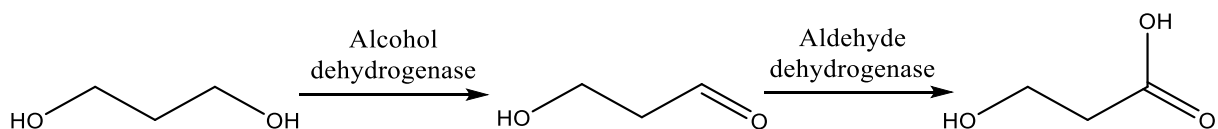


Figure 14 : Schéma réactionnel de l'oxydation sélective du 1,3-PDO en 3-HP par *G. oxydans*

L'autre source de carbone intéressante est le glucose. Cependant, le glucose n'est pas un substrat naturel connu pour la production de 3-HP par des micro-organismes. Il faut donc mettre au point des micro-organismes génétiquement modifiés capables de consommer du glucose pour produire la molécule visée. Sept voies métaboliques connues ont tout d'abord été proposées par Cargill [34] puis

de nouvelles se sont ajoutées [35]. Le glucose est d'abord naturellement transformé en pyruvate lors de la glycolyse et les voies principalement étudiées consistent à transformer ce pyruvate. Les voies reposant sur les intermédiaires métaboliques malonyl-CoA et  $\beta$ -alanine sont particulièrement investiguées et deux voies métaboliques possibles sont présentées en figures 15 et 16.

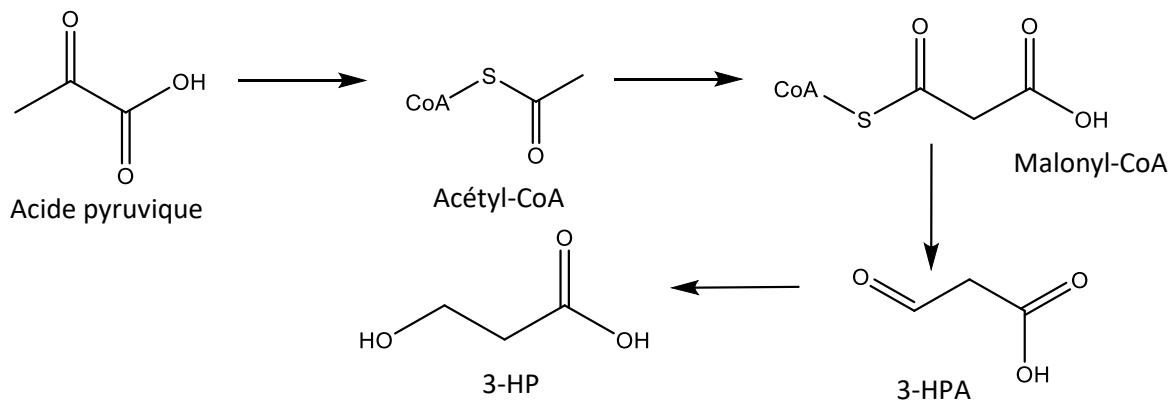


Figure 15 : Voie métabolique de production de 3-HP par l'intermédiaire du malonyl-CoA

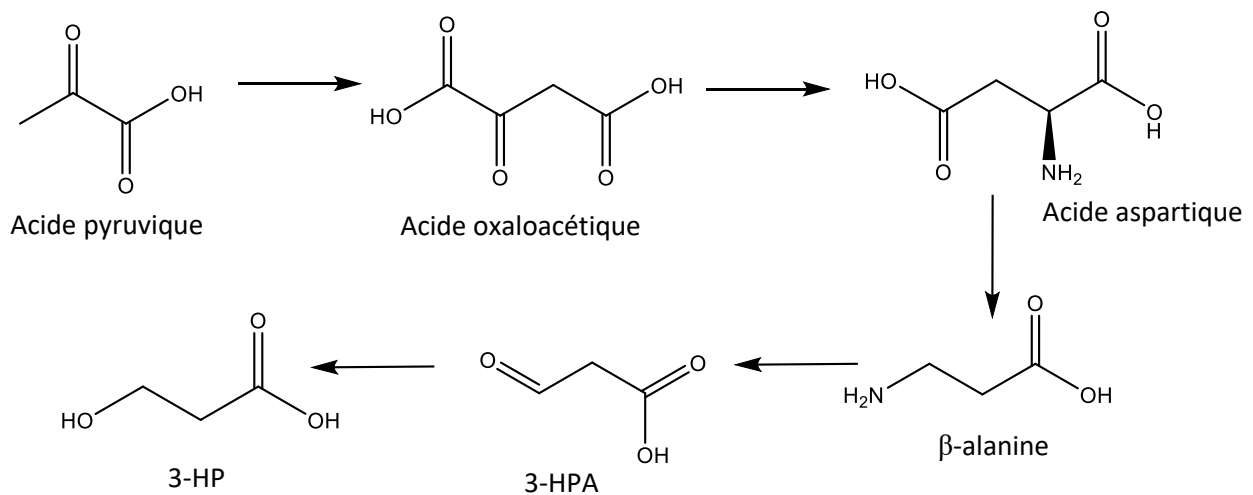


Figure 16 : Une voie métabolique de production de 3-HP par l'intermédiaire de la  $\beta$ -alanine

La voie de la figure 15, incluant également d'autres modifications génétiques comme la surexpression des enzymes impliquées et la suppression de voies menant à des coproduits, a par exemple fait l'objet d'un brevet de la société OPX Biotechnologies [36]. Ce brevet reporte un titre final de 49 g/L au bout de 69 h de fermentation avec une souche d'*E. coli* modifiée pour un rendement de 0,46 mol 3-HP/mol glucose [36], ce qui est assez faible si on considère qu'une mole de glucose conduit à 2 moles de pyruvate lors de la glycolyse. Cette stratégie de génie génétique a également été mise en œuvre sur une souche de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, permettant d'atteindre un titre final de 9,8 g/L pour un rendement de 0,13 mol 3-HP/mol glucose [37]. La deuxième voie métabolique présentée dans la figure 16 a été brevetée par la société Cargill avec un titre final de 9 g/L atteint grâce à une souche d'*E.*

*coli* [38]. Cette voie a également été introduite chez *S. cerevisiae* permettant d'obtenir 13,7 g/L en 3-HP et un rendement de 0,14 mol 3-HP/mol glucose [39].

Le principal problème des bactéries mises en œuvre dans ces procédés est que le milieu doit être neutralisé pour maintenir un pH supérieur à 5 compatible avec l'activité et la survie bactérienne. D'autre part, les microorganismes voient leur productivité drastiquement réduite par l'accumulation de 3-HP dans le milieu. Dans ce contexte, les recherches industrielles ont consisté à identifier et développer des microorganismes résistants aux pH faibles et aux fortes concentrations en acide organique. Le cas du 3-HP est détaillé dans un brevet de Novozymes [40]: 89 levures naturelles, sauf une identifiée comme la levure hôte de Cargill obtenue par évolution dirigée, ont été placées dans des solutions de 3-HP pour déterminer lesquelles étaient capables de croître à une concentration en 3-HP supérieure à 100 g/L et à pH 3,9. 12 levures ont ainsi été sélectionnées, puis leur taux de croissance et leur vitesse de consommation du glucose à pH 3,9 et pour différentes concentrations en 3-HP ont été mesurés. Une note a été attribuée à chacune des 12 levures reposant sur le taux de croissance en présence de 75 g/L de 3-HP, la pente du taux de croissance en fonction de la concentration en 3-HP (permettant d'évaluer l'inhibition) et la vitesse de consommation de glucose en présence de 75 g/L de 3-HP. Une souche d'*Issatchenka orientalis* s'est révélée la plus apte. Une voie métabolique de production du 3-HP a ensuite été insérée dans une souche de cette levure. Cargill présente ainsi dans un autre brevet [41] les résultats de fermentations réalisées en mode « batch » afin de produire le 3-HP à partir de glucose grâce à cette souche d'*I. orientalis*. La composition du milieu de culture utilisé, les paramètres environnementaux régulés et les résultats obtenus sont détaillées dans les Tableaux 4 et 5 ci-dessous. Ces données constituent, à notre connaissance, les résultats les plus proches de la phase d'industrialisation à l'heure actuelle. Les caractéristiques de cette fermentation sont intéressantes à plusieurs égards : le milieu de fermentation est simple et défini, la source d'azote est l'urée (composé hydrophile non-acidobasique), le pH est régulé à 4 et les rendements et productivités sont assez bons (Tableau 5) en comparaison des exemples précédents.

*Tableau 5 : Composition du milieu de fermentation utilisé par Cargill pour convertir le glucose en 3-HP*

Glucose	107 g/L (0,59 mol/L)
Urée	1,7 g/L (793 mg-N/L)
Phosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,5 g/L (1,0 g-PO <sub>4</sub> /L)
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	0,25 g/L (97 mg-SO <sub>4</sub> /L)
Traces d'oligoéléments + solution de vitamines (environ 30 mg/L)	

*Tableau 6 : Paramètres et résultats du procédé fermentaire de Cargill*

Valeur de régulation du pH	4,0
Concentration finale en biomasse	7 – 10 g/L
Concentration finale en 3-HP	80 – 100 g/L
Productivité	2,0 – 2,5 g/L/h
Rendement	1,5 – 1,6 mol 3-HP/mol glucose

Cependant, malgré la régulation du pH, Novozymes précise que l'accumulation de l'acide organique dans le milieu induit une inhibition : le taux de croissance de la souche sélectionnée diminue de plus de 50% en présence de 75 g/L de 3-HP et la vitesse de consommation du glucose de près de 25% dès une concentration en 3-HP de 35 g/L [40].

### 2.3. Les procédés de séparation envisagés pour le 3-HP

Plusieurs procédés de séparation ont été étudiés pour récupérer le 3-HP.

**Extraction liquide-liquide :** ce procédé d'extraction a déjà été décrit plus haut pour séparer un mélange 3-HP/acide acrylique issu d'un procédé d'hydratation d'acide acrylique en 3-HP ou de déshydratation de 3-HP en acide acrylique. En effet, du fait de la présence d'un groupe alcool supplémentaire, le 3-HP est bien plus hydrophile que l'acide acrylique. Ainsi, l'acide acrylique peut être extrait relativement facilement dans les solvants organiques tandis que le 3-HP reste en phase aqueuse [17,18]. Pour tous les solvants présentés dans le tableau 7, l'acide acrylique a un coefficient de distribution (calculé sur fraction massique) supérieur à celui du 3HP et celui du 3-HP reste très inférieur à 1. Le facteur de séparation est donc largement en faveur de l'acide acrylique quel que soit le solvant. Par exemple, avec la méthylisobutylcétone (MIBK) et une solution aqueuse de 6-7 g/L en acide acrylique et de 13-14 g/L en 3-HP, le facteur de séparation est de plus de 100 avec un partage favorable pour l'acide acrylique et très défavorable pour le 3-HP [17].

Tableau 7 : Extraction liquide-liquide de solutions d'acide acrylique (AA) et de 3-HP pour différents solvants (protocoles et conditions disponibles dans le brevet US20060149100) [17]

Extractant	Acid in Aqueous Phase, wt%		Acid in Extractant Phase, wt%		Partition Coefficient, D <sup>1</sup>		Separation Factor, S <sup>2</sup>
	AA	3HP	AA	3HP	AA	3HP	AA/3HP
Ethyl Acetate	0.20	1.13	0.59	0.20	2.96	0.18	16.55
	0.97	5.77	2.87	1.21	2.97	0.21	14.18
	2.02	11.38	5.36	3.09	2.66	0.27	9.79
	3.18	17.08	7.53	5.17	2.36	0.30	7.81
TBP/ ISOPAR-K hydrocarbon	4.22	21.16	8.07	8.68	1.91	0.41	4.66
	0.13	1.15	0.55	0.23	4.23	0.20	21.15
	0.88	6.52	3.32	0.52	3.80	0.08	47.27
	2.56	13.62	5.39	.01	2.39	0.07	32.12
Decanol	3.90	21.07	7.15	0.87	1.83	0.04	44.51
	0.31	1.37	0.47	0.03	1.51	0.02	77.18
MiBK	5.94	25.90	8.20	3.21	1.38	0.12	11.13
	0.23	1.32	0.59	0.03	2.51	0.02	108.82
Isopropyl Ether	4.11	24.17	9.92	5.46	2.14	0.23	10.69
	0.36	1.30	0.44	0.04	1.20	0.03	40.59
Methyl Acrylate	5.92	25.72	9.79	1.85	1.65	0.07	22.91
	0.25	1.24	0.45	0.07	1.82	0.06	31.01
Methyl Propionate	4.51	21.57	8.13	6.70	1.80	0.31	5.80
	0.24	1.22	0.51	0.06	2.13	0.05	44.43
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4.54	22.63	8.55	5.54	1.88	0.25	7.69
	0.61	1.39	0.04	ND <sup>3</sup>	0.06	--	--
Toluene	7.84	25.05	3.72	0.53	0.48	0.02	22.45
	0.69	1.42	ND	ND	--	--	--
Isopropyl Acetate	10.57	26.72	2.47	ND	0.23	--	--
	0.24	1.28	0.52	0.06	2.19	0.05	43.36
	4.42	25.35	8.95	3.82	2.02	0.15	13.43

Récemment, une étude a été publiée portant sur l'extraction du 3-HP en utilisant un système à deux phases aqueuses [42]. Le principe consiste à utiliser un solvant organique miscible à l'eau et à charger en sels la phase aqueuse suffisamment pour forcer la séparation du système en deux phases par le phénomène de relargage (salting-out). On dit qu'on a ainsi deux phases aqueuses car la phase contenant le solvant organique est extrêmement chargée en eau. En mettant un volume égal de solvant et de phase aqueuse saline initialement, près de 75 et 80% du 3-HP ont pu être retirés de la phase aqueuse originale en utilisant du *n*-propanol et du *tert*-butanol respectivement en ajoutant 200 g de sulfate de sodium par litre d'eau.

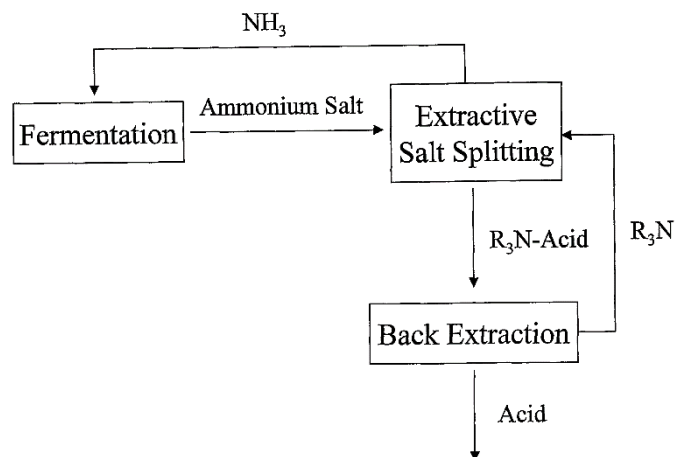
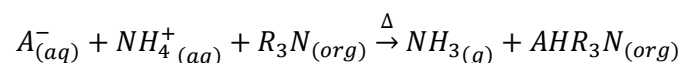


Figure 18 : Schéma de principe du procédé de dissociation thermique extractive du sel d'ammonium

**Dissociation thermique extractive :** pour séparer le 3-HP de milieux de fermentation, d'autres méthodes ont été développées. En fermentations bactériennes, les milieux sont souvent neutralisés à des pH supérieurs à 5 et le 3-HP est sous forme neutralisée. Une base intéressante est l'ammoniaque comme déjà mentionné dans le cas de l'acide succinique. Cargill a déposé un brevet [43] de dissociation thermique extractive d'une solution de 3-hydroxypropionate d'ammonium. Cela consiste à mettre la phase aqueuse du sel d'ammonium en présence d'une phase organique possédant un point d'ébullition élevé, en particulier des amines et des alcools à longues chaînes ou un mélange des deux. Le mélange est ensuite chauffé sous vide, générant de l'ammoniac qui s'évapore et le 3-HP créé passe en phase organique. L'ammoniac est ainsi récupéré pour être utilisé lors d'une autre fermentation. Dans le cas d'une amine, le processus se résume à l'équation bilan suivante :



Des taux de récupération de l'acide de 98% ont été reportés en utilisant du dodécanol. L'acide récupéré dans la phase organique peut être directement transformé dans cette phase, par exemple pour la déshydratation du 3-HP en acide acrylique.

**Procédés électromembranaires :** Novozyme a breveté une suite de procédés électromembranaires [44]. La solution de sel basique de 3-HP est concentrée par électrodialyse puis la solution concentrée est soumise à électrodialyse bipolaire afin de former une solution de 3-HP sous forme protonnée d'une part et une solution de la base ayant servi à former le sel de 3-HP d'autre part. Cette solution de base peut être recyclée pour le contrôle du pH dans l'étape de fermentation. Par exemple, une solution de 3-hydroxypropionate de sodium diluée issue d'une fermentation sera d'abord concentrée puis

séparée en une solution d'acide 3-hydroxypropionique et une solution d'hydroxyde de sodium pouvant servir de nouveau au contrôle du pH en fermenteur. Novozyme précise que cette technique permet également l'élimination de molécules neutres comme le glucose et la décoloration de la solution issue du milieu de fermentation. Par exemple, une solution de 10% massique de 3-hydroxypropionate de sodium et de 0,5% massique de glucose dans l'eau a pu être concentrée à 30% massique tout en éliminant le glucose. 95% du 3-hydroxypropionate de sodium a pu être conservé. Une solution de 3-hydroxypropionate de sodium à 25% massique a été soumise à électrodialyse bipolaire et 98,5% du sel ont pu être convertis en forme acide. Les conditions opératoire sont décrites dans la référence [44].

**Distillation** : enfin, un autre brevet [41] décrit un procédé entier de récupération et purification de 3-HP à partir du moût de fermentation de Cargill. Les levures productrices sont d'abord retirées par centrifugations continues en cascades où les flux d'eau sont gérés afin de limiter les pertes de 3-HP dans les parties décantées tout en limitant aussi la viscosité des fluides décantés afin de faciliter leur maniement. Les surnageants dont le pH était régulé à 4 pendant la bioconversion sont concentrés par évaporation (70-90°C, 300-400 mbar) à une concentration inférieure à 350 g/L puis acidifiés à l'acide sulfurique jusqu'à obtenir un pH entre 1,5 et 2,0. Le gypse créé est éliminé par filtration puis le filtrat est traité par résines échangeuses d'ions, d'abord résine cationique forte puis résine anionique faible, afin d'éliminer les sels contaminants comme les sulfates et les phosphates. En effet, ces sels sont susceptibles de favoriser la formation d'acide acrylique et d'augmenter le point d'ébullition du système lors de la future étape de distillation. La nouvelle solution est de nouveau concentrée par évaporation jusqu'à des titres compris entre 30 et 60% massique de 3-HP, puis la solution est entièrement distillée sous vide (130-150°C, 25-50 mbar) pour vaporiser le 3-HP et l'eau qui sont récupérés en tête de colonne tandis qu'en fond de colonne se concentrent les impuretés comme les oligomères de 3-HP, les sucres résiduels et les sels. La distillation est réalisée préférentiellement en deux étapes afin de maintenir des conditions pas trop drastiques pour éviter la formation d'acide acrylique. Les temps de séjour en zones chaudes doivent rester faibles, de l'ordre de la minute, afin de limiter la formation d'acide acrylique. Le titre en 3-HP est à peu près le même en entrée et en sortie des étapes de distillation.

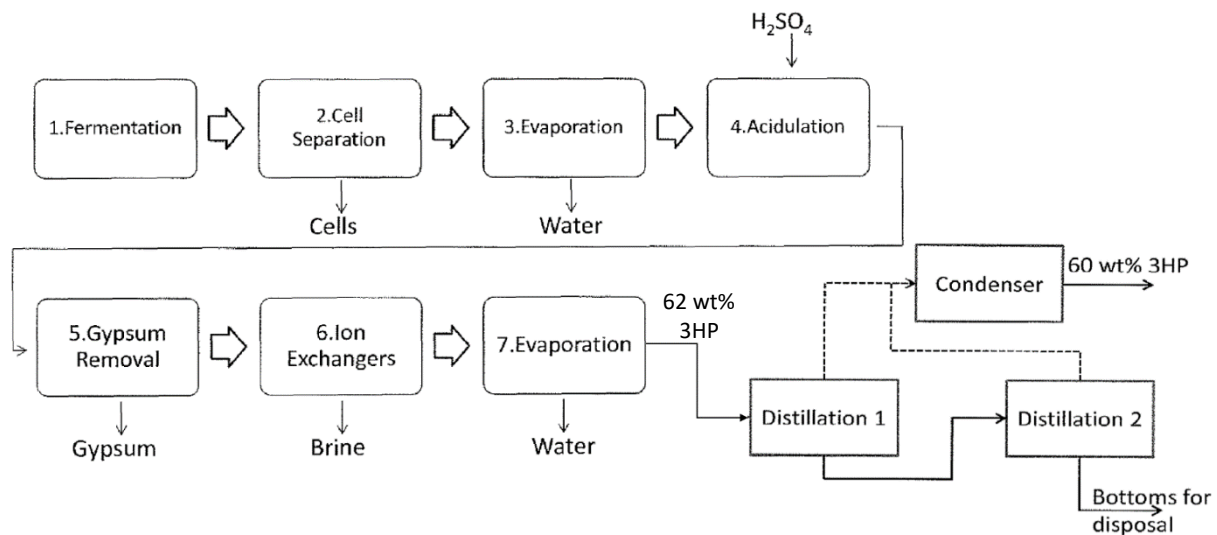


Figure 19 : Schéma de principe du procédé de séparation/purification du 3-HP après fermentation par des levures tel qu'envisagé par Cargill dans le brevet US2016/0060204 A1 [41]



## Références

- [1] J.N. Starr, G. Westhoff, Lactic Acid, in: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (Ed.), Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2014: pp. 1–8. [http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a15\\_097.pub3](http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a15_097.pub3) (accessed November 22, 2016).
- [2] K. Miltenberger, Hydroxycarboxylic Acids, Aliphatic, in: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (Ed.), Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2000. [http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a13\\_507](http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a13_507) (accessed November 22, 2016).
- [3] R. Datta, Hydroxycarboxylic acids, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. (2004). <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471238961.0825041804012020.a01.pub2/full> (accessed November 22, 2016).
- [4] Global Acrylic Acid Market Worth \$22.55 Billion By 2022, Grand View Research. (2016). <http://www.grandviewresearch.com/press-release/global-acrylic-acid-market> (accessed August 25, 2017).
- [5] F.-F. Kuppinger, A. Hengstermann, G. Stochniol, G. Bub, J. Mosler, A. Sabbagh, Process for preparing acrylic acid purified by crystallization from hydroxypropionic acid and apparatus therefore, US 2011/0105791 A1, 2011. <http://www.google.com/patents/US8198481> (accessed September 4, 2017).
- [6] M.A. Lilga, J.F. White, J.E. Holladay, A.H. Zacher, D.S. Muzatko, R.J. Orth, Method for conversion of  $\beta$ -hydroxy carbonyl compounds, US 2007/0219397 A1, 2007.
- [7] V. Gnanadesikan, R. Singh, R. Dasari, M. Alger, A process for manufacturing acrylic acid, acrylonitrile and 1,4-butanediol from 1,3-propanediol, WO2015034948 A1, 2015.
- [8] A.H. Tullo, Hunting For Biobased Acrylic Acid, Chemical & Engineering News. 91 (2013) 18–19.
- [9] S. Jenkins, Technology Profile: Acrylic Acid Production via Propylene Oxidation, Chemical Engineering. 123, n°2 (2016) 36.
- [10] T. Werpy, G. Petersen, A. Aden, J. Bozell, J. Holladay, J. White, A. Manheim, D. Elliot, L. Lasure, S. Jones, M. Gerber, K. Ibsen, L. Lumberg, S. Kelley, Top Value Added Chemicals from Biomass, Volume 1—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, TN, 2004.
- [11] Our process - DuPont Tate & Lyle Bio Products, DuPont Tate&Lyle. (2016). [http://www.duponttateandlyle.com/our\\_process](http://www.duponttateandlyle.com/our_process) (accessed August 25, 2017).
- [12] H. Strittmatter, S. Hildbrand, P. Pollak, Malonic Acid and Derivatives, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Weinheim, Germany, 2007. doi:10.1002/14356007.a16\_063.pub2.
- [13] J.A. Linares-Pastén, R. Sabet-Azad, L. Pessina, R.R.R. Sardari, M.H.A. Ibrahim, R. Hatti-Kaul, Efficient poly(3-hydroxypropionate) production from glycerol using *Lactobacillus reuteri* and recombinant *Escherichia coli* harboring *L. reuteri* propionaldehyde dehydrogenase and *Chromobacterium* sp. PHA synthase genes, Bioresource Technology. 180 (2015) 172–176. doi:10.1016/j.biortech.2014.12.099.
- [14] B. Andreessen, N. Taylor, A. Steinbuchel, Poly(3-Hydroxypropionate): a Promising Alternative to Fossil Fuel-Based Materials, Applied and Environmental Microbiology. 80 (2014) 6574–6582. doi:10.1128/AEM.02361-14.
- [15] D. Zhang, M.A. Hillmyer, W.B. Tolman, A New Synthetic Route to Poly[3-hydroxypropionic acid] (P[3-HP]): Ring-Opening Polymerization of 3-HP Macrocyclic Esters, Macromolecules. 37 (2004) 8198–8200. doi:10.1021/ma048092q.
- [16] X. Meng, T. Abraham, P. Tsobanakis, Process for preparing 3-hydroxycarboxylic acids, US20070015936 A1, 2007. <http://www.google.com/patents/US20070015936> (accessed September 5, 2017).

- [17] X. Meng, P. Tsobanakis, T. Abraham, Process for separating and recovering 3-hydroxypropionic acid and acrylic acid, US20060149100 A1, 2006.  
<http://www.google.com/patents/US20060149100> (accessed September 5, 2017).
- [18] X. Meng, P. Tsobanakis, J. Malsam, T. Abraham, Process for separating and recovering 3-hydroxypropionic acid and acrylic acid, US20070027342 A1, 2007.  
<http://www.google.com/patents/US20070027342> (accessed September 5, 2017).
- [19] S. Yu, P. Yao, J. Li, J. Ren, J. Yuan, J. Feng, M. Wang, Q. Wu, D. Zhu, Enzymatic synthesis of 3-hydroxypropionic acid at high productivity by using free or immobilized cells of recombinant *Escherichia coli*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 129 (2016) 37–42.  
doi:10.1016/j.molcatb.2016.03.011.
- [20] C. Della Pina, E. Falletta, M. Rossi, A green approach to chemical building blocks. The case of 3-hydroxypropanoic acid, *Green Chemistry*. 13 (2011) 1624. doi:10.1039/c1gc15052a.
- [21] L. Wu, S. Dutta, M. Mascal, Efficient, Chemical-Catalytic Approach to the Production of 3-Hydroxypropanoic Acid by Oxidation of Biomass-Derived Levulinic Acid With Hydrogen Peroxide, *ChemSusChem*. 8 (2015) 1167–1169. doi:10.1002/cssc.201500025.
- [22] T. Dishisha, L.P. Pereyra, S.-H. Pyo, R.A. Britton, R. Hatti-Kaul, Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol, *Microbial Cell Factories*. 13 (2014) 1–11. doi:10.1186/1475-2859-13-76.
- [23] J. Gorge, Optimisation de la bioconversion microbienne du glycerol en acide 3-hydroxypropionique (3-HP) par le contr ˆole du procede en bioreacteur, rapport de stage de master 2, AgroParisTech, 2016.
- [24] Y. Li, X. Wang, X. Ge, P. Tian, High Production of 3-Hydroxypropionic Acid in *Klebsiella pneumoniae* by Systematic Optimization of Glycerol Metabolism, *Scientific Reports*. 6 (2016). doi:10.1038/srep26932.
- [25] H.S. Chu, Y.S. Kim, C.M. Lee, J.H. Lee, W.S. Jung, J.-H. Ahn, S.H. Song, I.S. Choi, K.M. Cho, Metabolic engineering of 3-hydroxypropionic acid biosynthesis in *Escherichia coli*, *Biotechnology and Bioengineering*. 112 (2015) 356–364. doi:10.1002/bit.25444.
- [26] S.-H. Pyo, T. Dishisha, S. Dayankac, J. Gerelsaikhan, S. Lundmark, N. Rehnberg, R. Hatti-Kaul, A new route for the synthesis of methacrylic acid from 2-methyl-1,3-propanediol by integrating biotransformation and catalytic dehydration, *Green Chemistry*. 14 (2012) 1942. doi:10.1039/c2gc35214a.
- [27] M. Sayed, T. Dishisha, W.F. Sayed, W.M. Salem, H.M. Temerk, S.-H. Pyo, Enhanced selective oxidation of trimethylolpropane to 2,2-bis(hydroxymethyl)butyric acid using *Corynebacterium* sp. ATCC 21245, *Process Biochemistry*. (2017). doi:10.1016/j.procbio.2017.08.007.
- [28] M. Sayed, T. Dishisha, W.F. Sayed, W.M. Salem, H.A. Temerk, S.-H. Pyo, Selective oxidation of trimethylolpropane to 2,2-bis(hydroxymethyl)butyric acid using growing cells of *Corynebacterium* sp. ATCC 21245, *Journal of Biotechnology*. 221 (2016) 62–69. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.01.022.
- [29] M. Sayed, W.F. Sayed, R. Hatti-Kaul, S.-H. Pyo, Complete Genome Sequence of *Mycobacterium* sp. MS1601, a Bacterium Performing Selective Oxidation of Polyols, *Genome Announcements*. 5 (2017) e00156-17. doi:10.1128/genomeA.00156-17.
- [30] T. Dishisha, S.-H. Pyo, R. Hatti-Kaul, Bio-based 3-hydroxypropionic- and acrylic acid production from biodiesel glycerol via integrated microbial and chemical catalysis, *Microbial Cell Factories*. 14 (2015). doi:10.1186/s12934-015-0388-0.
- [31] L. Zhao, J. Lin, H. Wang, J. Xie, D. Wei, Development of a two-step process for production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol using *Klebsiella pneumoniae* and *Gluconobacter oxydans*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 38 (2015) 2487–2495. doi:10.1007/s00449-015-1486-4.
- [32] J. Li, H. Zong, B. Zhuge, X. Lu, H. Fang, J. Sun, Immobilization of *Acetobacter* sp. CGMCC 8142 for efficient biocatalysis of 1,3-propanediol to 3-hydroxypropionic acid, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 21 (2016) 523–530. doi:10.1007/s12257-016-0022-y.

- [33] A. Santinho, Production d'acide 3-hydroxypropionique à partir de 1,3-propanediol par *Acetobacter acetii* 58.66, rapport de stage de master 1, AgroParisTech, 2016.
- [34] V. Kumar, S. Ashok, S. Park, Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid, *Biotechnol Adv.* 31 (2013). doi:10.1016/j.biotechadv.2013.02.008.
- [35] C.S. Henry, L.J. Broadbelt, V. Hatzimanikatis, Discovery and analysis of novel metabolic pathways for the biosynthesis of industrial chemicals: 3-hydroxypropanoate, *Biotechnology and Bioengineering.* (2010) n/a-n/a. doi:10.1002/bit.22673.
- [36] M.D. Lynch, R.T. Gill, T.E.W. Lipscomb, Methods for producing 3-hydroxypropionic acid and other products, US 8,883,464 B2, 2014.
- [37] K.R. Kildegaard, N.B. Jensen, K. Schneider, E. Czarnotta, E. Özdemir, T. Klein, J. Maury, B.E. Ebert, H.B. Christensen, Y. Chen, I.-K. Kim, M.J. Herrgård, L.M. Blank, J. Forster, J. Nielsen, I. Borodina, Engineering and systems-level analysis of *Saccharomyces cerevisiae* for production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA reductase-dependent pathway, *Microbial Cell Factories.* 15 (2016). doi:10.1186/s12934-016-0451-5.
- [38] H.J. Jessen, H.H. Liao, S.J. Gort, O.V. Selifonova, Beta-alanine/alpha-ketoglutarate aminotransferase for 3-hydroxypropionic acid production, US 2014/0377823 A1, 2014. <http://www.google.com/patents/US8889391> (accessed September 7, 2017).
- [39] I. Borodina, K.R. Kildegaard, N.B. Jensen, T.H. Blicher, J. Maury, S. Sherstyk, K. Schneider, P. Lamosa, M.J. Herrgård, I. Rosenstand, F. Öberg, J. Forster, J. Nielsen, Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via  $\beta$ -alanine, *Metabolic Engineering.* 27 (2015) 57–64. doi:10.1016/j.ymben.2014.10.003.
- [40] H.J. Jessen, B. Rush, J. Huryta, B. Mastel, A. Berry, D. Yaver, M. Catlett, M. Barnhart, Composition and methods for 3-hydroxypropionic acid production, US 2012/0135481 A1, 2012.
- [41] T.W. Abraham, E. Allen, J.J. Hahn, P. Tsobanakis, E.C. Bohnert, C.L. Frank, Recovery of 3-hydroxypropionic acid, US 2016/0060204 A1, 2016. <http://www.google.com/patents/US20160060204> (accessed September 7, 2017).
- [42] M. Matsumoto, M. Shibasaki, K. Kondo, Salting-out Extraction of 3-Hydroxypropionic Acid with Reactive Extraction and Aqueous Two-phase Systems, *Solvent Extraction Research and Development.* 24 (2017) 141–147.
- [43] X. Meng, P. Tsobanakis, J. Malsam, T.W. Abraham, Process for preparing carboxylic acids and derivatives thereof, US 7,186,856 B2, 2007. <http://www.google.com/patents/US7186856> (accessed September 9, 2017).
- [44] J. Jump, Process for separating and recovering 3-hydroxypropionic acid, US 2012/0160686 A1, 2012.



### 3. La fermentation extractive : un procédé de choix pour les acides organiques

Comme nous l'avons mentionné dans le cas de la production de 3-HP par des levures, l'accumulation d'un produit de bioconversion dans le milieu peut entraîner une inhibition sur les microorganismes producteurs. Cela a été montré pour bon nombre de productions par voies biotechnologiques comme les solvants [1], les arômes [2] ou les acides organiques [3]. Pour les solvants, le *n*-butanol produit par fermentation ABE (acétone, butanol, éthanol) par exemple, induit une inhibition sur différentes espèces de *Clostridium* productrices et la teneur finale d'une fermentation en mode fed-batch reste autour de 10-12 g/L [1,4]. Pour les composés d'arôme, un exemple typique est le 2-phényléthanol, un arôme de rose produit par *S. cerevisiae* à partir de L-phénylalanine, dont l'accumulation est très inhibitrice et empêche la croissance de la levure autour de 4 g/L [2]. Une stratégie envisagée pour contourner cet inconvénient est de retirer la molécule du milieu de bio-production (bioconversion ou fermentation) pendant qu'elle est produite en empêchant ainsi son accumulation. C'est la récupération dite *in situ* de produits, en anglais « *in-situ* product recovery » (ISPR).

#### 3.1. La récupération de produits *in-situ* (ISPR)

##### 3.1.1. Généralités

Avec une stratégie ISPR, des concentrations, des productivités et des rendements améliorés sont espérés de par la diminution de l'inhibition causée par l'accumulation des produits inhibiteurs [5]. Les besoins en énergie et l'empreinte eau seraient alors réduits et les installations gagneraient en compacité. Pour être mis en place industriellement, les conditions préalables sont la possibilité de la mise à l'échelle, un taux de récupération du produit élevé, une stabilité et une robustesse du système assurées et un gain en durabilité. Plusieurs configurations peuvent être envisagées pour la mise en œuvre de cette stratégie [6]. On distingue les configurations dites internes, où le procédé de récupération est situé dans le volume utile du bioréacteur, des configurations dites externes où le procédé de récupération est à l'extérieur du bioréacteur, dans ce deuxième cas l'extraction peut également être qualifiée de « in-stream » à la place de « *in-situ* ». Une deuxième distinction est communément faite concernant le contact entre les micro-organismes et la force motrice du procédé d'extraction. S'il n'y a pas de séparation entre les micro-organismes et la force motrice du procédé, la configuration est dite directe alors que s'il y a un organe de séparation comme une membrane par exemple, la configuration sera dite indirecte. Toutes les combinaisons sont alors possibles et sont résumées dans la figure 20.

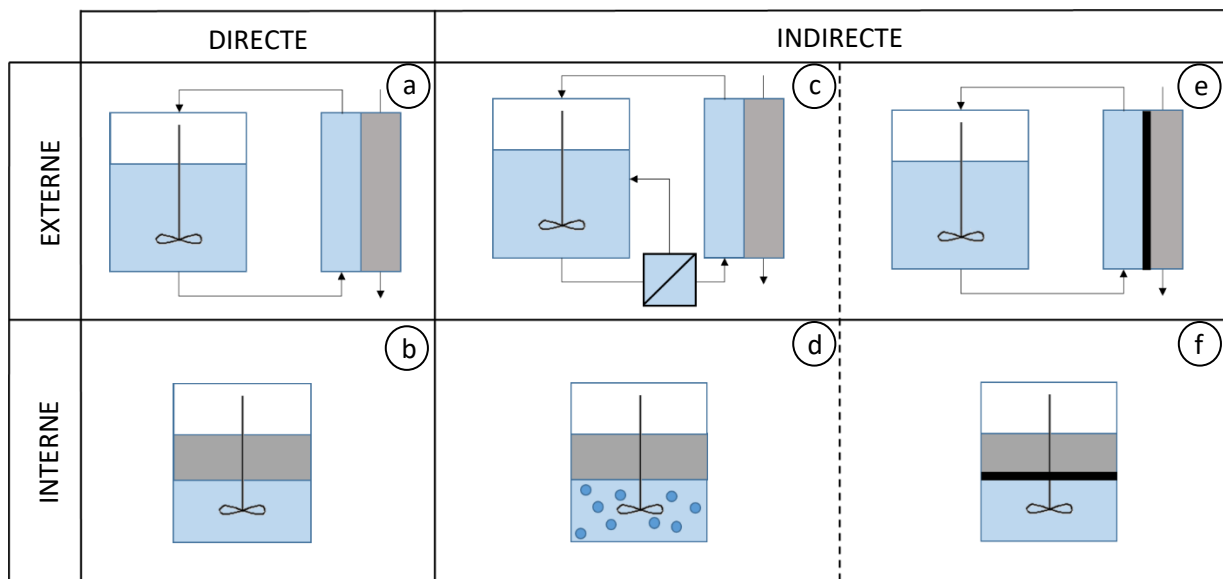


Figure 20 : Configurations possibles de procédés ISPR. a : configuration externe directe (ex : circulation dans une colonne échangeuse d'ions) ; b : configuration interne directe (ex : solvant dans le bioréacteur) ; c : configuration externe indirecte (ex : filtration des micro-organismes puis extraction) ; d : configuration interne indirecte (ex : solvant dans le bioréacteur avec immobilisation des micro-organismes) ; e : configuration externe indirecte intégrée (ex : contacteur liquide-liquide à membrane avec boucle de circulation externe) ; f : configuration interne indirecte intégrée (ex : contacteur liquide-liquide à membrane immergé)

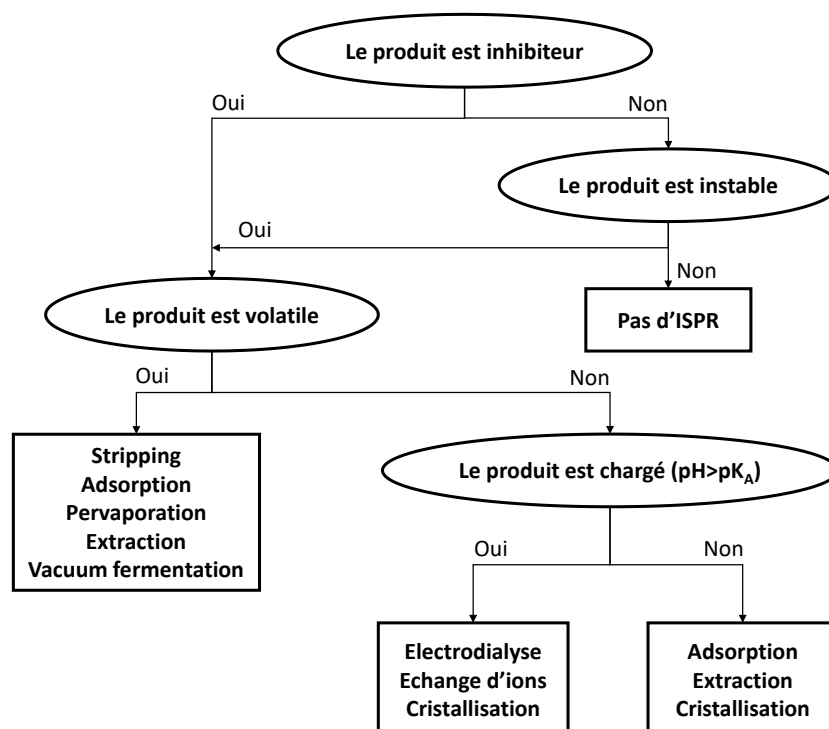


Figure 21 : arbre de décisions pour le choix d'un procédé ISPR adapté au produit à récupérer

Le choix du procédé de séparation dépend des propriétés de la molécule à extraire et le schéma en Figure 21 a été proposé par Van Hecke et al [5]. Par exemple, si le produit est très volatile, il peut être retiré par stripping et/ou en appliquant un vide au-dessus du fermenteur. Si le produit n'est pas volatile mais hydrophobe et peu soluble dans l'eau, il pourra être éliminé entre autres par cristallisation ou extraction liquide-liquide (Figure 21 ci-dessus).

Dans le cas du *n*-butanol, la technique membranaire de pervaporation a été utilisée avec succès [1]. En effet, le *n*-butanol dilué en milieu aqueux est plus volatile relativement à l'eau et possède également un caractère hydrophobe ce qui lui permet de se solubiliser et diffuser dans une membrane hydrophobe non-poreuse lorsqu'un vide est appliqué du côté aval (perméat) de la membrane. Ces deux propriétés de la molécule à extraire (volatilité et affinité avec la membrane) permettent de retirer sélectivement le *n*-butanol d'un mélange contenant de l'eau, de l'éthanol et de l'acétone. En utilisant une membrane en polydiméthylsiloxane, des chercheurs sont parvenus à maintenir une concentration en *n*-butanol dans le milieu de fermentation inférieure à 8 g/L et à concentrer sélectivement le produit à 160 g/L dans le perméat [5]. Le 2-phényléthanol quant à lui n'est pas volatile. Un procédé de choix est ainsi l'extraction liquide-liquide. La première façon, la plus simple, a été de configurer une extraction interne et directe, c'est-à-dire en ajoutant directement le solvant dans le bioréacteur, dans ce cas de l'acide oléique [2]. Le 2-phényléthanol formé est alors directement extrait dans le solvant, la concentration finale est multipliée par 3, le rendement molaire sur substrat passe de 83 à 91% et la productivité augmente de plus de 44% par rapport à un fed-batch conventionnel. Cependant, dans cette configuration, le milieu fermentaire était en réalité une émulsion, stabilisée par la présence naturelle de molécules biologiques, ce qui n'est pas souhaitable pour une mise à l'échelle industrielle. En plus de la nécessité de casser l'émulsion, elle constitue un obstacle au transfert de chaleur et de matière et revient en quelque sorte à « asphyxier » les micro-organismes sur le long terme. De plus, la mise en œuvre d'un procédé continu n'est pas possible de cette manière. Une configuration interne et indirecte a donc été envisagée [7]. Le solvant utilisé est cette fois-ci le pentane et l'heptane. L'utilisation d'un contacteur liquide-liquide à membrane a permis le contact liquide entre les phases aqueuse et organique sans créer d'émulsion. Le principe de fonctionnement d'un tel contacteur sera fourni dans la partie dédiée. Le titre final a alors été multiplié par près de 6 à plus de 21 g/L, le rendement sur substrat était de 100% et la productivité a augmenté de 50% par rapport à un fed-batch conventionnel tout en obtenant au final deux phases distinctes parfaitement homogènes.

### 3.1.2. Récupération in situ d'acides organiques produits par voie biotechnologique

Généralement, les petits acides carboxyliques sont hydrophiles et non-volatiles à l'image des acides acétiques ou lactiques qui sont miscibles avec l'eau avec un point d'ébullition plus élevé que celui de l'eau. Leur accumulation dans le milieu de fermentation pendant qu'ils sont produits induit une forte diminution du pH. Par exemple, pour l'acide lactique, selon le type de micro-organisme utilisé, le pH de fermentation peut être régulé à une valeur inférieure [8] ou supérieure [9] au  $pK_A$  de l'acide, valeur seuil qui signifie que si le pH est au-dessus d'elle, alors l'acide est majoritairement présent sous forme déprotonnée (base conjuguée). Lorsque la fonction acide carboxylique est déprotonnée, elle porte une charge formelle négative de -1 et devient un ion carboxylate. Il s'agit d'un anion dont la réactivité est limitée et dont le sel alcalin est bien souvent très soluble dans l'eau. Dans ce cas, la fonction carboxylate peut interagir dans des réactions d'échange d'ions ou de reprotonation qui peuvent être mises à profit par des résines échangeuses d'anions ou dans des procédés électromembranaires [10,11]. Par exemple, en introduisant des résines échangeuses d'anions dans le milieu de fermentation, les ions carboxylates peuvent se fixer sur la résine qui relargue alors son contre-ion anionique dans le milieu. A l'inverse, l'acide sous forme protonnée pourra réagir avec des entités basiques telles que des fonctions amines greffées sur des résines. Le tableau 8 résume quelques travaux de la littérature autour de production d'acide lactique avec ISPR par utilisation de résines. Les conditions de bioconversion pouvant être extrêmement variées (biocatalyseurs, substrats, conduite du bioréacteur...), la comparaison chiffrée n'est pas immédiate. L'idée principale à retenir est que les études montrent globalement une amélioration des performances (productivités et rendements) lors de l'utilisation de résines couplées à la fermentation pour l'acide lactique. Pour plus de précisions sur les conditions expérimentales, se référer aux articles cités dans le tableau 8.

*Tableau 8 : Exemples de fermentations extractives d'acide lactique par l'utilisation de résines échangeuses d'ions*

Résines strictement échangeuses d'anions (ammoniums quaternaires)					
Configuration	Résine	Anion échangé	Mode de bioconversion du contrôle	Productivité / contrôle	Réf.
Externe indirecte	Amberlite IRA 400	$HO^-$	Fed-batch	x 5,4	[12]
Externe directe/indirecte	Amberlite IRA 400	$HO^-$	Fed-batch avec cellules immobilisées + cellules en suspension	x 1,4	[13]
Externe indirecte	Amberlite IRA 420	$CO_3^{2-}$	Chemostat	(rendement sur substrat x1.2)	[14]



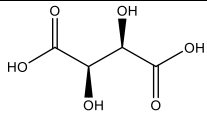
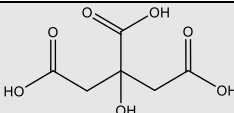
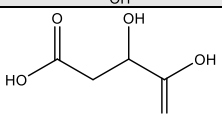
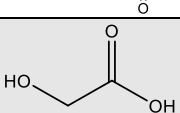
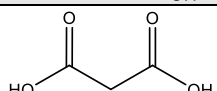
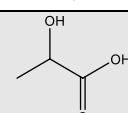
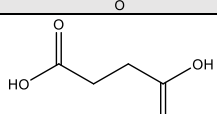
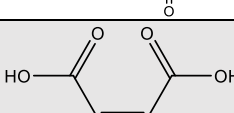
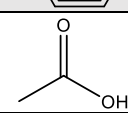
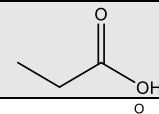
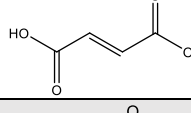
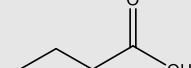
Résines basiques (amines)				
Configuration	Résine	Mode de bioconversion du contrôle	Productivité / contrôle	Réf.
Externe directe	Amberlite IRA 67	Fed-batch	x 1,3	[15]
Interne directe	Amberlite IRA 67	Batch	x 5,9	[16]
Interne indirect	Amberlite IRA 35	Batch avec cellules immobilisées	x 4	[17]

Un procédé ayant attiré également beaucoup d'attention est l'extraction liquide-liquide et en particulier pour les acides organiques l'extraction liquide-liquide réactive. L'extraction liquide-liquide est beaucoup étudiée pour la récupération *in-situ* de nombreux produits obtenus par bioconversion ou fermentation. Comme mentionné précédemment, la technique a été mise en œuvre avec succès pour la production biotechnologique de 2-phényléthanol. Par exemple, pour la production d'éthanol [18] ou de *n*-butanol [4], les alcools à chaînes grasses ont été étudiés comme solvant d'extraction. Parfois même, le procédé peut-être plus élaboré en couplant plusieurs étapes. Par exemple, lors de la bioproduction simultanée de *n*-butanol et d'acide butyrique, l'accumulation des produits s'avère toxique [19]. L'introduction d'une lipase catalysant les réactions d'estérification dans le milieu de bioconversion permet la production de butyrate de butyle qui est directement extrait par l'adjonction d'hexadécane à l'intérieur même du bioréacteur. Cependant, nous nous concentrons ici sur les acides organiques.

Les petits acides organiques produits par voies biotechnologiques sont généralement des espèces hydrophiles comme le montre la valeur du logarithme de leur coefficient de partage ( $\log P$ ) octanol/eau, paramètre généralement admis comme caractérisant l'hydrophobicité d'un composé. Si la valeur du  $\log P$  est négative cela signifie que les composés sont hydrophiles avec un partage favorable pour la phase aqueuse. Pour la plupart des acides produits par voie biotechnologique, la valeur du  $\log P$  est négative et donc leur extraction par des phases organiques hydrophobes et non-solubles dans l'eau n'est pas favorisée. Pour la plupart des acides, la méthylisobutylcétone (MIBK) est également présenté comme exemple de solvant courant [20]. Le  $\log P$  MIBK/eau est lui aussi bien souvent inférieur à 0. Si on compare l'acide tartrique avec l'acide succinique, l'acide glycolique avec l'acide acétique ou l'acide lactique avec l'acide propionique, on peut se rendre compte que les acides hydroxycarboxyliques sont bien plus hydrophiles que leurs homologues non substitués (Tableau 9).

Ainsi, l'extraction liquide-liquide ne semble pas de prime abord une solution adaptée à l'extraction *in-situ* des acides organiques.

Tableau 9 : coefficients de partage octanol/eau et MIBK/eau des principaux acides carboxyliques avec le cologarithme de leurs constantes de dissociation

Acides organiques	Formule topologique	pK <sub>A</sub>	Log P (octanol/eau) <sup>a</sup>	Log P (MIBK/eau)
Acide tartrique		3,01 ; 4,38	-1,91	-1.70
Acide citrique		3,13 ; 4,76 ; 6,40	-1,64	-1.05
Acide malique		3,22 ; 4,70	-1.26	-1.40
Acide glycolique		3,83	-1,11	-1,52
Acide malonique		2,83 ; 5,69	-0.81	-0.78
Acide lactique		3,86	-0,72	-0.85
Acide succinique		4,20 ; 5,64	-0.59	-0.72
Acide maléique		1,93 ; 6,14	-0.48	-0.68
Acide acétique		4,76	-0.17	-0.3
Acide propionique		4,85	0.33	0.33
Acide fumarique		3,02 ; 4,38	0.46	0.14
Acide butyrique		4,82	0.79	0.78

<sup>a</sup> Valeurs issues de la base de données expérimentales d'EPI Suite (Syracuse Research Corporation et US Environmental Protection Agency, copyright 2000)

Pour extraire les acides organiques produits par fermentation de manière efficace, l'extraction liquide-liquide réactive a été développée.

## 3.2. Extraction liquide-liquide réactive d'acides organiques

L'extraction liquide-liquide réactive d'acides organiques consiste à utiliser une molécule hydrophobe capable d'interagir spécifiquement avec l'acide. Ceci conduit à la formation d'un produit d'interaction qui n'est pas soluble dans l'eau et donc extrait en phase organique. Le produit d'interaction est usuellement qualifié de complexe et par conséquent ce terme sera repris dans l'ensemble de ce manuscrit. Nous nous intéressons ici aux méthodes d'extraction de la forme protonnée de l'acide car les nouvelles méthodes de fermentation s'orientent vers des fermentations en milieu acide (CF parties 1 et 2 de ce chapitre) et qu'ainsi elle est la principale forme toxique pour les microorganismes.

### 3.2.1. Les différents extractants pour l'extraction liquide-liquide réactive

Il existe principalement 2 types d'extractants capables d'interagir spécifiquement avec les acides : des composés comprenant un atome d'oxygène donneur d'électrons lié à un atome de phosphore et des amines comprenant des atomes d'azote donneurs d'électrons. Les premiers sont des bases de Lewis et sont considérés comme des agents fortement solvatant [20]. Ils peuvent se coordonner fortement sur un groupe accepteur tel que le proton acide des acides carboxyliques. Les seconds, les amines, sont des bases de Brønsted et le doublet non-liant de l'amine peut être mobilisé dans des interactions acide-base avec le proton acide des acides carboxyliques. Les réactivités de ces deux types d'extractant sont donc différentes et cela va se traduire dans leur efficacité d'extraction des acides carboxyliques et dans l'influence du diluant utilisé.

Les deux représentants principaux des extractants phosphorés sont le phosphate de tributyle communément appelé TBP et l'oxyde de trioctylphosphine communément appelé TOPO. Les oxydes de phosphine sont en général plus efficaces mais sont beaucoup plus chers que les phosphates [21].

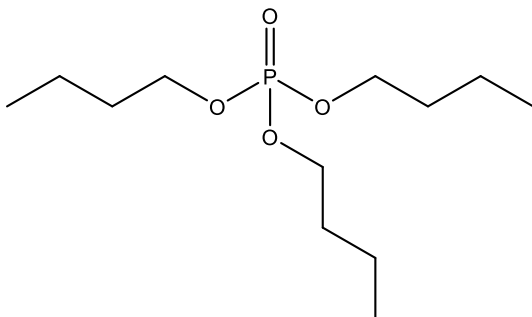


Figure 22 : formule topologique du TBP

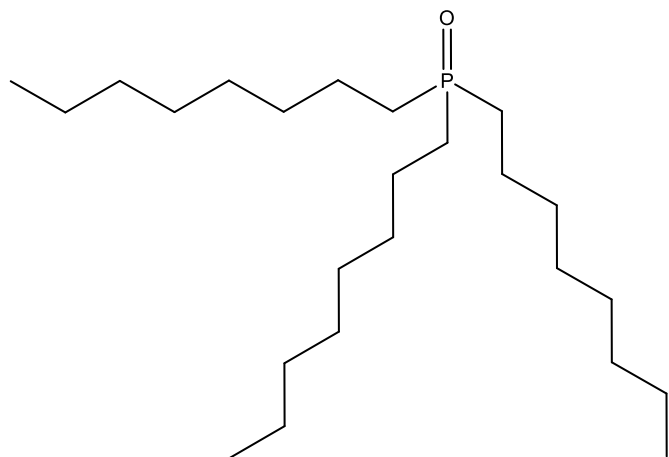
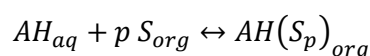


Figure 23 : formule topologique du TOPO

Les extractants phosphorés possèdent eux-mêmes de bonnes propriétés solvatantes grâce à leur dipôle P=O extrêmement polaire. Par exemple, le moment dipolaire du TBP est très élevé à 3,07 D en comparaison de l'eau à 1,85 ou du MIBK à 2,70 [22] ce qui lui permet d'être un bon compétiteur par rapport à l'eau pour une solvation spécifique [20]. Par conséquent, les extractants phosphorés ne sont pas très sensibles au solvant dans lequel ils sont dilués pour effectuer l'extraction et plus ils seront concentrés et plus le rendement d'extraction sera élevé [20]. Un solvant peu visqueux et améliorant les propriétés de tension de surface peut alors être choisi librement. Généralement, les extractants phosphorés sont modérément efficaces pour extraire les acides les plus hydrophiles en phase aqueuse et des concentrations élevées en extractant de l'ordre de 1 mol/L ou plus sont souvent nécessaires. En règle générale, les rendements se trouvent de l'ordre de 20% ou inférieur quand moins de 2 mol/L de TBP sont présents en phase organique [20]. Par exemple, des expériences avec 0.6 mol/L de TBP dans l'hexane, le MIBK, le décanol ou le benzène conduisent à des rendements entre 4 et 14% pour une solution de 0,1 mol/L d'acide glycolique [23]. Avec 0.7 mol/L de TBP dans le décanol, on obtient 21 à 24% d'extraction de l'acide pyruvique initialement présent à moins de 0,2 mol/L [24] et 3 mol/L sont nécessaires dans l'hexane pour extraire 43% de l'acide lactique [25].

La réaction de complexation entre l'agent solvant phosphoré et l'acide peut s'écrire comme suit :



Où AH est l'acide à extraire, S est l'agent solvant phosphoré et  $AH(S_p)$  le complexe formé. Souvent, le coefficient stoechiométrique  $p$  est égal au nombre de groupes acides présents sur la molécule à extraire [20].

La deuxième classe d'extractant, nommément les amines aliphatiques, se comporte différemment. Parmi ces amines, les amines tertiaires telles que la tri-*n*-octylamine (TOA), la tri-*n*-dodécylamine et le mélange commercial Alamine 336 d'amines tertiaires avec des branches en C<sub>8</sub> et C<sub>10</sub> sont les plus souvent utilisés. Le comportement de ce type d'extractant est résumé brièvement ci-dessous et est décrit dans l'introduction de la publication n°1 du présent manuscrit qui traite de ce sujet avec toutes les références appropriées.

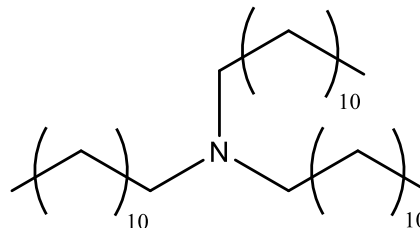
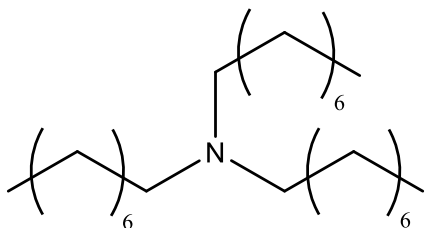
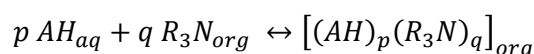


Figure 24 : formule topologique de la TOA Figure 25 : formule topologique de la tridodécylamine

L'efficacité de l'amine utilisée en tant qu'extractant dépend de sa structure, de la nature de l'acide et du solvant utilisé. Les amines primaires ne peuvent être utilisées du fait de leur grande solubilité dans l'eau et de leur propension à engendrer des émulsions. Les amines secondaires semblent plus efficaces probablement grâce à un encombrement stérique moindre autour de la fonction amine mais elles sont plus solubles dans l'eau que les tertiaires et peuvent former des amides avec les acides carboxyliques. Finalement, les amines tertiaires linéaires avec des longueurs de chaînes autour de C<sub>8</sub> - C<sub>10</sub> semblent les plus adaptées. Plus l'acide sera fort et hydrophobe, plus il sera facilement extrait par les amines. Les réactions d'extraction entre une amine tertiaire et un acide carboxylique peuvent être écrites comme suit :



Avec  $p$  et  $q$  les coefficients stœchiométriques, AH l'acide à extraire,  $R_3N_{org}$  l'amine tertiaire et  $[(AH)_p(R_3N)_q]_{org}$  le complexe acide-amine formé en phase organique.

Cependant, les amines tertiaires pures ne sont pas de bons solvants avec des polarités très faibles. Par exemple, la TOA présente un moment dipolaire de seulement 0,8 D et une constante diélectrique proche de 2. Ainsi, doivent-elles être utilisées en mélange avec un meilleur solvant présentant de bonnes propriétés comme une forte polarité et une capacité à faire des liaisons H. De tels solvants sont qualifiés de solvants actifs en opposition aux solvants inertes qui ne présentent pas de groupes fonctionnels et qui n'interagissent que très peu avec les solutés comme les hydrocarbures. Contrairement aux extractants phosphorés, un excès d'amines dans un solvant actif tend à détériorer les propriétés du mélange amine et solvant et à réduire le rendement d'extraction. Un optimum est alors à trouver.

Les extractants dont le mécanisme de réaction implique un échange d'ions tels que les sels d'ammoniums quaternaires, comme le chlorure de trioctylméthylammonium (TOMAC) ou le mélange commercial Aliquat 336 ne seront pas traités dans cette thèse. En effet, bien qu'ayant montré des résultats d'extraction intéressants pour certains acides sous forme protonnée [26–28], il est en priorité dédié aux échanges d'ions, c'est-à-dire aux acides sous forme déprotonnée [29,30]. Pour l'extraction de la forme protonnée de l'acide à laquelle on s'intéresse ici, son action serait celle d'un partage classique par solvant [26] et ne fait donc pas l'objet d'une attention particulière dans ce chapitre. En effet, un

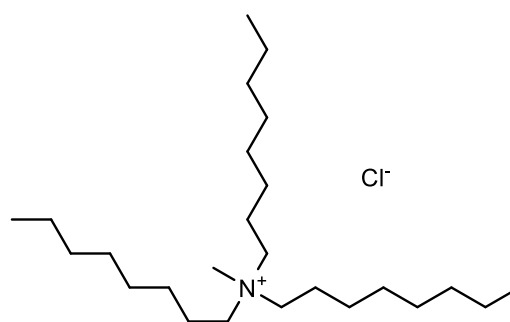


Figure 26 : formule topologique du TOMAC

ammonium quaternaire ne possède pas de propriétés acido-basiques, d'ailleurs son efficacité d'extraction en mélange avec d'autres solvants pour l'acide lactique et le 3-HP sous formes protonnées reste très limitée à <30% [26] et 3% [31] de rendement respectivement.

### 3.2.2. Mécanismes d'extraction avec des amines tertiaires et exemples d'extraction

Les mécanismes d'extraction réactive d'acides carboxyliques par des amines tertiaires peuvent varier selon les concentrations et les propriétés des phases extractantes. Nous présentons ici le cas des monoacides. La littérature concernant la chimie de formation des complexes acide-amine en phase organique a été extensivement analysée par Tamada et King [32].

La nature de la liaison acide-amine peut être assez complexe et varier selon la nature de la phase extractante. L'interaction du doublet non liant de l'amine avec le proton acide peut donner lieu à deux principales formes limites : (i) une liaison hydrogène et (ii) une paire d'ions liée à la protonation de l'amine. L'état de l'ion carboxylate quant à lui peut être délocalisé ou sous forme carbonyle dans des formes intermédiaires avec des charges partielles plus ou moins fortes [33].

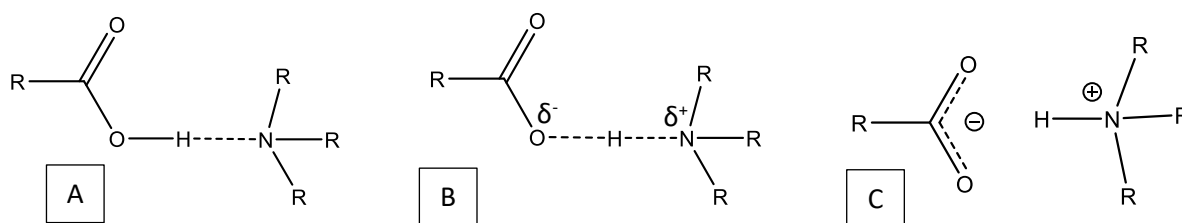


Figure 27 : Représentation des différentes formes limites de la liaison acide-amine avec la liaison hydrogène (A), la liaison intermédiaire à charges partielles (B) et la liaison ionique (C)

Il est probable que toutes ces formes soient en équilibre et que la forme privilégiée dépende de la nature des espèces mises en jeu. En effet, il existe des systèmes où la liaison N-H ainsi que la double liaison C=O ont été détectées simultanément par spectrométrie infrarouge sans trace apparente du groupe carboxylate [32]. Le type de liaison dépend notamment de la force de l'acide. Plus il sera fort, plus il aura tendance à être totalement dissocié et donc la force de l'acide tend à promouvoir les paires d'ions. Le solvant utilisé est également très important. Un solvant actif, avec une forte constante diélectrique et des capacités à réaliser des liaisons H, aura tendance à promouvoir la séparation de charges tandis qu'un solvant inerte aura tendance à l'inhiber [32]. Ceci explique ainsi l'effet très important du solvant avec les extractants de type amine puisqu'ils vont imposer la complétude ou non de la réaction acide-base. Pour les solvants actifs, la formation d'une paire d'ions avec interactions électrostatiques très favorables et d'une liaison ionique forte explique leur efficacité.

Seulement, des bilans matières sur des extractions liquide-liquide réactives font penser à l'existence de complexes avec des stoechiométries supérieures même pour les monoacides [34,35] où plus d'une

molécule d'acide seraient impliquées dans le complexe pour une molécule d'amine. Cette surcharge a été démontrée être le résultat de l'addition d'une seconde molécule d'acide par liaison H au premier acide lié à l'amine, puis d'une troisième sur la deuxième etc. Ces assemblages moléculaires peuvent même former des cycles stabilisant [36].

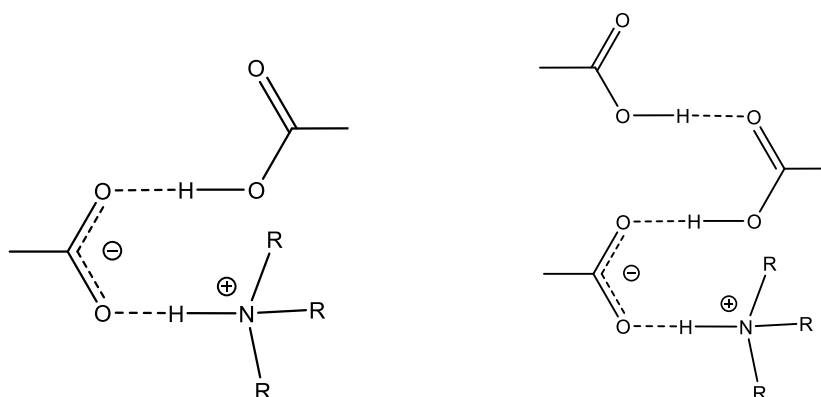


Figure 28 : formules topologiques limites de complexes de stœchiométries (2;1) et (3;1)

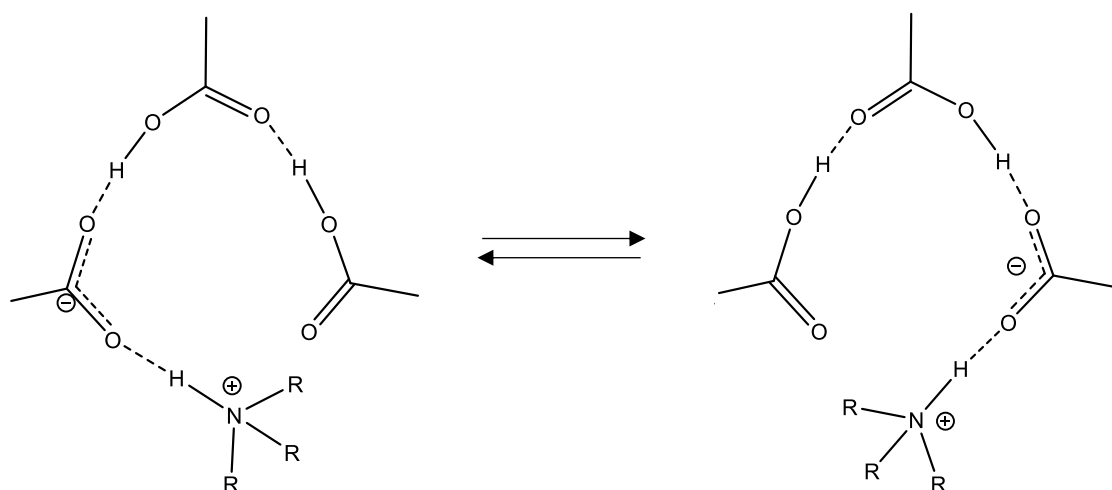


Figure 29 : formules topologiques limites de complexes de stœchiométries (3;1) avec stabilisation cyclique

L'utilisation de solvants donneurs de protons pouvant établir des liaisons H entre en compétition avec la formation des oligomères d'acide et inhibe donc ce phénomène. L'utilisation de solvants protiques favorise donc l'extraction de l'acide lié à l'amine sous forme monomérique en occupant les sites libres pour les liaisons H. C'est par exemple le cas des alcools et du chloroforme [33].

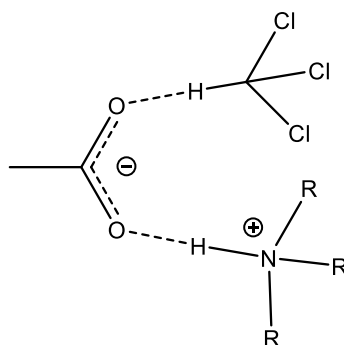


Figure 30 : exemple de compétition avec le solvant pour la formation de liaison H avec le complexe

Avec des diluants inertes, il est possible que les différents complexes s'agrègent afin d'isoler la partie polaire du complexe du milieu apolaire que constitue le diluant. Dans ce cas, la visualisation des complexes comme des arrangements stœchiométriques atteint ses limites. Dans certains cas extrêmes avec de fortes concentrations en acide et en amine, les complexes agrégés peuvent former une troisième phase entre la phase aqueuse et la phase organique originale. Cela permet d'isoler la partie hydrophile des complexes d'un milieu hydrophobe uniquement constitué d'amine et/ou de diluant sans pour autant solubiliser la partie hydrophobe de l'amine dans la phase aqueuse. La troisième phase a donc une composition intermédiaire et est alors très chargée en acide, en eau et en amine [36].

L'extraction réactive d'acides organiques par des amines dans des solvants actifs est particulièrement efficace et elle a donc fait l'objet de nombreuses publications pour de nombreux acides. Nous avons répertorié 26 acides organiques différents dont l'extraction réactive par des amines aliphatiques a été publiée dans la littérature. Dans l'ordre alphabétique, il s'agit des acides acétique [37,38], acrylique [39,40], adipique, benzoïque [41], butyrique [42,43], citrique [37,44], formique [45], fumarique [36,46], glycolique [23,47], itaconique [48,49], lactique [34,50], lévulinique [51,52], maléique [53,54], malique [53,55], malonique [36], muconique [56], nicotinique [57], oxalique [37,58], phtalique [54], picolinique [59,60], propionique [27,42], pyruvique [24,35], succinique [36,61], tartarique [62,63] et valérique [42]. La liste des acides n'est probablement pas exhaustive. En tout cas, nous n'avons pas trouvé d'étude concernant le 3-HP en dehors de nos travaux.

Nous ne discuterons pas de toutes les études menées pour tous les acides mais l'exemple de l'acide lactique est intéressant car il s'agit d'un isomère de position du 3-HP et est donc proche structuralement. On peut alors penser que son comportement à l'extraction ne sera pas très différent. Le tableau 10 résume quelques études que nous avons recensées sur l'acide lactique concernant son extraction réactive par des amines tertiaires dans des solvants purs. Les valeurs sont données pour des extractions effectuées avec des volumes égaux de phases aqueuse et organique pour une température autour de 25°C. L'extractant est donnée en fraction volumique du volume final de phase organique et



la concentration en acide lactique est celle présente initialement en phase aqueuse. On peut voir que l'efficacité d'extraction des amines tertiaires en combinaison avec les alcools est très bonne avec des rendements d'extraction dépassant régulièrement les 90%. Il s'agit donc de bons systèmes d'extraction pour les acides carboxyliques dilués dans l'eau. On peut noter trois choses supplémentaires : (i) la longueur des chaînes alkyles est importante à cause de la solubilité dans l'eau des amines trop petites (tripropylamine), (ii) le solvant joue un rôle important avec un solvant plus actif (polaire et protique) menant à un plus fort rendement (octanol > décanol > alcool oléique > xylène) et (iii) la concentration en extractant est importante avec une présence trop forte ayant tendance à diminuer les rendements dans les solvants actifs. Ceci est mis en valeur dans la figure 31A reprenant certaines données du tableau 10.

*Tableau 10 : Résultats d'extractions liquides-liquides réactives d'acide lactique obtenus pour différents extractants dans des diluants purs*

Diluant	Extractant	Concentration initiale en acide	Rendement	Ref
Alcool oléique	-	18 g/L	20%	[64]
	20% TOA	10 g/L	90%	[50]
	40% TOA	10 g/L	91%	[50]
	60% TOA	10 g/L	87%	[50]
	80% TOA	10 g/L	71%	[50]
	15% Alamine 336	10 – 100 g/L	91 – 33 %	[65]
	50% Alamine 336	10 – 100 g/L	93 – 80%	[65]
	30% tridécylamine	55 g/L	73%	[66]
Dodécanol	12% tripropylamine	100 g/L	19%	[67]
	25% tripropylamine	100 g/L	29%	[67]
	37% tripropylamine	100 g/L	39%	[67]
Décanol	-	9 g/L	11%	[68]
	12% tripropylamine	100 g/L	19%	[67]
	25% tripropylamine	100 g/L	30%	[67]
	37% tripropylamine	100 g/L	40%	[67]
	10% TOA	8 – 9 g/L	93%	[69]
	20% TOA	8 – 9 g/L	95%	[69]
	30% TOA	8 – 9 g/L	94%	[69]
	30% TOA	9 g/L	87%	[68]
	50% TOA	8 – 9 g/L	93%	[69]
	70% TOA	8 – 9 g/L	89%	[69]
	90% TOA	8 – 9 g/L	67%	[69]
	30% triisooctylamine	9 g/L	85%	[68]
Octanol	-	< 45 g/L	24%	[20]
	-	<135 g/L	22%	[70]
	12% tripropylamine	100 g/L	25%	[67]
	25% tripropylamine	100 g/L	37%	[67]
	37% tripropylamine	100 g/L	51%	[67]
	50% TOA	8 – 9 g/L	96%	[69]
	10% Alamine 336	< 135 g/L	94%	[70]

	20% Alamine 336	< 135 g/L	95%	[70]
	30% Alamine 336	< 135 g/L	96%	[70]
	20% N,N-didécylpyridine-4-amine	1 g/L	95%	[71]
Xylène	-	10 g/L	0,2%	[72]
	4% TOA	10 g/L	17%	[72]
	9% TOA	10 g/L	23%	[72]
	22% TOA	10 g/L	60%	[72]
	44% TOA	10 g/L	75%	[72]
Sans diluant	TOA	9 g/L	16%	[68]
	triisooctylamine	9 g/L	39%	[68]

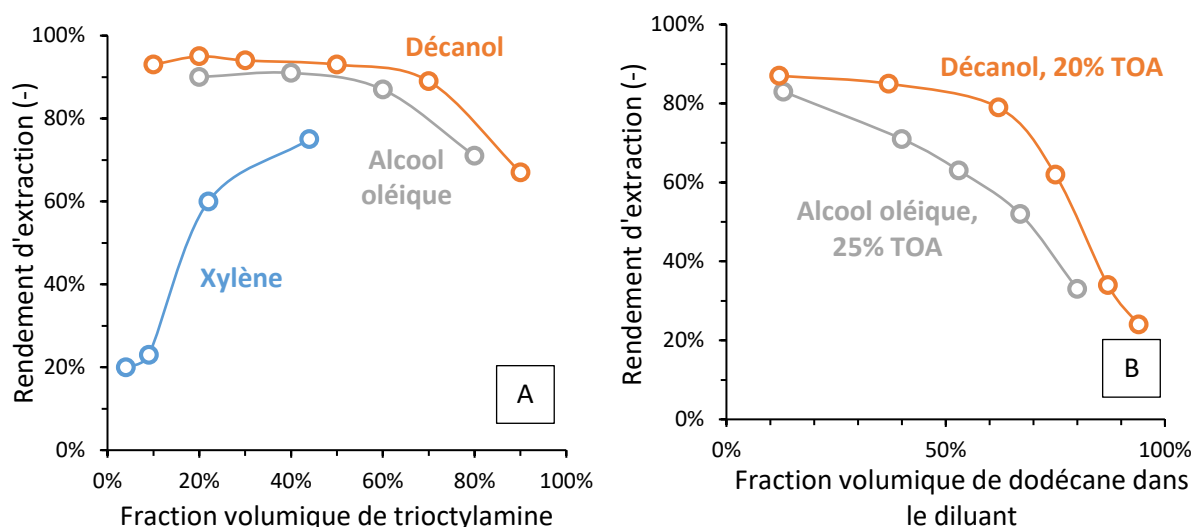


Figure 31 : Rendements d'extraction d'acide lactique en fonction de la concentration en extractant pour différents diluants purs (A) et rendement d'extraction en fonction de la fraction volumique de dodécane dans le diluant pour différents solvants actifs avec une teneur en extractant fixe (B)

Le tableau 11 présente les résultats avec des diluants binaires constitués d'un solvant actif et d'un solvant inerte dans différentes proportions, ici le dodécane. De manière générale, l'ajout d'un solvant inerte aura tendance assez logiquement à diminuer l'efficacité d'extraction d'un solvant actif et ce phénomène est illustré en figure 31B reprenant certaines données du tableau 11. Ce qu'il est intéressant de remarquer est que le décanol semble conserver son efficacité d'extraction sur une plage plus grande d'ajout de solvant inerte an comparaison de l'alcool oléique, probablement parce que ses propriétés de solvant actif sont meilleures que celles de l'alcool oléique.

Tableau 11 : résultats d'extractions liquide-liquide réactive d'acide lactique pour des diluants binaires alcool-dodécane

Solvant actif	Extractant	Taux de solvant actif dans diluant	Concentration initiale	Rendement	Ref
Alcool oléique	25% TOA	20%	10 g/L	33%	[50]
		33%	10 g/L	52%	[50]
		47%	10 g/L	63%	[50]
		60%	10 g/L	71%	[50]
		87%	10 g/L	83%	[50]

Décanol	10% TOA	78%	9 g/L	85%	[68]
	20% TOA	6%	9 g/L	24%	[68]
		13%	9 g/L	34%	[68]
		25%	9 g/L	62%	[68]
		38%	9 g/L	79%	[68]
		63%	9 g/L	85%	[68]
		88%	9 g/L	87%	[68]
Octanol	15% TOA	18%	8 – 9 g/L	50%	[69]
	20% TOA	25%	8 – 9 g/L	60%	[69]
	30% TOA	43%	8 – 9 g/L	88%	[69]
	40% TOA	67%	8 – 9 g/L	92%	[69]

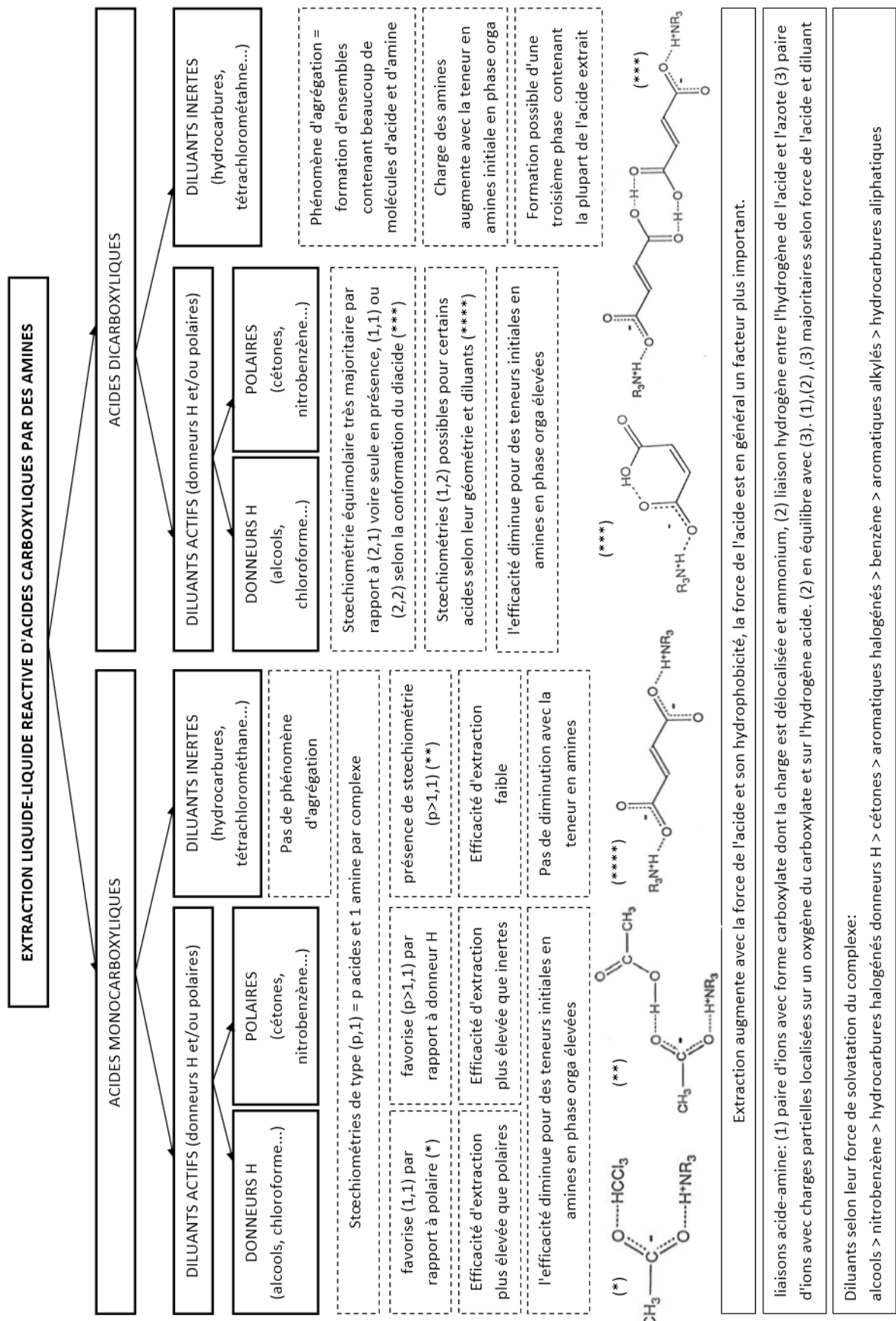
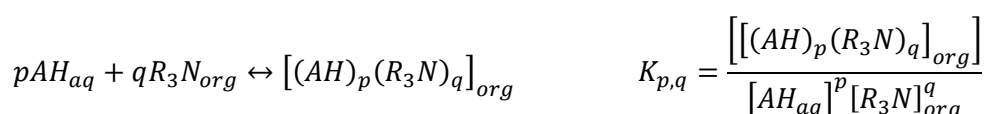


Figure 32 : Schéma résumant les mécanismes d'extraction réactive d'acides par des amines tertiaires

Si les mécanismes sont plus ou moins connus, il est indispensable d'avoir une approche quantifiable pour pouvoir caractériser et prédire les résultats de l'extraction, c.-à-d. les états d'équilibre.

### 3.2.3. Modélisation de l'état d'équilibre de l'extraction réactive

Plusieurs méthodes ont été décrites permettant de modéliser et prédire l'état d'équilibre de l'extraction réactive. La méthode la plus utilisée est le modèle dit « chimique » qui stipule que l'acide est extrait par l'amine dans des complexes de stœchiométrie bien définie. Les équilibres des réactions de complexation impliquées sont alors définis par des constantes d'équilibres qui relient directement les concentrations des différentes espèces entre elles [36]:



Cependant, les constantes d'équilibres sont *a priori* inconnues et il faut alors les déterminer à partir des résultats expérimentaux et des bilans de matière sur l'acide et l'amine.

A l'équilibre, dans la phase organique, l'acide est présent sous toutes ses formes complexées dues à l'extraction réactive ainsi que sous sa forme libre due au simple partage physique. Etant donné que la phase organique est constituée initialement de 2 espèces, l'amine et le solvant, le partage physique de l'acide est calculé simplement par rapport à la fraction volumique de solvant de manière additive. Ceci conduit donc aux bilans matières suivants :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{acide introduit} = \text{acide en phase aqueuse} + \text{acide en phase organique} + \text{formes complexées} \\ [AH_{aq}]_{ini} = [AH_{aq}] + \frac{\varphi V_{org}}{V_{aq}} \times m[AH_{aq}] + \frac{V_{org}}{V_{aq}} \times \sum_{p=1}^P p \times \left( \sum_{q=1}^Q K_{p,q} [R_3N_{org}]^q \right) [AH]^p \\ \\ \left\{ \begin{array}{l} \text{amine introduite} = \text{amine libre} + \text{formes complexées} \\ [R_3N_{org}]_{ini} = [R_3N_{org}] + \sum_{q=1}^Q q \times \left( \sum_{p=1}^P K_{p,q} [AH]^p \right) [R_3N_{org}]^q \end{array} \right. \end{array} \right.$$

- $[AH_{aq}]$  et  $[R_3N_{org}]$  sont les concentrations à l'équilibre de l'acide en phase aqueuse et l'amine libre en phase organique respectivement
- p et q sont les différents coefficients stœchiométriques possibles pour l'acide et l'amine respectivement dans les différents complexes
- P et Q sont les plus grands coefficients stœchiométriques envisagés pour l'acide et l'amine respectivement dans le plus grand complexe
- $\varphi$  est la fraction volumique de solvant dans la phase organique initialement

- $m$  est le coefficient de partage de l'acide entre le solvant et l'eau
- $V_{aq}$  et  $V_{org}$  sont les volumes de la phase aqueuse et de la phase organique respectivement

On obtient alors un système à deux équations et deux inconnues : la concentration en acide en phase aqueuse et en amine libre en phase organique à l'équilibre. Ce système peut être résolu par traitement informatique si l'on connaît les valeurs des constantes d'équilibre ou, à l'inverse, si on connaît l'état d'équilibre il peut servir à la détermination des constantes d'équilibre par procédures d'ajustement.

Pour déterminer les constantes d'équilibre, en pratique, on commence par poser les systèmes pour des couples de coefficients stœchiométriques ( $p:q$ ) simples tels que (1:1) ou (2:1) et si les résultats de l'ajustement ne sont pas satisfaisants alors les stœchiométries sont complexifiées jusqu'à obtenir un ajustement correspondant aux attentes. Il y a donc une subjectivité dans le choix de la stœchiométrie du complexe et il paraît alors indispensable de valider l'existence des structures supposées par exemple par spectroscopie infrarouge [33] ce qui est rarement observé dans la littérature.

Ce modèle, pourtant simple à aborder, est assez puissant car il permet de présupposer des structures de complexes (stœchiométrie) et représente bien les résultats d'extraction dans les gammes de concentrations utilisées pour l'ajustement. Toutefois, il n'est valable que lorsque les interactions fortes dites « chimiques » entre l'acide et l'amine sont extrêmement prédominantes sur les autres interactions, relativement plus faibles, dites physiques par exemple avec le diluant ou entre complexes [36]. Dans ce cas, des modèles dits « physicochimiques » doivent être utilisés pour rendre compte des interactions entre les molécules.

Deux types de modèles s'offrent alors. La première solution est de réaliser un modèle thermodynamique rigoureux qui prend en compte les activités des espèces et non leur concentration et qui s'attache donc à déterminer les coefficients d'activité [37]. Cette solution s'avère rapidement très compliquée. En effet, il convient alors de déterminer l'intensité de l'interaction entre chaque type de molécule et si l'on considère, pour simplifier, que les molécules n'interagissent que deux à deux et que ces interactions sont symétriques, évaluer cette interaction correspond à déterminer un paramètre d'interaction binaire. Toutes les molécules doivent donc être considérées et le nombre de paramètres à déterminer devient très vite très grand. Ainsi, à supposer qu'il n'y a qu'un seul complexe formé, cela revient à prendre en compte 5 espèces : le complexe, l'amine, l'acide, le solvant et l'eau. Il y aura les paramètres d'interaction complexe-solvant, complexe-amine, solvant-solvant, solvant-eau, complexe-acide etc. Pour simplifier la procédure, certains paramètres sont déterminés indépendamment et d'autres sont tout simplement négligés à la lumière des résultats expérimentaux pour n'en garder qu'une poignée à l'ajustement. Probablement dû à la complexité de cette approche, elle n'a que rarement été mise en œuvre [37,58,73].

Une autre méthode permet de prendre en compte l'influence du solvant utilisé sur les grandeurs thermodynamiques cherchées, il s'agit de la relation linéaire de l'énergie de solvation, en anglais Linear Solvation Energy Relationship (LSER) [74]. Pour simplifier, il s'agit de considérer que l'action d'un solvant sur un paramètre thermodynamique peut être décrite par une application linéaire dont les coefficients dépendent de valeurs intrinsèque à chaque soluté et à chaque solvant. Ces valeurs caractéristiques sont appelées paramètres solvatochromiques et sont tabulées pour quelques solvants. L'équation à utiliser pour un paramètre thermodynamique X est la suivante :

$$X = X^0 + s(\pi^* + d\delta) + a\alpha + b\beta + h\delta_H + e\xi$$

Les lettres grecques font référence aux paramètres du solvant et les lettres latines à ceux du soluté. Ces paramètres font références à des propriétés physicochimiques spécifiques qui influent sur les propriétés de solvation.  $\pi^*$  correspond à la polarisabilité du solvant, à son caractère dipolaire, c'est-à-dire sa capacité à stabiliser les charges ou les dipôles par des effets diélectriques.  $\delta$  est un facteur correctif pour certains solvants particuliers tels que les solvants chlorés ou aromatiques.  $\alpha$  caractérise la qualité de donneur de proton du solvant pour réaliser une liaison hydrogène solvant-soluté.  $\beta$  caractérise la qualité d'accepteur de proton (ou donneur d'électrons) du solvant pour réaliser une liaison hydrogène soluté-solvant.  $\delta_H$  est le paramètre de solubilité de Hildebrand, il représente les interactions solvant-solvant qui sont interrompues lors de la création d'une cavité pour accueillir le soluté. Enfin  $\xi$  représente l'échelle de la capacité à réaliser des liaisons covalentes de coordination. Les paramètres du soluté eux caractérisent sa réponse face aux propriétés physicochimiques correspondantes du solvant. Tous ces paramètres sont intrinsèques à chaque composé et il ne s'agit en aucun cas de les ajuster pour chaque solvant comme on peut le trouver faussement dans la littérature. Il s'agit de trouver des valeurs universelles.

Bizek et al [44] ont utilisé cette relation. Les constantes de complexation  $K_{p,q}$  étaient les paramètres thermodynamiques du modèle qui a été utilisé pour déterminer l'influence de 7 solvants simultanément. Ces auteurs ont ainsi pu décrire les variations des constantes d'équilibres pour 7 solvants différents présentant des caractéristiques complètement différentes (alcool, cétone, chloré, aromatique). Cela rend potentiellement possible de prédire les constantes d'équilibres dans n'importe quel solvant du moment que ses paramètres solvatochromiques sont tabulés. Cette méthode est très puissante quand elle est utilisée correctement mais elle suppose l'ajustement des paramètres sur de nombreux solvants afin d'avoir la garantie d'obtenir des valeurs universelles sans biais d'ajustement. De plus il faut que les paramètres solvatochromiques des solvants envisagés pour l'ajustement et pour la prédiction souhaitée soient disponibles, ce qui réduit la potentialité d'utilisation de la méthode.

### 3.3. L'extraction liquide-liquide réactive en ISPR

#### 3.3.1. Exemples de mise en oeuvre

Ainsi, l'extraction liquide-liquide réactive par des amines semble une technique intéressante pour extraire les acides carboxyliques des milieux de bioconversion en même temps qu'ils sont produits afin d'éviter leur toxicité sur les microorganismes. De nombreux exemples fructueux ont été mis en place depuis les années 80. Le tableau 12 recense quelques exemples trouvés dans la littérature.

Tableau 12 : Exemples de bioconversions extractives par extraction réactive avec des amines

Microorganisme	Acide produit	Phase organique	pH	contacteur	Gain/témoin	Ref.
<i>M. elsdenii</i>	Butyrique + hexanoïque	10% TOA dans alcool oléique	6,3	Contacteur à membrane*	Pas de témoin (plus hauts rendement et productivité de la littérature)	[75]
<i>R. oryzae</i> (F)	Fumarique	40% Alamine 336 + 10% Aliquat 336 dans kérosène	4	Colonne agitée	Productivité x2,1	[76]
<i>L. Fructivorans</i> (l)	Lactique	20% TOA dans décanol		Réservoir agité	Productivité x1,3	[77]
<i>S. cerevisiae</i> (F)	Lactique	30% tridécylamine dans alcool oléique	3,5	Colonne	Productivité x1,2 (problème de filtration)	[66]
<i>S. cerevisiae</i>	Lactique	33% tridécylamine dans alcool oléique	2,5	Phase organique dans bioréacteur	Productivité x1,8 jusqu'à arrêt de la production dû au contact des phases	[78]
<i>C. tyrobutyricum</i> (l)	Butyrique	10% Alamine 336 dans alcool oléique	5,5	Contacteur à membrane*	Productivité x1,1	[79]
<i>L. delbrueckii</i> (l)	Lactique	15% Alamine 336 dans alcool oléique	-	Phase dans bioréacteur	Productivité x2,5	[80]
<i>P. thoenii</i> (l)	Propionique	40% tridodécylamine dans alcool oléique	5,5	Contacteur à membrane	Productivité x1,1 Rendement x2	[81]
<i>P. acidipropionici</i>	Propionique	4% ditridécylamine dans alcool oléique	4,8	Contacteur à membrane*	Productivité x5	[82]
<i>L. delbrueckii</i> (F)	Lactique	40% Alamine 336 dans alcool oléique	4,2	Mélangeur-décanteur	Productivité x1,6	[83]
<i>L. delbrueckii</i> (F)	Lactique	40% Alamine 336 dans alcool oléique	4,2	Mélangeur-décanteur	Productivité x1,4	[84]
<i>P. acidipropionici</i> (l)	Propionique	40% Alamine 336 dans 2-octanol	4,8	Colonne garnie	Productivité x2	[85]
<i>L. delbrueckii</i> (l)	Lactique	15% Alamine 336 dans alcool oléique	4,2	Mélangeur décanteur	Productivité x1,7	[86]

(F) Maintien des microorganismes dans le bioréacteur par filtration avant l'étape d'extraction, (l) cellules immobilisées, *M*: *Megasphaera*, *R*: *Rhizopus*, *L*: *Lactobacillus*, *S*: *Saccharomyces*, *C*: *Clostridium*, *P*: *Propionibacterium*. \*Extraction couplée avec une étape de dés extraction (régénération)

A la lumière des données de ce tableau, on peut voir que l'utilisation de l'extraction liquide-liquide réactive comme méthode de récupération de produit *in-situ* semble augmenter les productivités et les rendements en acide par rapport aux expérimentations témoins (sans ISPR). Cependant, étant donné que les microorganismes, les modes de conduite des bioréacteurs et les témoins réalisés sont très



différents à chaque fois, les chiffres sont difficilement comparables entre eux. Un exemple est intéressant pour illustrer l'effet pH. Dans le cas de l'acide butyrique avec *C. tyrobutyricum* [79], la fermentation est favorisée à pH 6 alors qu'étant donné les mécanismes de l'extraction réactive celle-ci n'extrait que la forme protonnée de l'acide. Ceci explique pourquoi le gain de productivité lors de la fermentation extractive est seulement de 10% par rapport au témoin à pH 6 car elle a permis de maintenir le pH à seulement 5,5. Si on la compare à une fermentation menée à pH 5,5, le gain de productivité est alors de 44%.

Les efficacités d'extraction et de fermentation varient donc inversement avec le pH et cela limite les capacités des procédés couplés. Souvent, comme on peut le voir dans le tableau, le pH utilisé pour le procédé est un compromis avec une valeur intermédiaire pas trop acide pour les microorganismes et pas trop neutre pour l'extraction. Les évolutions biotechnologiques récentes permettant de produire des acides organiques à pH inférieurs à leur  $pK_A$ , comme montré dans la première partie de ce chapitre, viennent alors résoudre en partie ce problème et ravivent l'intérêt pour cette technique de fermentation extractive. *S. cerevisiae* modifiée pour la production d'acide lactique est un bon exemple présenté dans le tableau. La souche est capable de transformer le glucose à des pH inhabituellement faibles et est très prometteuse pour l'extraction réactive. Toutefois, les expériences citées n'ont pas permis d'obtenir des gains de productivité très élevés à cause de problèmes expérimentaux dus soit à la toxicité du solvant en contact direct soit à l'accumulation des cellules dans le module de filtration lors de l'étape de séparation avant contact liquide-liquide.

Un deuxième fait notable est que dans la plupart des cas, le diluant utilisé pour l'amine est l'alcool oléique. Ceci est dû au fait que l'alcool oléique n'a pas de toxicité apparente sur les microorganismes utilisés. En effet, pour la mise en place d'un procédé ISPR d'extraction liquide-liquide réactive, la phase organique doit entrer en contact avec la phase aqueuse du milieu de fermentation pour extraire le produit. Ceci implique que la toxicité des espèces organiques utilisées sur les microorganismes producteurs ne doit pas être trop importante.

### 3.3.2. Problème de la toxicité de la phase organique

Une vague tendance générale dit que la toxicité de la phase organique dépend de sa polarité. Une évaluation de la polarité d'un solvant est couramment faite par la valeur de son coefficient de partage octanol/eau  $P$ , en pratique de son logarithme  $\log P$ . Des solvants polaires ou peu polaires,  $\log P < 2-3$ , sont alors considérés comme toxiques tandis que les solvants apolaires,  $\log P > 4-5$ , ne sont pas considérés comme toxiques [87]. Ainsi les solvants actifs auront tendance à être toxiques pour les microorganismes tandis que les diluants inertes n'auront pas d'effet particulier [88,89], ce qui va à l'encontre de l'efficacité de l'extraction réactive. Cependant, les exceptions à la règle sont nombreuses

car la toxicité dépend du microorganisme utilisé, avec souvent des variations très importantes entre espèces voire même entre les différentes souches de la même espèce. Ainsi, par exemple, la souche de *Lactobacillus fructivorans* NRIC 0224 est-elle très sensible au dodécanol alors que la souche *Lactobacillus fructivorans* NRIC 1814 l'est beaucoup moins.

Deux types de toxicité sont généralement admises : (i) la toxicité de contact direct avec le solvant en tant que seconde phase et (ii) la toxicité due à la solubilité, même faible, du solvant dans la phase aqueuse. Les mesures de ces toxicités sont variables selon les études. Il peut s'agir de la capacité des microorganismes à croître [90,91], la capacité à consommer un substrat [88] ou à produire des métabolites cibles [88,89] ou en encore la mesure d'une activité enzymatique spécifique ou de l'état de la membrane cellulaire en présence de l'espèce chimique dont la toxicité est évaluée [92]. Pour montrer un exemple de différence entre familles et espèces de microorganismes, le tableau 13 détaille l'exemple de l'influence de la fraction soluble en dodécanol sur *Lactobacillus delbrueckii* (bactérie productrice d'acide lactique), *Acetobacter aceti* (bactérie productrice d'acide acétique), *Aspergillus niger* (champignon filamenteux producteur d'acide citrique) et *Saccharomyces cerevisiae* (levure productrice d'éthanol).

Tableau 13 : évaluation de la toxicité d'un milieu saturé en dodécanol sur différents microorganismes

Impact d'un milieu aqueux saturé en dodécanol			
<i>L. delbrueckii</i> ATCC 9649 [88]	<i>A. aceti</i> ATCC 23746 [88]	<i>A. niger</i> ATCC 11414 [88]	<i>S. cerevisiae</i> UG5 [18]
- Pas d'impact sur la consommation de glucose	- Temps de latence x2 - Rendement en acide x0,3	- Temps de latence x4 - Rendement en acide x0,18 - formation de petits pellets filamenteux	- Pas d'impact sur la consommation de glucose - Pas d'impact sur la croissance - Pas d'impact sur la production d'éthanol

Bar et Gainer [88] expliquent cette différence de comportement vis-à-vis des solvants par les différences structurales des membranes cellulaires entre ces différents microorganismes. Les bactéries lactiques sont à Gram + ce qui signifie que leur membrane possède une couche externe rigide de peptidoglycanes contrairement à *A. aceti* qui est à Gram -, elles seraient donc beaucoup moins impactées. Les levures quant à elles possèdent une paroi rigide de chitine, ce qui expliquerait pourquoi elles seraient indifférentes au dodécanol également. La croissance mycéliale du champignon filamenteux en présence du solvant a montré la formation de filaments et petits pellets contrairement au contrôle où les filaments n'étaient pas visibles et les pellets 5 fois plus gros.

Cependant, cette explication globale paraît bien simple et des disparités de résistance aux solvants se font remarquer même parmi les souches de mêmes espèces avec des types de membranes similaires

[77,89]. La compréhension de la toxicité pourrait alors résider dans la composition fine des membranes cellulaires. Le solvant en parvenant à pénétrer dans la cellule pourrait interagir avec les composants biologiques tels que les enzymes et ainsi interférer avec le métabolisme. De plus, certains solvants, comme les alcools aliphatiques, sont des composés tensioactifs ce qui pourrait perturber la perméabilité des membranes cellulaires et induire des fuites de métabolites et entraver les mécanismes de transport. Quand le solvant en tant que phase organique est présent en contact direct avec les bactéries, il est souvent observé une perte rapide de l'activité catalytique et les cellules ont alors tendance à s'agréger à l'interface liquide-liquide [3]. Par conséquent, le dodécanol en contact direct inhibe totalement la consommation de substrat même chez les microorganismes résistants au niveau moléculaire comme *L. delbrueckii* [88].

Matsumoto [77,89] a testé l'impact sur les bactéries productrices d'acide lactique de l'ajout d'1%v/v (supérieur à la limite de solubilité des solvants sauf pour le butanol et le pentanol) et a mesuré la production d'acide lactique par rapport à un témoin sans ajout de solvant. Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Evaluation de la toxicité de différents alcools sur différentes bactéries productrices d'acide lactique par ajout de 1%v/v dans le milieu de fermentation

	<i>L. homohiochi</i> NRIC 0119	<i>L. homohiochi</i> NRIC 1815	<i>L. fructivorans</i> NRIC 0224	<i>L. fructivorans</i> NRIC 1814	<i>B. coagulans</i> NBRC 12583
butanol	+	+	+	+	+
pentanol	-	-	-	+	-
hexanol	-	-	-	-	-
octanol	-	-	-	-	-
décanol	-	-	+	-	n.d.
dodécanol	+	+	-	+	+

+ production d'acide lactique supérieure à 50% du témoin sans ajout de solvant

- production d'acide lactique inférieure à 50% du témoin sans ajout de solvant

De façon surprenante, une souche de *L. fructivorans* résiste mieux que les autres au décanol qui a ainsi pu être utilisé en fermentation extractive pour la production d'acide lactique [77]. On peut voir que toutes les bactéries du tableau sont impactées très négativement par l'hexanol et l'octanol tandis que pour les autres alcools la résistance dépend du microorganisme. Cependant, cela ne signifie pas que l'octanol est délétère pour toutes les bactéries. Par exemple, une souche de *Pseudomonas putida* a été utilisée de façon fructueuse pour la production de composés phénoliques avec une seconde phase d'octanol [93] ou de décanol [94] directement ajoutée dans le bioréacteur.

De plus, dans certains cas, il est possible que la toxicité soit due non pas à l'espèce chimique étudiée mais à ses impuretés. Par exemple, lors de la fermentation extractive d'acide lactique par une souche de *S. cerevisiae* modifiée, l'utilisation de la tridécylamine comme extractant dans l'alcool oléique s'est

révélée extrêmement toxique [66]. L'analyse poussée de l'extractant a montré qu'en réalité ce n'était pas l'amine tertiaire qui était toxique mais une impureté, le décylaldéhyde, présent à hauteur de 0,07% massique dans l'extractant. En réduisant la teneur en décylaldéhyde à 0,0033%, la toxicité de la tridécylamine est devenue négligeable. A notre connaissance, il s'agit de la seule étude ayant traité aussi profondément le problème des impuretés. La plupart des études utilisent les produits commerciaux directement ou alors effectuent de simples lavages à l'eau, qui, dans le cas du décylaldéhyde, se seraient probablement montrés inefficaces.

Par conséquent, on voit bien qu'il n'est pas aisé de généraliser et il convient de réaliser des tests préliminaires sur les microorganismes envisagés pour la bioconversion voulue en vérifiant bien la pureté des produits utilisés.

Cependant, le plus souvent, les solvants actifs auront tout de même tendance à être toxiques en contact direct et certains solvants forment des émulsions en présence du milieu de bioconversion [2,18] ce qui empêche la mise en place de procédés continus et nécessite des étapes supplémentaires pour casser l'émulsion. Ces deux inconvénients peuvent être réduits par l'utilisation de contacteurs à membrane lors de la fermentation extractive par extraction liquide-liquide réactive [7,75,82,90].

### 3.4. Les contacteurs liquide-liquide à membrane

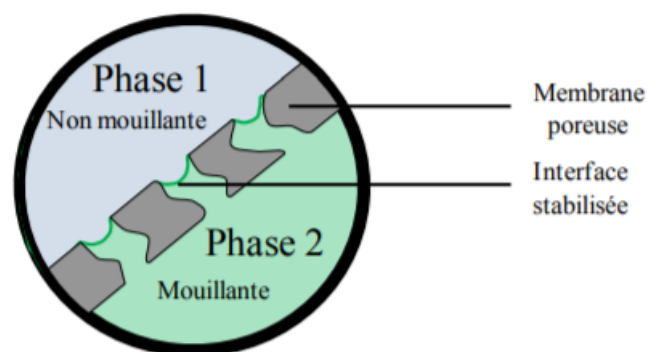
#### 3.4.1. Généralités

Les contacteurs à membrane sont des unités permettant de mettre en contact deux fluides non miscibles à l'aide d'un matériau membranaire. Le fluide ayant le plus d'affinité avec le matériau membranaire remplit les pores de la membrane tandis que l'autre fluide n'ayant pas les propriétés nécessaires pour mouiller le matériau reste à l'entrée du pore (Figure 33). Ainsi l'interface entre les phases est stabilisée à l'entrée des pores de la membrane et les échanges entre phases peuvent avoir lieu. Pour empêcher le fluide mouillant le matériau de traverser la membrane, une pression doit être appliquée par le fluide non mouillant afin de bloquer la sortie des pores en se plaquant contre la surface de la membrane. Si la différence de pression appliquée de part et d'autre de la membrane est trop faible alors le fluide mouillant traversera la membrane et se dispersera dans le fluide non mouillant. Toutefois, si la différence de pression appliquée est trop forte, le fluide non mouillant finira par forcer le passage et traverser lui-même le matériau [95]. En contacteur liquide-liquide, si le matériau est hydrophobe, les pores seront remplis par la phase organique tandis que si le matériau est hydrophile les pores seront plutôt remplis par la phase aqueuse. La différence de pression à partir de laquelle le fluide non mouillant est capable de traverser les pores de la membrane est appelée la pression critique. En considérant que les pores se comportent comme des capillaires (forme

cylindrique uniforme, assez petit pour avoir un rayon de courbure constant), cette pression critique peut être estimée par l'équation de Young-Laplace [96]:

$$\Delta P_c = -\frac{2\gamma \times \cos \theta}{r}$$

Où  $\gamma$  est la tension de surface entre les deux fluides,  $\theta$  l'angle de contact au point triple entre les deux fluides et le matériau membranaire et  $r$  le rayon du pore considéré. Il s'agit alors de considérer le rayon des pores les plus gros, et non le rayon moyen, afin d'éviter de dépasser la pression critique à cause de la distribution de la taille de pores de la membrane.



*Figure 33 : Schéma représentant le principe de fonctionnement d'un contacteur membranaire au niveau des pores de la membrane à l'interface entre les phases*

Les contacteurs à membrane ont trouvé de nombreuses applications dans les domaines des contacts gaz-liquide et liquide-liquide. Pour les contacts gaz-liquide il peut s'agir par exemple de la carbonatation des boissons, de l'oxygénation du sang [97] ou encore du piégeage de CO<sub>2</sub> [98]. Pour les contacteurs liquide-liquide, les applications sont aussi extrêmement variées allant de l'extraction de composés d'arômes [99], de protéines [100], d'acides carboxyliques [101] à la résolution de mélanges racémique [102] ou encore à la purification de carburant [103].

Les contacteurs membranaires présentent de nombreux avantages [97]. La surface de contact entre les deux fluides ne varie pas en fonction des débits, ils ne sont pas sujet à l'engorgement étant donné que les deux phases sont indépendantes. Comme l'interface est stabilisée au niveau des pores de la membrane et que le contact n'est pas dispersif, il n'y a pas de formation d'émulsion. De plus, le principe de séparation des phases ne repose pas sur la différence de densité des fluides, et il n'y a donc pas de contrainte sur ce paramètre. La mise à l'échelle des contacteurs membranaires est aisée et linéaire par rapport à la surface membranaire. Le fonctionnement d'une unité de production peut être modulaire en utilisant peu ou beaucoup de modules à la fois. La surface offerte au transfert est connue et constante (en dehors des phénomènes d'encrassement). La rétention liquide des modules est souvent faible et ils ne contiennent aucune partie mouvante. Enfin, ils proposent une très grande

compacité avec une très grande surface de contact due au matériau membranaire, généralement entre 1000 et 7000 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>. Ce qui est bien plus élevé que les contacteurs traditionnels comme les colonnes garnies ou à plateaux (30 – 300 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>) ou les colonnes agitées (150 – 500 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>).

Toutefois, la durée de vie des membranes est finie, ce qui nécessite des remplacements périodiques et les colles d'empotage des fibres peuvent être vulnérables aux solvants. Etant donné que la stabilité de l'interface dépend de la différence de pression entre les deux phases, le système peut être sensible aux pertes de charge. A grande échelle, pour des modules pas très bien conçus, la calandre peut être sujette à des problèmes de passages préférentiels réduisant l'efficacité du transfert. La membrane peut être le siège d'encrassement (fouling), particulièrement d'encrassement biologique mais le fait qu'il n'y ait pas de flux convectif à travers la membrane limite beaucoup ce phénomène. Enfin, le matériau membranaire, contenant un liquide fixe dans ses pores dans lequel le mécanisme de transport est la diffusion moléculaire, induit une résistance au transfert de matière qui n'existe pas dans les appareils conventionnels. Cependant, ce problème est contrebalancé par la très grande surface d'échange et de toute façon dans certains cas la résistance de la membrane peut être négligeable en fonction du coefficient de partage du soluté à extraire. Ainsi, dans la plupart des cas l'efficacité d'extraction est supérieure à celle des appareils conventionnels avec des hauteurs d'unité de transfert (HUT) plus petites et des coefficients de transfert volumétrique (usuellement appelés  $k_L a$ ) plus élevés [97]. De plus, l'avantage mentionné de la facilité de mise à l'échelle par la linéarité du dimensionnement peut également être un désavantage car cela signifie un gain limité dû à l'augmentation de la taille des installations alors que si on considère qu'en général pour un procédé le coût est proportionnel au facteur d'échelle puissance 0,6, il y a un intérêt évident à monter en échelle [104].

La géométrie de contacteur la plus étudiée est les fibres creuses [97] car ils sont d'une grande compacité pour de potentielles applications industrielles [95] avec une forte densité du réseau de fibres dans le module [104]. La configuration est à l'image d'un échangeur de chaleur à tubes et calandre. Les fibres traversent la calandre axialement de part en part. Un fluide circule dans les fibres, un autre dans la calandre et le contact se fait au niveau du matériau poreux des fibres.

#### 3.4.2. Transfert de matière dans les contacteurs liquide-liquide à membrane à fibres creuses

Le transfert de matière dans un contacteur à membrane peut être décrit par des modèles du genre films liquides et est généralement décrit en 3 étapes [95]: (i) transport dans une couche limite côté aqueux, (ii) diffusion dans les pores de la membrane, et (iii) transport dans une couche limite côté organique. Le flux de matière peut également être décrit par un coefficient de transfert de matière

global. Il est alors défini comme le coefficient de proportionnalité entre le flux (quantité de matière par unité de temps) et la force motrice globale et si on se place du côté de la phase aqueuse :

$$J = k_{aq,T} \times A \times (C_{aq} - C_{aq}^*)$$

Où  $J$  est le flux de matière,  $k_{aq,T}$  est le coefficient de transfert global par rapport à la phase aqueuse,  $A$  est la surface d'échange,  $C_{aq}$  est la concentration du soluté en phase aqueuse et  $C_{aq}^*$  est la concentration du soluté en phase aqueuse qui serait en équilibre avec la concentration du soluté effectivement présente en phase organique. Le flux peut donc se récrire comme suit :

$$J = k_{aq,T} \times A \times \left( C_{aq} - \frac{C_{org}}{P} \right)$$

Avec  $P$  le coefficient de partage :

$$P = \frac{C_{org}^{eq}}{C_{aq}^{eq}}$$

En supposant l'égalité des flux dans les trois couches limites (aqueuse, pores de la membrane, organique) et l'équilibre à l'interface, on peut montrer que, si  $P$  est constant, dans un contacteur à fibres creuses hydrophobes avec la phase aqueuse circulant dans les fibres (configuration que nous utiliserons dans la partie expérimentale de ce manuscrit), la relation donnant le coefficient de transfert de matière global est :

$$\frac{1}{k_{aq,T}} = \frac{1}{k_{aq}} + \frac{1}{Pk_m} \cdot \frac{d_{int}}{d_{lm}} + \frac{1}{Pk_{org}} \cdot \frac{d_{int}}{d_{out}}$$

Avec  $k_{aq}$  le coefficient de transfert local côté aqueux,  $k_m$  le coefficient de transfert dans les pores de la membrane,  $k_{org}$  le coefficient de transfert côté organique,  $d_{int}$  le diamètre interne des fibres,  $d_{out}$  le diamètre externe des fibres et  $d_{lm}$  le diamètre moyen logarithmique des fibres. Le diamètre moyen logarithmique est issu du fait que la fibre est de géométrie cylindrique et que dans la paroi de la fibre la surface de transfert change avec la distance radiale par rapport à l'axe du cylindre. En effet, la surface externe des fibres est plus grande que la surface interne. Il s'agit de l'équation des résistances en série et cette relation est largement reprise dans la littérature avec les relations analogues pour d'autres configurations ou des matériaux membranaires hydrophiles que nous ne détaillerons pas [95].

Le transport dans les pores de la membrane est supposé simplement diffusif et donc le coefficient de transfert est défini comme le ratio entre le coefficient de diffusion du soluté dans le solvant remplissant les pores et la distance parcouru le long du pore [95]. Le plus souvent, il y est inclus un terme correctif correspondant à la porosité de la membrane pour tenir compte du fait que la surface offerte au

transfert est seulement celle ouverte par les pores à condition de ne pas aussi inclure la porosité dans le calcul de la surface dans l'expression du flux.

$$k_m = \frac{\varepsilon D_{is}}{\tau_m e}$$

Où  $\varepsilon$  est la porosité de la membrane,  $D_{is}$  est le coefficient de diffusion du soluté dans le solvant remplissant les pores,  $\tau_m$  est la tortuosité de la membrane et  $e$  est l'épaisseur de la membrane. Le coefficient de transfert dans la membrane étant proportionnel au coefficient de diffusion, il est très influencé par la viscosité du fluide mouillant les pores du matériau. Le profil de concentration d'un soluté S au voisinage de la membrane est représenté sur la figure 34.

Pour le coefficient de transfert dans les fibres et dans la calandre, plusieurs relations entre nombres adimensionnels sont proposées, principalement les nombres de Sherwood, de Reynolds et de Schmidt. Pour le fluide contenu dans les fibres, le coefficient de transfert est souvent évalué par la relation de Lévêque :

$$Sh = 1,62 \times \left( Re \times Sc \times \frac{d_{int}}{L} \right)^{\frac{1}{3}}$$

Où L est la longueur des fibres.

Pour le coefficient de transfert dans le fluide contenu dans la calandre, une multitude de corrélations ont été développées [105] de la forme :

$$Sh = a \times Re^\alpha \times Sc^\beta \times f(\text{géométrie})$$

Avec  $a$  un coefficient de proportionnalité et  $f(\text{géométrie})$  un facteur lié à la géométrie du module utilisé.

Pour les modules Liqui-Cel 2.5x8 avec fibres X50 (Membrana, USA), une bonne corrélation pour estimer le coefficient de transfert est la relation de Kreith et Black [106] :

$$Sh = 0,39 \times Re^{0,61} \times Sc^{0,33}$$



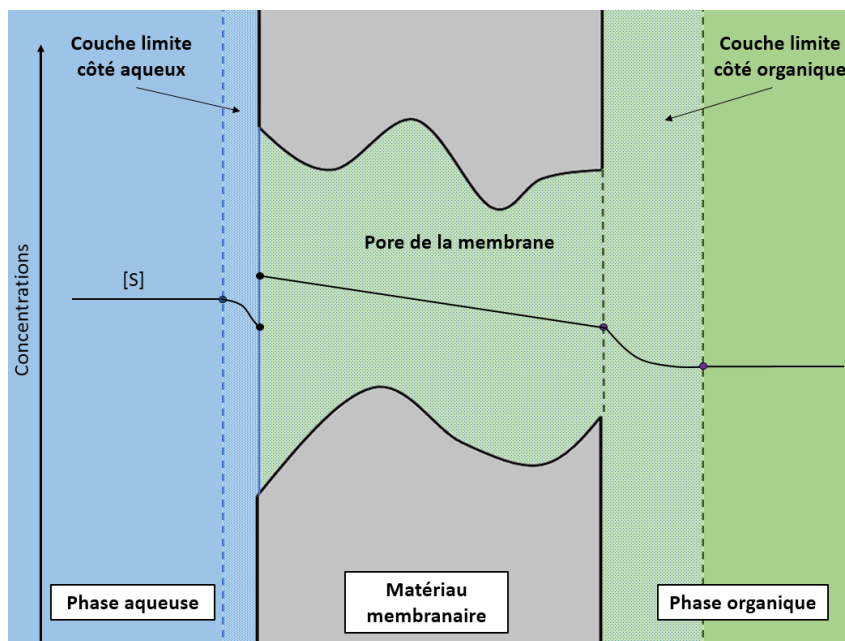


Figure 34 : Schéma détaillant le profil de concentration d'un soluté S au voisinage de la membrane lors d'une extraction liquide-liquide par contacteur membranaire

L'inverse du coefficient de transfert global est défini comme la résistance globale au transfert. Celle-ci ne dépend alors que de trois termes indépendants : la résistance côté aqueux, la résistance dans la membrane et la résistance côté organique.

$$R_T = \frac{1}{k_{aq,T}} \quad R_{aq} = \frac{1}{k_{aq}} \quad R_m = \frac{1}{Pk_m} \frac{d_{int}}{d_{lm}} \quad R_{org} = \frac{1}{Pk_{org}} \frac{d_{int}}{d_{out}}$$

Il est alors clair que si le coefficient de partage du soluté est très grand, les résistances de la membrane et de la phase organique peuvent s'avérer négligeables ce qui a été observé expérimentalement [107].

### 3.4.3. Précisions pour le cas de l'extraction liquide-liquide réactive

Plusieurs études ont traité le cas de l'extraction réactive d'acides organiques par contacteur membranaire et prouvé son efficacité [75,79,82,101,108–110]. Imaginons un système réactif avec un cas simple : une complexation à l'interface entre une molécule d'amine en phase organique et une molécule d'acide en phase aqueuse pour former un complexe de stoechiométrie (1:1).



Où CPX est le complexe formé. Cherchons le coefficient de transfert de matière global. Pour cela, on fait les mêmes hypothèses que précédemment, c.-à-d. en supposant l'égalité des flux et l'équilibre à l'interface. Pour simplifier, on assimile la résistance de la phase organique seulement à celle de la membrane et on néglige le partage physique de l'acide. Cette fois, l'équilibre à l'interface est décrit

entre trois espèces et fixé par la constante d'équilibre de complexation [111]. L'équation du flux deviendrait alors :

$$J = k_{aq,T} \times A \times \left( [AH] - \frac{[CPX]}{K_{11}[R_3N]} \right)$$

Cela donne :

$$\frac{1}{k_{aq,T}} = \frac{1}{k_{aq}} + \frac{1}{[R_3N]} \frac{d_{int}}{d_{lm}} \left( \frac{[AH_{int}]}{k_{R_3N,m}} + \frac{1}{K_{11}k_{CPX,m}} \right)$$

La résistance de la membrane devient alors :

$$R_m = \frac{1}{[R_3N]} \frac{d_{int}}{d_{lm}} \left( \frac{[AH_{int}]}{k_{R_3N,m}} + \frac{1}{K_{11}k_{CPX,m}} \right)$$

Où  $[AH_{int}]$  est la concentration de l'acide à l'interface,  $[R_3N]$  la concentration en amine libre dans la phase organique et  $k_{R_3N,m}$  et  $k_{CPX,m}$  les coefficients de transfert locaux de l'amine et du complexe dans les pores de la membrane respectivement. On voit que, pour ce cas simple, le coefficient de transfert global dépend des concentrations et donc rigoureusement dépend du temps puisque les concentrations de chaque espèce varient avec le temps. Il est alors difficile d'utiliser un coefficient de transfert global pour décrire les variations de concentration en système réactif. De façon intéressante, nous remarquons également qu'augmenter la concentration en acide devrait augmenter la résistance au transfert de matière dans la membrane et donc montrer une cinétique d'extraction plus lente tandis qu'augmenter la concentration en amine devrait diminuer la résistance au transfert et donc accélérer la cinétique.

## Références

- [1] W. Van Hecke, T. Hofmann, H. De Wever, Pervaporative recovery of ABE during continuous cultivation: Enhancement of performance, *Bioresource Technology*. 129 (2013) 421–429. doi:10.1016/j.biortech.2012.11.072.
- [2] D. Stark, T. Munch, B. Sonnleitner, I.W. Marison, U. von Stockar, Extractive Bioconversion of 2-Phenylethanol from L-Phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology Progress*. 18 (2002) 514–523. doi:10.1021/bp020006n.
- [3] V.M. Yabannavar, D.I. Wang, Bioreactor system with solvent extraction for organic acid production, *Annals of the New York Academy of Sciences*. 506 (1987) 523–535.
- [4] S. Ishii, M. Taya, T. Kobayashi, Production of butanol by *Clostridium acetobutylicum* in extractive fermentation system, *Journal of Chemical Engineering of Japan*. 18 (1985) 125–130.
- [5] W. Van Hecke, G. Kaur, H. De Wever, Advances in in-situ product recovery (ISPR) in whole cell biotechnology during the last decade, *Biotechnology Advances*. 32 (2014) 1245–1255. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.07.003.
- [6] U. von Stockar, A. Bruggink, eds., *Process integration in biochemical engineering*, Springer, Berlin, 2003.
- [7] M. Mihač, R. Goncalves, J. Markoš, Intensive 2-phenylethanol production in a hybrid system combined of a stirred tank reactor and an immersed extraction membrane module, *Chemical Papers*. 68 (2014). doi:10.2478/s11696-014-0575-1.
- [8] C. Miller, A. Fosmer, B. Rush, T. McMullin, D. Beacom, P. Suominen, Industrial Production of lactic acid, in: *Comprehensive Biotechnology*, 2nd ed., Elsevier, 2011: pp. 179–188.
- [9] J.N. Starr, G. Westhoff, Lactic Acid, in: *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (Ed.), Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2014: pp. 1–8. [http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a15\\_097.pub3](http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a15_097.pub3) (accessed November 22, 2016).
- [10] X. Wang, Y. Wang, X. Zhang, H. Feng, T. Xu, In-situ combination of fermentation and electro dialysis with bipolar membranes for the production of lactic acid: Continuous operation, *Bioresource Technology*. 147 (2013) 442–448. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.045.
- [11] P. Boontawan, S. Kanchanathawee, A. Boontawan, Extractive fermentation of l-(+)-lactic acid by *Pediococcus pentosaceus* using electrodeionization (EDI) technique, *Biochemical Engineering Journal*. 54 (2011) 192–199. doi:10.1016/j.bej.2011.02.021.
- [12] S.A. Ataei, E. Vasheghani-Farahani, In situ separation of lactic acid from fermentation broth using ion exchange resins, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 35 (2008) 1229–1233. doi:10.1007/s10295-008-0418-6.
- [13] A. Senthuran, V. Senthuran, R. Hatti-Kaul, B. Mattiasson, Lactate production in an integrated process configuration: reducing cell adsorption by shielding of adsorbent, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65 (2004) 658–663. doi:10.1007/s00253-004-1638-y.
- [14] J.M. Montegudo, M. Aldavero, Production of L-lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* in chemostat culture using an ion exchange resins system, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 74 (1999) 627–634.
- [15] B.G. Garrett, K. Srinivas, B.K. Ahring, Performance and stability of Amberlite™ IRA-67 ion exchange resin for product extraction and pH control during homolactic fermentation of corn stover sugars, *Biochemical Engineering Journal*. 94 (2015) 1–8. doi:10.1016/j.bej.2014.11.004.
- [16] M. Boonmee, O. Cotano, S. Amnuaypanich, N. Grisadanurak, Improved Lactic Acid Production by In Situ Removal of Lactic Acid During Fermentation and a Proposed Scheme for Its Recovery, *Arabian Journal for Science and Engineering*. 41 (2016) 2067–2075. doi:10.1007/s13369-015-1824-5.
- [17] E.N. Kaufman, S.P. Cooper, M.N. Budner, G.R. Richardson, Continuous and simultaneous fermentation and recovery of lactic acid in a biparticle fluidized-bed bioreactor, in: *Seventeenth*

- Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Springer, 1996: pp. 503–515.  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-0223-3\\_46](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-0223-3_46) (accessed October 3, 2017).
- [18] M. Minier, G. Goma, Ethanol production by extractive fermentation, *Biotechnology and Bioengineering*. 24 (1982) 1565–1579.
- [19] C. van den Berg, A.S. Heeres, L.A. van der Wielen, A.J. Straathof, Simultaneous clostridial fermentation, lipase-catalyzed esterification, and ester extraction to enrich diesel with butyl butyrate, *Biotechnology and Bioengineering*. 110 (2013) 137–142.
- [20] A.S. Kertes, C.J. King, Extraction Chemistry of Fermentation Product Carboxylic Acids, *Biotechnology and Bioengineering*. 28 (1986) 269–282.
- [21] J.M. Wardell, C.J. King, Solvent equilibriums for extraction of carboxylic acids from water, *Journal of Chemical and Engineering Data*. 23 (1978) 144–148.
- [22] Y. Marcus, *The properties of solvents*, Wiley, Chichester ; New York, 1998.
- [23] D. Datta, S. Kumar, Reactive Extraction of Glycolic Acid Using Tri-n-Butyl Phosphate and Tri-n-Octylamine in Six Different Diluents: Experimental Data and Theoretical Predictions, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 50 (2011) 3041–3048. doi:10.1021/ie102024u.
- [24] D. Pal, N. Thakre, A. Kumar, A. Keshav, Reactive extraction of pyruvic acid using mixed extractants, *Separation Science and Technology*. 51 (2016) 1141–1150. doi:10.1080/01496395.2016.1143508.
- [25] M. Matsumoto, T. Otono, K. Kondo, Synergistic extraction of organic acids with tri-n-octylamine and tri-n-butylphosphate, *Separation and Purification Technology*. 24 (2001) 337–342.
- [26] G. Kyuchoukov, D. Yankov, J. Albet, J. Molinier, Mechanism of lactic acid extraction with quaternary ammonium chloride (Aliquat 336), *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 44 (2005) 5733–5739.
- [27] A. Keshav, K.L. Wasewar, S. Chand, Reactive extraction of propionic acid using tri-n-octylamine, tri-n-butyl phosphate and Aliquat 336 in sunflower oil as diluent, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 484–489. doi:10.1002/jctb.2066.
- [28] A. Keshav, S. Chand, K.L. Wasewar, Recovery of propionic acid from aqueous phase by reactive extraction using quaternary amine (Aliquat 336) in various diluents, *Chemical Engineering Journal*. 152 (2009) 95–102. doi:10.1016/j.cej.2009.03.037.
- [29] I.M. Coelho, P. Silvestre, R.M.C. Viegas, J. Crespo, M.J.T. Carrondo, Membrane-based solvent extraction and stripping of lactate in hollow-fibre contactors, *Journal of Membrane Science*. 134 (1997) 19–32.
- [30] M.R. Pursell, M.A. Mendes-Tassis, D.C. Stuckey, Co-Extraction during Reactive Extraction of Phenylalanine using Aliquat 336: Interfacial Mass Transfer, *Biotechnology Progress*. 19 (2003) 469–476. doi:10.1021/bp025630e.
- [31] M. Moussa, G. Burgé, F. Chemarin, R. Bounader, C. Saulou-Bérion, F. Allais, H.-E. Spinnler, V. Athès, Reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid from model aqueous solutions and real bioconversion media. Comparison with its isomer 2-hydroxypropionic (lactic) acid, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2015) 2276–2285. doi:10.1002/jctb.4813.
- [32] J.A. Tamada, C.J. King, Extraction of Carboxylic Acids by Amines Extractant, Lawrence Berkeley Laboratory, CA (USA), United States, 1989.
- [33] J.A. Tamada, C.J. King, Extraction of Carboxylic Acids with Amine Extractants. 2. Chemical Interactions and Interpretations of Data, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 29 (1990) 1327–1333.
- [34] K.L. Wasewar, A.B.M. Heesink, G.F. Versteeg, V.G. Pangarkar, Equilibria and kinetics for reactive extraction of lactic acid using Alamine 336 in decanol, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 77 (2002) 1068–1075. doi:10.1002/jctb.680.
- [35] D. Pal, A. Tripathi, A. Shukla, K.R. Gupta, A. Keshav, Reactive Extraction of Pyruvic Acid Using Tri-n-octylamine Diluted in Decanol/Kerosene: Equilibrium and Effect of Temperature, *Journal of Chemical & Engineering Data*. 60 (2015) 860–869. doi:10.1021/je500964e.

- [36] J.A. Tamada, A.S. Kertes, C.J. King, Extraction of Carboxylic Acids with Amine Extractants. 1. Equilibria and Law of Mass Action Modeling, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 29 (1990) 1319–1326.
- [37] T. Kirsch, H. Ziegenfuss, G. Maurer, Distribution of citric, acetic and oxalic acids between water and organic solutions of tri-n-octylamine, *Fluid Phase Equilibria*. 129 (1997) 235–266.
- [38] L. Ahsan, M.S. Jahan, Y. Ni, Recovery of Acetic Acid from the Prehydrolysis Liquor of Kraft Based Dissolving Pulp Production Process: Sodium Hydroxide Back Extraction from the Trioctylamine/Octanol System, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 52 (2013) 9270–9275. doi:10.1021/ie401285v.
- [39] A.F. Tuyun, H. Uslu, Reactive extraction of acrylic acid using trioctylamine (TOA) in versatile diluents, *Desalination and Water Treatment*. 55 (2015) 193–198. doi:10.1080/19443994.2014.911707.
- [40] H. Uslu, Investigation of acrylic acid extractability from aqueous solution using tridodecyl amine extractant, *Desalination and Water Treatment*. 28 (2011) 189–195. doi:10.5004/dwt.2011.2246.
- [41] D. Datta, S. Kumar, K.L. Wasewar, Reactive Extraction of Benzoic Acid and Pyridine-3-Carboxylic Acid Using Organophosphoric and Aminic Extractant Dissolved in Binary Diluent Mixtures, *Journal of Chemical & Engineering Data*. 56 (2011) 3367–3375. doi:10.1021/je200332s.
- [42] Z. Li, W. Qin, Y. Dai, Liquid–Liquid Equilibria of Acetic, Propionic, Butyric, and Valeric Acids with Trioctylamine as Extractant, *Journal of Chemical & Engineering Data*. 47 (2002) 843–848. doi:10.1021/je015526t.
- [43] E. Sabolová, Š. Schlosser, J. Marták, Liquid–Liquid Equilibria of Butyric Acid in Water + Solvent Systems with Trioctylamine as Extractant, *Journal of Chemical & Engineering Data*. 46 (2001) 735–745. doi:10.1021/je000323a.
- [44] V. Bízek, J. Horáček, M. Kouřová, Amine extraction of citric acid: effect of diluent, *Chemical Engineering Science*. 48 (1993) 1447–1457. doi:10.1016/0009-2509(93)80051-Q.
- [45] A. Senol, Extraction equilibria of formic and levulinic acids using alamine 308/diluent and conventional solvent systems, *Separation and Purification Technology*. 21 (2000) 165–179.
- [46] A. Gemici, H. Uslu, A. Gök, Ş.İ. Kirbaşlar, Effect of Diluents on the Extraction of Fumaric Acid by Tridodecyl Amine (TDA), *Journal of Chemical & Engineering Data*. 60 (2015) 919–924. doi:10.1021/je500999m.
- [47] D. Datta, S. Kumar, Modeling and optimization of recovery process of glycolic acid using reactive extraction, *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 3 (2012) 141.
- [48] G. Kaur, K. Elst, Development of reactive extraction systems for itaconic acid: a step towards in situ product recovery for itaconic acid fermentation, *RSC Adv*. 4 (2014) 45029–45039. doi:10.1039/C4RA06612J.
- [49] H. Uslu, D. Datta, Experimental and Theoretical Investigations on the Reactive Extraction of Itaconic (2-Methylidenebutanedioic) Acid Using Trioctylamine (*N,N*-Dioctyl-octan-1-amine), *Journal of Chemical & Engineering Data*. 60 (2015) 1426–1433. doi:10.1021/je501131j.
- [50] G. Kyuchoukov, D. Yankov, Lactic Acid Extraction by Means of Long Chain Tertiary Amines: A Comparative Theoretical and Experimental Study, *Ind. Eng. Chem. Res*. 51 (2012) 9117–9122. doi:10.1021/ie3005463.
- [51] H. Uslu, Ş. İsmail Kirbaşlar, K.L. Wasewar, Reactive Extraction of Levulinic Acid by Amberlite LA-2 Extractant, *Journal of Chemical & Engineering Data*. 54 (2009) 712–718. doi:10.1021/je800261j.
- [52] H. Uslu, Ş.İ. Kirbaşlar, Investigation of Levulinic Acid Distribution from Aqueous phase to Organic phase with TOA Extractant, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 47 (2008) 4598–4606. doi:10.1021/ie800103u.
- [53] R. Canari, A.M. Eyal, Selectivity in the Extraction of Lactic, Malic, Glutaric, and Maleic Acids from Their Binary Solutions Using an Amine-Based Extractant: Effect of pH, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 42 (2003) 1308–1314. doi:10.1021/ie010580o.
- [54] A. Rahmanian, H.S. Ghaziaskar, Selective extraction of maleic acid and phthalic acid by supercritical carbon dioxide saturated with trioctylamine, *The Journal of Supercritical Fluids*. 46 (2008) 118–122. doi:10.1016/j.supflu.2008.04.015.

- [55] F.S. Oliveira, J.M.M. Araújo, R. Ferreira, L.P.N. Rebelo, I.M. Marrucho, Extraction of l-lactic, l-malic, and succinic acids using phosphonium-based ionic liquids, *Separation and Purification Technology*. 85 (2012) 137–146. doi:10.1016/j.seppur.2011.10.002.
- [56] J. Gorden, T. Zeiner, C. Brandenbusch, Reactive extraction of cis,cis-muconic acid, *Fluid Phase Equilibria*. 393 (2015) 78–84. doi:10.1016/j.fluid.2015.02.030.
- [57] A. Senol, Extraction equilibria of nicotinic acid using Alamine 336 and conventional solvents: effect of diluent, *Chemical Engineering Journal*. 83 (2001) 155–163.
- [58] T. Kirsch, G. Maurer, Distribution of oxalic acid between water and organic solutions of tri-n-octylamine, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 35 (1996) 1722–1735.
- [59] D. Datta, S. Kumar, Reactive Extraction of Pyridine-2-carboxylic Acid (Picolinic Acid) Using Nontoxic Extractant and Diluent Systems, *Journal of Chemical & Engineering Data*. 59 (2014) 1540–1548. doi:10.1021/je401110x.
- [60] M.D. Waghmare, K.L. Wasewar, S.S. Sonawane, D.Z. Shende, Natural Nontoxic Solvents for Recovery of Picolinic Acid by Reactive Extraction, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 50 (2011) 13526–13537. doi:10.1021/ie201228u.
- [61] Y.K. Hong, W.H. Hong, Influence of chain length of tertiary amines on extractability and chemical interactions in reactive extraction of succinic acid, *Korean Journal of Chemical Engineering*. 21 (2004) 488–493.
- [62] F.A. Poposka, J. Prochazka, R. Tomovska, K. Nikolovski, A. Grizo, Extraction of tartaric acid from aqueous solutions with tri-iso-octylamine (HOSTAREX A 324). Equilibrium and kinetics, *Chemical Engineering Science*. 55 (2000) 1591–1604.
- [63] H. Uslu, Liquid+liquid equilibria of the (water+tartaric acid+Alamine 336+organic solvents) at 298.15K, *Fluid Phase Equilibria*. 253 (2007) 12–18. doi:10.1016/j.fluid.2006.12.019.
- [64] M.M. Hossain, J.L. Maisuria, Effects of Organic Phase, Fermentation Media, and Operating Conditions on Lactic Acid Extraction, *Biotechnology Progress*. 24 (2008) 757–765. doi:10.1021/bp0702267.
- [65] E. KAHYA, E. BAYRAKTAR, Ü. MEHMETOĞLU, Optimization of process parameters for reactive lactic acid extraction, *Turkish Journal of Chemistry*. 25 (2001) 223–230.
- [66] M.-T. Gao, T. Shimamura, N. Ishida, H. Takahashi, Application of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* to extractive lactic acid fermentation, *Biochemical Engineering Journal*. 44 (2009) 251–255. doi:10.1016/j.bej.2009.01.001.
- [67] H. Uslu, C. Bayat, S. Gökmen, Y. Yorulmaz, Reactive extraction and LSER model consideration of lactic acid with tripropylamine+organic solvent systems from aqueous solution at room temperature, *Desalination*. 249 (2009) 694–698. doi:10.1016/j.desal.2008.11.020.
- [68] A. Labbaci, M. Douani, J. Albet, G. Kyuchoukov, Treatment of Effluents Issued from Agro-Food Industries by Liquid–Liquid Extraction of Malic and Lactic Acids Using Tri-n-octylamine and Tri-n-butyl Phosphate, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. (2012) 120913092325008. doi:10.1021/ie301486m.
- [69] G. Kyuchoukov, A. Labbaci, J. Albet, J. Molinier, Simultaneous Influence of Active and “Inert” Diluents on the Extraction of Lactic Acid by Means of Tri- *n* -octylamine (TOA) and Tri- *iso* -octylamine (TIOA), *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 45 (2006) 503–510. doi:10.1021/ie050912f.
- [70] K.L. Wasewar, V.G. Pangarkar, A.B.M. Heesink, G.F. Versteeg, Intensification of enzymatic conversion of glucose to lactic acid by reactive extraction, *Chemical Engineering Science*. 58 (2003) 3385–3393. doi:10.1016/S0009-2509(03)00221-5.
- [71] A. Krzyzaniak, B. Schuur, A.B. de Haan, Equilibrium studies on lactic acid extraction with N,N-didodecylpyridin-4-amine (DDAP) extractant, *Chemical Engineering Science*. 109 (2014) 236–243. doi:10.1016/j.ces.2014.01.030.
- [72] R.-S. Juang, R.-H. Huang, Equilibrium studies on reactive extraction of lactic acid with an amine extractant, *Chemical Engineering Journal*. 65 (1997) 47–53.
- [73] G. Maurer, Modeling the liquid–liquid equilibrium for the recovery of carboxylic acids from aqueous solutions, *Fluid Phase Equilibria*. 241 (2006) 86–95. doi:10.1016/j.fluid.2005.11.005.

- [74] M.J. Kamlet, J.-L.M. Abboud, M.H. Abraham, R.W. Taft, Linear Solvation Energy Relationships. 23. A comprehensive Collection of the Solvatochromic Parameters,  $\pi^*$ ,  $\alpha$ , and  $\beta$ , and Some Methods for Simplifying the Generalized Solvatochromic Equation, *The Journal of Organic Chemistry*. 48 (1983) 2877–2887.
- [75] R. Nelson, D. Peterson, E. Karp, G. Beckham, D. Salvachúa, Mixed Carboxylic Acid Production by *Megasphaera elsdenii* from Glucose and Lignocellulosic Hydrolysate, *Fermentation*. 3 (2017) 10. doi:10.3390/fermentation3010010.
- [76] Q. Xu, S. He, L. Jiang, S. Li, J. Wen, R. Guan, H. Huang, Extractive fermentation for fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*, *Separation Science and Technology*. (2017) 1–9. doi:10.1080/01496395.2017.1282962.
- [77] M. Matsumoto, M. Nishimura, Extractive Fermentation of Lactic Acid with Hiochi Bacteria in a Two-Liquid Phase System, *Fermentation Technology*. 5 (2016). doi:10.4172/2167-7972.1000129.
- [78] M.-T. Gao, T. Shimamura, N. Ishida, E. Nagamori, H. Takahashi, S. Umemoto, T. Omasa, H. Ohtake, Extractive lactic acid fermentation with tri-n-decylamine as the extractant, *Enzyme and Microbial Technology*. 44 (2009) 350–354. doi:10.1016/j.enzmictec.2008.12.001.
- [79] Z. Wu, S.-T. Yang, Extractive fermentation for butyric acid production from glucose by *Clostridium tyrobutyricum*, *Biotechnology and Bioengineering*. 82 (2003) 93–102. doi:10.1002/bit.10542.
- [80] N. Tik, E. Bayraktar, I. Mehmetoglu, In situ reactive extraction of lactic acid from fermentation media, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 76 (2001) 764–768. doi:10.1002/jctb.449.
- [81] Z. Gu, D.A. Rickert, B.A. Glatz, C.E. Glatz, Feasibility of propionic acid production by extractive fermentation, *Le Lait*. 79 (1999) 137–148.
- [82] Z. Jin, S.-T. Yang, Extractive fermentation for enhanced propionic acid production from lactose by *Propionibacterium acidipropionici*, *Biotechnology Progress*. 14 (1998) 457–465.
- [83] K. Ye, S. Jin, K. Shimizu, Performance improvement of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation, *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 81 (1996) 240–246.
- [84] H. Honda, Y. Toyama, H. Takahashi, T. Nakazeko, T. Kobayashi, Effective Lactic Acid Production by Two-Stage Extractive Fermentation, *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 79 (1995) 589–593.
- [85] V.P. Lewis, S.T. Yang, A novel extractive fermentation process for propionic acid production from whey lactose, *Biotechnology Progress*. 8 (1992) 104–110.
- [86] V.M. Yabannavar, D.I.C. Wang, Extractive fermentation for lactic acid production, *Biotechnology and Bioengineering*. 37 (1991) 1095–1100.
- [87] P. Fernandes, D. Prazeres, J. Cabral, Membrane-assisted extractive bioconversions, in: *Process Integration in Biochemical Engineering, 2003*: pp. 115–148. <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/3-540-36782-9.pdf#page=130> (accessed October 11, 2017).
- [88] R. Bar, J.L. Gainer, Acid Fermentation in Water-Organic Solvent Two-Liquid Phase Systems, *Biotechnology Progress*. 3 (1987) 109–114.
- [89] M. Matsumoto, K. Mochiduki, K. Kondo, Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid-producing bacteria, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 98 (2004) 344–347.
- [90] M.S. Solichien, D. O'Brien, E.G. Hammonf, C.E. Glatz, Membrane-based extractive fermentation to produce propionic and acetic acids: Toxicity and mass transfer considerations, *Enzyme and Microbial Technology*. 17 (1995) 23–31.
- [91] V.M. Yabannavar, D.I.C. Wang, Strategies for reducing solvent toxicity in extractive fermentations, *Biotechnology and Bioengineering*. 37 (1991) 716–722.
- [92] G. Burgé, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, F. Chemarin, M. Kniest, F. Allais, H.-E. Spinnler, V. Athès, Towards an extractive bioconversion of 3-hydroxypropionic acid: study of inhibition phenomena: Evaluation of bacterial cell inhibition during 3-HP extractive bioconversion, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. (2017). doi:10.1002/jctb.5253.

- [93] N.J.P. Wierckx, H. Ballerstedt, J.A.M. de Bont, J. Wery, Engineering of Solvent-Tolerant *Pseudomonas putida* S12 for Bioproduction of Phenol from Glucose, *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (2005) 8221–8227. doi:10.1128/AEM.71.12.8221-8227.2005.
- [94] S. Verhoef, N. Wierckx, R.G.M. Westerhof, J.H. de Winde, H.J. Ruijsenaars, Bioproduction of p-Hydroxystyrene from Glucose by the Solvent-Tolerant Bacterium *Pseudomonas putida* S12 in a Two-Phase Water-Decanol Fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (2009) 931–936. doi:10.1128/AEM.02186-08.
- [95] R. Prasad, K.K. Sirkar, Microporous Membrane Solvent Extraction, *Separation Science and Technology*. 22 (1987) 619–640. doi:10.1080/01496398708068971.
- [96] B.-S. Kim, P. Harriott, Critical Entry Pressure for Liquids in Hydrophobic Membranes, *Journal of Colloid and Interface Science*. 115 (1987) 1–8.
- [97] A. Gabelman, S.-T. Hwaang, Hollow fiber membrane contactors, *Journal of Membrane Science*. 159 (1999) 61–106.
- [98] V. Fougerit, V. Pozzobon, D. Pareau, M.-A. Théoleyre, M. Stambouli, Gas-liquid absorption in industrial cross-flow membrane contactors: Experimental and numerical investigation of the influence of transmembrane pressure on partial wetting, *Chemical Engineering Science*. 170 (2017) 561–573. doi:10.1016/j.ces.2017.03.042.
- [99] F.-X. Pierre, I. Souchon, V. Athes-Dutour, M. Marin, Membrane-based solvent extraction of sulfur aroma compounds: influence of operating conditions on mass transfer coefficients in a hollow fiber contactor, *Desalination*. 148 (2002) 199–204.
- [100] L. Dahuron, E.L. Cussler, Protein extractions with hollow fibers, *AIChE Journal*. 34 (1988) 130–136.
- [101] L. de S. Moraes, F. de A. Kronemberger, H.C. Ferraz, A.C. Habert, Liquid–liquid extraction of succinic acid using a hollow fiber membrane contactor, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 21 (2015) 206–211. doi:10.1016/j.jiec.2014.02.026.
- [102] R.M.C. Viegas, C.A.M. Afonso, J.G. Crespo, I.M. Coelho, Racemic resolution of propranolol in membrane contactors: Modelling and process optimisation, *Journal of Membrane Science*. 305 (2007) 203–214. doi:10.1016/j.memsci.2007.08.005.
- [103] A.R. Ferreira, L.A. Neves, J.C. Ribeiro, F.M. Lopes, J.A.P. Coutinho, I.M. Coelho, J.G. Crespo, Thiols' extraction from "jet-fuel" assisted by ionic liquids in hollow fibre membrane contactors, *Journal of Membrane Science*. 477 (2015) 65–73. doi:10.1016/j.memsci.2014.11.057.
- [104] J.G. Crespo, I.M. Coelho, R.M.C. Viegas, Membrane contactors: Membrane separations, in: *Encyclopedia of Separation Science*, 2000: pp. 3303–3311.
- [105] M. Stanojević, B. Lazarević, D. Radić, Review of membrane contactors designs and applications of different modules in industry, *FME Transactions*. 31 (2003) 91–98.
- [106] F.-X. Pierre, Les contacteurs membranaires appliqués à l'extraction de composés d'arômes, Institut Nationale Agronomique Paris-Grignon, 2002.
- [107] N.A. D'Elia, L. Dahuron, E.L. Cussler, Liquid-liquid extractions with microporous hollow fibers, *Journal of Membrane Science*. 29 (1986) 309–319.
- [108] H. Huang, S.-T. Yang, D.E. Ramey, A hollow-fiber membrane extraction process for recovery and separation of lactic acid from aqueous solution, in: *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO*, Springer, 2004: pp. 671–688. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-837-3\\_54](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-837-3_54) (accessed October 6, 2017).
- [109] T. Harington, M.M. Hossain, Extraction of lactic acid into sunflower oil and its recovery into an aqueous solution, *Desalination*. 218 (2008) 287–296. doi:10.1016/j.desal.2007.02.024.
- [110] G.K. Agrahari, N. Pandey, N. Verma, P.K. Bhattacharya, Membrane contactor for reactive extraction of succinic acid from aqueous solution by tertiary amine, *Chemical Engineering Research and Design*. 92 (2014) 2705–2714. doi:10.1016/j.cherd.2014.01.021.
- [111] R. Basu, K.K. Sirkar, CITRIC ACID EXTRACTION WITH MICROPOROUS HOLLOW FIBERS, *Solvent Extraction and Ion Exchange*. 10 (1992) 119–143. doi:10.1080/07366299208918095.



## Conclusion de la synthèse bibliographique

Nous avons vu dans cette synthèse bibliographique que les principaux acides organiques produits par voies biotechnologiques comme l'acide citrique, l'acide lactique, l'acide succinique ou l'acide itaconique sont actuellement produits par des microorganismes tolérants aux pH acides (inférieurs au(x)  $pK_A$  de l'acide), grâce aux progrès de génie génétique, ce qui est intéressant à plusieurs égards au niveau industriel.

L'acide 3-hydroxypropionique n'échappe pas à la règle et la méthode la plus prometteuse de production trouvée dans la littérature est une technologie de Cargill/Novozyme de conversion de glucose par une levure modifiée capable de produire du 3-HP à de bons titres avec de bons rendements à des pH inférieurs au  $pK_A$ . Cependant, l'accumulation du 3-HP dans le milieu de bioconversion montre une inhibition significative sur la croissance de la levure et sa capacité à consommer le glucose ce qui réduit la productivité et le rendement.

L'extraction liquide-liquide réactive par des amines tertiaires est une méthode courante de séparation et purification des acides organiques produits par bioconversions à l'échelle industrielle comme l'acide citrique ou l'acide lactique mais elle nécessite la plupart du temps que l'acide soit présent sous forme non-dissociée dans le milieu, c'est-à-dire à dire que le pH soit bien inférieur au  $pK_A$  de l'acide à traiter.

Le couplage d'un procédé séparatif à l'étape de fermentation permettant de retirer un acide du milieu en même temps qu'il est produit est une technique prometteuse et l'extraction liquide-liquide réactive semble intéressante. L'une des raisons qui a limité l'efficacité d'une telle stratégie jusqu'à présent était l'incompatibilité entre le pH acide nécessaire à l'efficacité de l'extraction et le pH neutre nécessaire au bon déroulement de la bioconversion. Toutefois, le développement relativement récent des fermentations industrielles à pH faibles remet l'idée de couplage fermentation-extraction au goût du jour dans une logique d'intensification des procédés et le cas de l'acide 3-hydroxypropionique y semble approprié. L'utilisation de contacteurs liquide-liquide à membrane pour ce genre d'application paraît particulièrement adaptée car elle prévient la dispersion de la phase organique dans la phase aqueuse et empêche la formation d'émulsions souvent inhérentes aux milieux biologiques et aux systèmes d'extraction réactive.

Cette thèse traite alors de la compréhension et de la maîtrise des mécanismes de l'extraction réactive de l'acide 3-hydroxypropionique au regard d'un procédé intégré couplant bioconversion et extraction.

Plusieurs parties ont été volontairement éludées dans cette revue bibliographique comme par exemple l'influence particulières des solvants actifs et de la concentration des différents composés extractant ou à extraire, l'influence des milieux de bioconversion sur l'efficacité et la sélectivité de

l'extraction réactive, ou encore la récupération de l'acide à partir de la phase organique après son extraction (étape appelée désextraction ou anciennement réextraction). En effet ces thèmes seront traités dans les introductions des publications liées aux sujets concernés, c'est-à-dire les publications n°1, 3 et 4 respectivement.

**CHAPITRE 2 :**  
**MATERIEL ET METHODOLOGIE**  
**EXPERIMENTALE**

Nous présentons dans ce chapitre la démarche expérimentale générale adoptée ainsi que les équipements et produits chimiques utilisés. Les conditions opératoires, techniques analytiques et méthodes expérimentales seront détaillées dans les parties « Material and Methods » de chaque publication, en proximité des résultats correspondants.

## 1. Démarche expérimentale

La démarche expérimentale est schématisée sur la Figure 35 et explicitée ci-après selon la chronologie des publications présentées dans ce manuscrit.

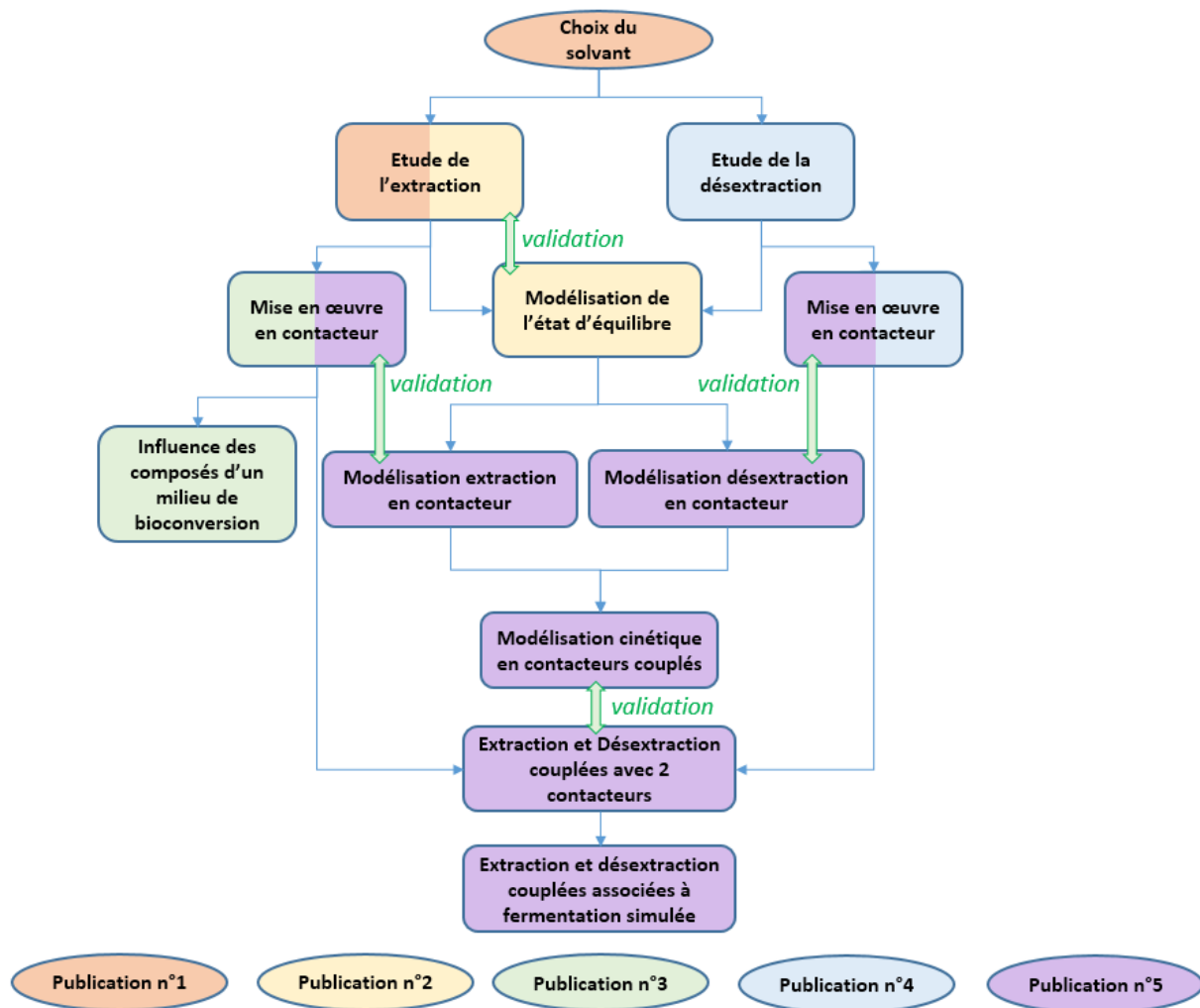


Figure 35 : Représentation schématique de la démarche expérimentale, en lien avec les publications présentées dans le manuscrit au chapitre III

**Publication n°1: Eléments nouveaux dans les mécanismes d'extraction réactive d'acides organiques: approche expérimentale pour l'extraction de l'acide 3-hydroxypropionique par la tri-*n*-octylamine**

Dans le cas d'une extraction réactive d'un acide organique, le choix du système extractant, constitué de la molécule extractante accompagnée du diluant (solvant), est un point clé. Dans ce système, la tri-*n*-octylamine a été choisie comme molécule extractante. En comparaison avec les autres extractants, la TOA est relativement peu onéreuse, quasiment insoluble dans l'eau, avec des propriétés bien décrites dans la littérature et, contrairement à l'extractant commercial similaire Alamine 336, composé d'un mélange d'amines, il s'agit d'un composé « pur » chimiquement défini. La présente étude a donc essentiellement consisté à trouver un diluant adéquat pour l'extractant afin d'optimiser l'extraction réactive par un criblage de quelques solvants. Les solvants doivent être non miscibles avec l'eau de façon à permettre une interface liquide / liquide pour l'extraction, avoir une solubilité dans l'eau minimale afin d'éviter une toxicité induite par la présence de traces de solvant dans les milieux de bioconversion, tout en conservant une viscosité acceptable pour la mise en œuvre dans un contacteur à membrane, et disposer enfin de bonnes propriétés de solvation vis-à-vis des complexes formés. Les cétones et aldéhydes ont d'emblée été retirés de la liste des solvants car il est connu que ces fonctions chimiques sont communément toxiques pour les microorganismes [1]. Nous avons pu déjà citer le cas du 3-HPA bien plus toxique que le 3-HP comme exemple d'aldéhyde hydrophile [2,3] mais même les aldéhydes hydrophobes comme le décylaldéhyde en concentrations résiduelles ont montré leur toxicité [4]. De plus, les solvants usuels comportant une double fonction C=O comme le MIBK sont généralement trop solubles dans l'eau pour être considérés ici dans l'objectif d'un couplage de l'extraction liquide / liquide avec la bioconversion. Nous nous concentrerons donc seulement sur une sélection parmi des alcanes linéaires de C<sub>6</sub> à C<sub>12</sub>, des alcools gras linéaires primaires de C<sub>6</sub> à C<sub>18</sub> et des esters linéaires en C<sub>10</sub> ainsi qu'un solvant naturel, biocompatible et insoluble dans l'eau, l'huile de tournesol. Une fois le solvant choisi, nous nous intéresserons aux équilibres chimiques impliqués lors de l'extraction du 3-HP ce qui implique d'étudier de plus près le niveau de pureté de la TOA en essayant d'identifier les impuretés issues de sa fabrication et comprendre leur impact sur les performances de l'extraction réactive, et enfin proposer un traitement pour s'affranchir de l'influence des impuretés issues de la synthèse industrielle.

**Publication n°2: Modélisation mécanistique et prédiction de l'équilibre de l'extraction réactive d'acides organique par des amines : étude comparative de deux modèles de complexation-solvation pour l'acide 3-hydroxypropionique**

Sur la base de résultats expérimentaux d'extraction obtenus à l'équilibre, nous développons et comparons deux modèles prédictifs de complexation chimique entre l'extractant et le 3-HP, afin de prédire les rendements d'extraction et de déterminer l'état d'équilibre du système d'extraction. Le premier modèle inclue le solvant comme un réactif stœchiométrique de la réaction de complexation

tandis que le second modèle considère le solvant comme un environnement plus ou moins favorable à la complexation. Les mécanismes chimiques dominant l'extraction sont étudiés par spectrométrie infrarouge afin de confirmer certaines hypothèses concernant les mécanismes de l'extraction réactive.

**Publication n°3: Vers un procédé de récupération *in situ* de l'acide 3-hydroxypropionique biosourcé: influence des composants d'un milieu de bioconversion sur l'extraction réactive en contacteur membranaire**

Une fois les comportements thermodynamiques de l'extraction bien explicités en milieux simplifiés, la mise en œuvre de l'extraction liquide / liquide réactive est réalisée en contacteurs membranaires à fibres creuses et la cinétique d'extraction est évaluée. Afin d'évaluer l'impact des composants des milieux de bioconversion sur l'efficacité d'extraction (rendement et cinétique), la composition du milieu est enrichie (base, sels, protéines) afin de se rapprocher d'un milieu réel de bioconversion, et les performances sont évaluées en contacteurs membranaires et des hypothèses expliquant les effets observés sont apportées.

**Publication n°4: Récupération de l'acide 3-hydroxypropionique à partir de phases organiques chargées après extraction réactive par des amines tertiaires dans un solvant de type alcool**

La récupération de l'acide extrait en phase organique dans une nouvelle phase aqueuse est également étudiée, étape souvent identifiée comme le point clé du procédé et appelée dés-extraction. Différentes méthodes sont testées pour récupérer un maximum de l'acide en phase aqueuse dans des conditions acceptables : l'ajout de sels, la modulation de pH, la modulation de température et la modulation de solvant. Ces méthodes jouent sur les propriétés physicochimiques des phases, sur les propriétés acidobasiques des espèces mises en jeu ainsi que sur les caractéristiques thermochimiques des phénomènes impliqués (grandeurs de réaction). Le travail expérimental proposé ici permet de caractériser les différents phénomènes à l'équilibre pour chaque méthode de dés-extraction envisagée, dans le but également de compléter les modèles thermodynamiques d'extraction par des modèles de dés-extraction.

**Publication n°5: Extraction réactive en contacteurs membranaires pour la récupération *in situ* de l'acide 3-hydroxypropionique : modélisation prédictive et mise en œuvre expérimentale en mimant des bioconversions**

Le modèle réactif des phénomènes d'extraction et de dés-extraction présenté dans les publications n°2 et n°4 est étendu pour inclure la dynamique des transferts en contacteur membranaire. Une attention particulière est portée à créer un modèle prédictif le plus simple possible, facilement maniable et transposable tout en prenant en compte l'ensemble des mécanismes réactionnels révélés expérimentalement. Ces modèles sont confrontés aux expériences réalisées à l'aide d'une installation de laboratoire ainsi que sur un pilote instrumenté. Les étapes d'extraction et de dés-extraction en contacteurs sont alors couplées de façon à former un procédé semi-continu mimant une fermentation

produisant du 3-HP en ajoutant simplement du 3-HP au système à une vitesse décrite pour des microorganismes dans la littérature. Les modèles d'extraction et de désextraction en contacteur sont ensuite fusionnés dans un nouveau modèle global du procédé qui est confronté à ces conditions nouvelles de système ouvert. Enfin, le système global est testé sur un milieu reconstitué mimant un milieu de fermentation industriel selon les conditions du brevet de Cargill données en partie 2.2.2. du Chapitre I de ce manuscrit en introduisant des sels, une source d'azote, un substrat ainsi que des levures inactives sans toutefois mettre en place la régulation de pH. Une interprétation des résultats en termes de régulation de pH par l'extraction, de pureté du 3-HP récupéré et d'impact sur les cinétiques et les rendements d'extractions est proposée sur la base de cette approche de modélisation.

## 2. Les pilotes d'extraction liquide-liquide à membrane

Les modules membranaires utilisés sont des modules 2.5x8 à fibres creuses X50 de Liqui-Cel. La membrane est constituée par un réseau de fibres en polypropylène hydrophobe parallèles tressées entre elles. Les fibres sont creuses de sorte qu'un fluide peut circuler à l'intérieur et un autre à l'extérieur. Le matériau des fibres est poreux (40% de porosité) et, du fait de son hydrophobicité, la phase organique remplit les pores du matériau. Les phases circulant à l'intérieur et à l'extérieur des fibres se trouvent donc en contact à l'embouchure des pores, dont le diamètre moyen est de 30 nm. Les caractéristiques du module et du matériau membranaire sont présentées dans le tableau 15. Le module de forme cylindrique peut être considéré comme étant partagé en deux parties en son centre (Figure 36). Un tube dirigé selon l'axe du module et percé de trous alimente la calandre du module tout le long de la première moitié. Le réseau de fibres entoure ce tube et traverse le module de bout en bout. Une chicane circulaire dont le diamètre est légèrement plus petit que le module est située au centre du module perpendiculairement à son axe et force le fluide de la calandre issu du tuyau central à traverser le réseau de fibres pour atteindre l'extrémité axiale de la calandre pour contourner la chicane. De l'autre côté de la chicane, un tube collecteur similaire au tube précédent force le fluide de la calandre à traverser une nouvelle fois le réseau de fibres pour pouvoir sortir de la calandre. Cette disposition favorise l'hydrodynamique en évitant les zones mortes et les passages préférentiels. Un schéma explicatif est fourni en figure 36.

Tableau 15 : Caractéristiques du module à fibres creuses Liqui-Cel 2.5x8 et des fibres X50 (\*données constructeur)

Module Liquid-Cel 2.5x8		Fibres X50	
Matériau*	polypropylène	Matériau*	polypropylène
Diamètre interne	58,4 mm	Diamètre interne*	220 $\mu\text{m}$
Longueur interne	20,3 mm	Diamètre externe*	300 $\mu\text{m}$
Nombre de fibres*	~ 9800	Longueur effective	146 mm
		Epaisseur de la paroi*	40 $\mu\text{m}$
		Porosité*	40%
		Taille de pores moyenne*	0,03 $\mu\text{m}$

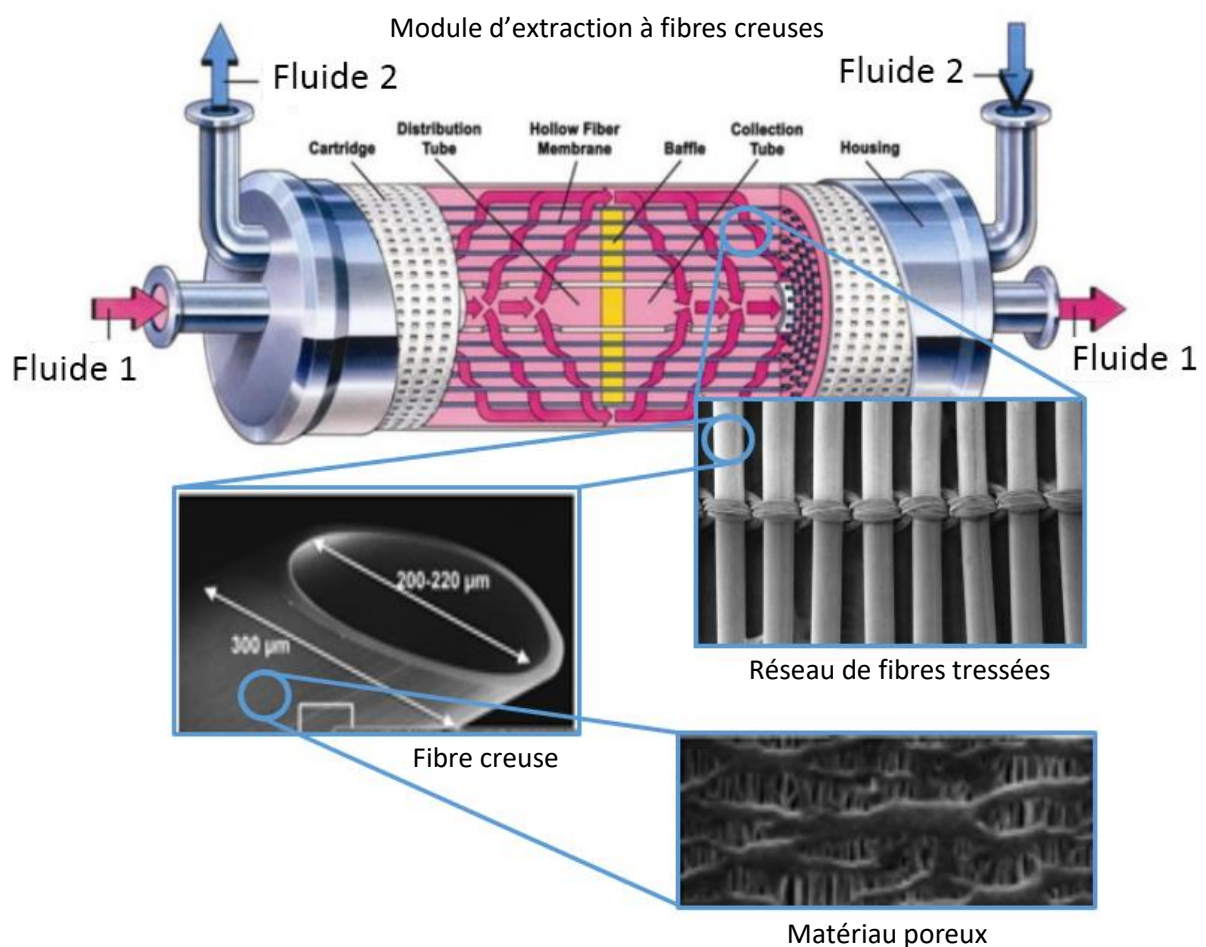


Figure 36 : Schéma de fonctionnement du module membranaire utilisé et images des fibres observées au microscope pour différents grossissements

Deux pilotes d'extraction liquide-liquide en contacteur à membrane ont été utilisés lors de cette thèse. Le premier est une petite installation de paille réalisée par l'équipe technique du GMPA sur le site de l'INRA de Grignon. Il est constitué de 2 pompes volumétriques à entraînement magnétique (modèle MDG-H2T, Iwaki) permettant la circulation en circuits fermés de la phase aqueuse



et de la phase organique à travers le module membranaire placé verticalement. La fréquence des pompes est fixée de façon manuelle sur des cadrans digitaux externes munis de commutateurs et de régulateurs rotatifs. Deux manomètres anéroïdes à membrane sont fixés à la sortie de la phase aqueuse et à l'entrée de la phase organique (bas du module). La lecture se fait visuellement sur un cadran à aiguille. Afin de garantir un bon remplissage tout en préservant un mode de circulation à contre-courant, la phase organique circulant dans la calandre entre par le bas du module tandis que la phase aqueuse circulant dans les fibres entre par le haut du module. Un schéma du pilote est disponible en figure 37. Les conditions expérimentales seront détaillées dans les parties « Material and Methods » des publications concernées.

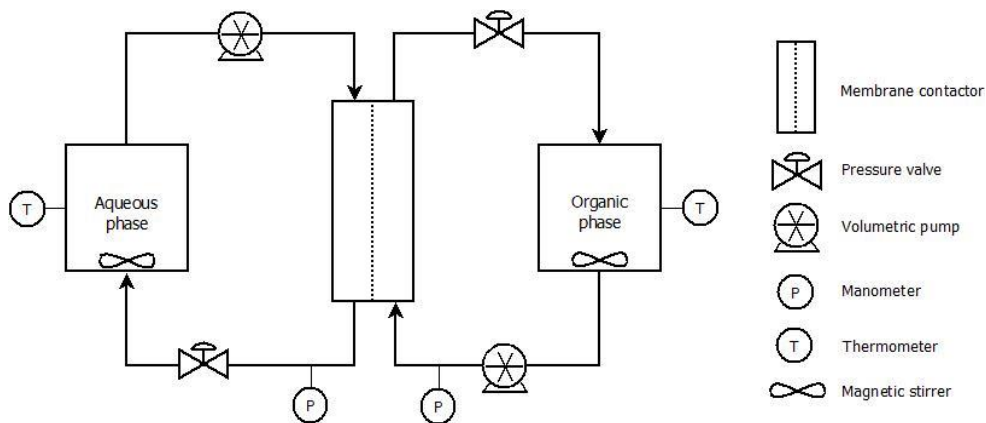


Figure 37 : Schéma de principe de l'installation de paillasse

Le deuxième pilote a été construit par la société Seprosys (La Rochelle, France). Il est presque entièrement automatisé avec des sondes de pH (de type 8203, Bürkert), de température et de pression (capteur piézorésistif, type 8323, Bürkert) et des débitmètres à ailette (type 8030, Bürkert) en ligne qui réalisent des mesures toutes les 2 secondes, avec acquisition. Le débit fourni par les pompes volumétriques à entraînement magnétique (modèle MDG-R15, Iwaki) est régulé à partir des mesures des débitmètres à l'aide de régulateurs PID. Pour chaque phase, les pressions sont mesurées en amont et en aval du module. Les débits et les températures pour chaque phase et le pH pour la phase aqueuse sont mesurés en amont du module. La pression dans chaque circuit est

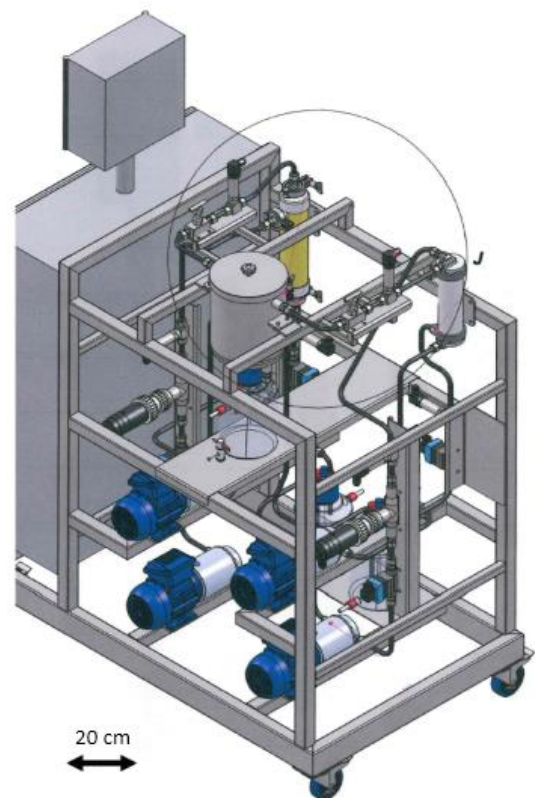


Figure 38 : Dessin réaliste du pilote d'extraction Seprosys (à l'échelle)

imposée manuellement par des vannes à pointeau (SS-8GUF8, Swagelok) placées en aval du module. Un schéma du pilote est disponible en Figure 39.

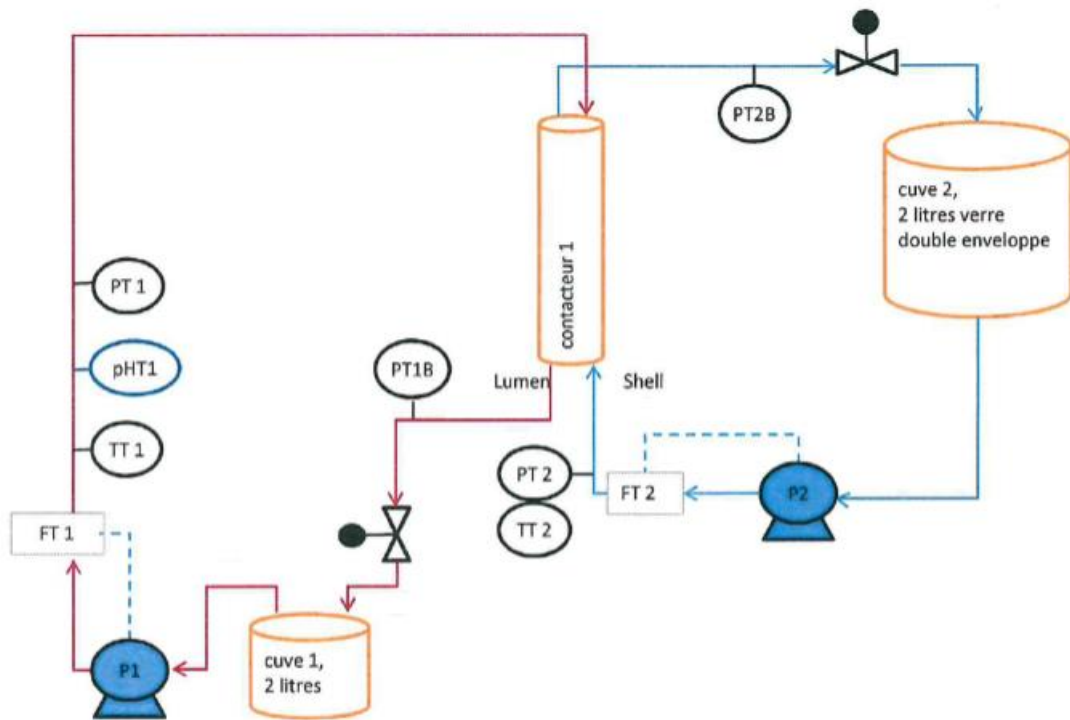


Figure 39 : Schéma de procédé du pilote Seprosys en mode extraction liquide-liquide simple

Des expériences ont été menées en couplant l'étape d'extraction avec une étape de dés extraction en contacteur. Dans ce cas, un module membranaire supplémentaire est nécessaire et un deuxième système, totalement symétrique au précédent, est intégré. La cuve accueillant la phase organique de l'étape d'extraction alimente également le module de l'étape de dés extraction comme détaillé en Figure 40.

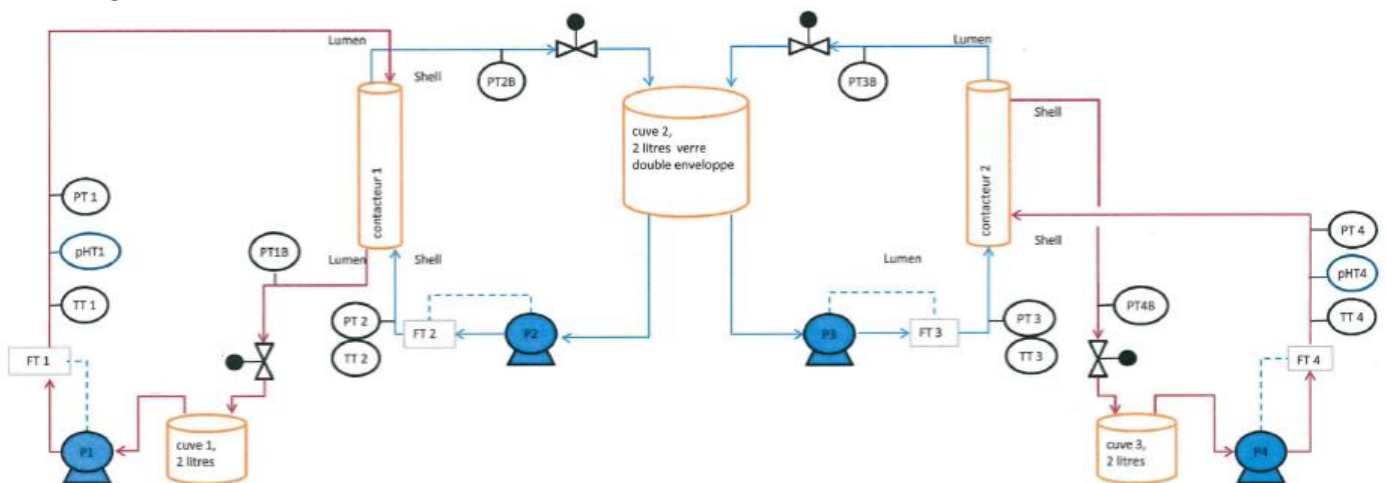


Figure 40 : Schéma de procédé du pilote Seprosys en mode extraction liquide-liquide couplée à la dés extraction liquide-liquide

La commande du procédé est réalisée par un panneau d'affichage tactile permettant de fixer les débits et de suivre l'évolution des paramètres mesurés (débits, pH, températures et pressions) en temps réel. Les débits peuvent être réglés de 2 façons : (1) par une consigne de puissance de pompe, le débit résulte alors de la puissance fournie et peut varier selon les conditions, (2) par une consigne de débit, la puissance de pompe est alors asservie à la mesure de débit par un régulateur PID. Nous utiliserons la deuxième méthode afin de garantir un débit constant pour toutes les expériences. Toutes les mesures sont stockées dans des fichiers que l'on peut exporter et traiter dans des tableurs.

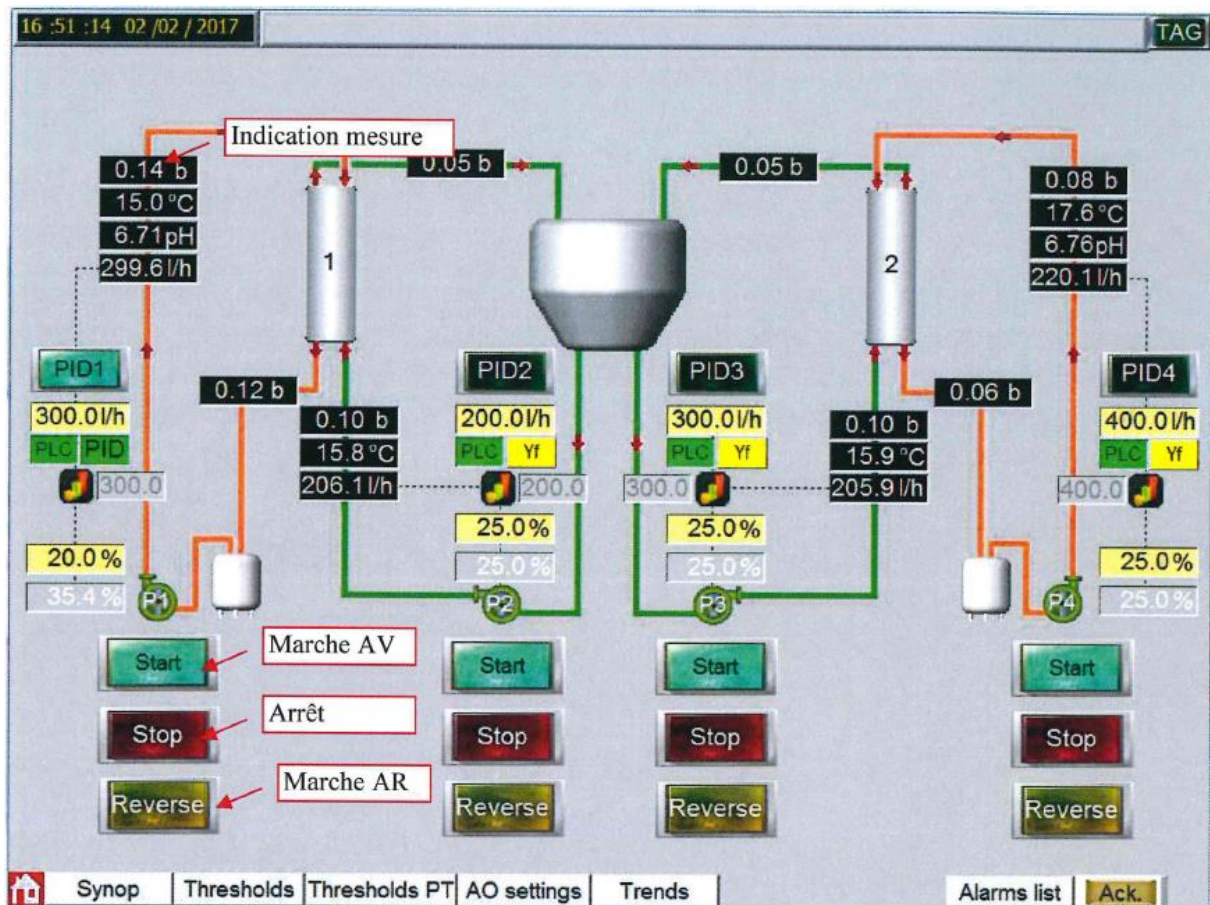


Figure 41 : Panneau de commande tactile du pilote Seprosys représentant le schéma de procédé

Pour obtenir une bonne répétabilité des expériences en garantissant un maintien des propriétés de la membrane et en évitant la pollution d'une expérience par la précédente, un nettoyage des circuits et des modules est systématiquement effectué après chaque expérience. Lors de l'utilisation de 3-HP dans l'eau, les circuits et les modules sont nettoyés en faisant circuler une solution d'isopropanol à 60%v/v dans l'eau afin d'entraîner les restes de solvant. Le circuit et le module sont ensuite rincés abondamment par de l'eau osmosée, puis de l'air comprimé filtré est soufflé dans le circuit de sorte à obtenir une pression relative de 0,1 bar de chaque côté du circuit pour sécher entièrement l'intérieur de l'installation. Ce nettoyage avec séchage complet est recommandé par le fournisseur et nécessaire

pour maintenir l'hydrophobicité du matériau tout en garantissant une bonne répétabilité des expériences. Pour l'installation de laboratoire, le séchage peut durer au minimum une nuit alors que pour le pilote Seprosys il a été fixé à 2 jours. Pour des encrassements potentiellement plus importants comme lors de l'utilisation de microorganismes, des lavages à l'acide citrique (5% massique dans l'eau) et à la soude (2% massique) sont intercalés entre le lavage à l'isopropanol et le rinçage à l'eau osmosée.

### 3. Produits chimiques et recyclage

Le tableau 16 donne les principaux solvants utilisés avec l'acide 3-hydroxypropionique, avec leurs formules topologiques, leurs fournisseurs et leurs principales impuretés. Les produits chimiques secondaires utilisés dans ce travail de thèse seront listés dans les publications afférentes avec leurs principales propriétés.

Tableau 16 : Principaux produits chimiques utilisés

Produits (numéro CAS)	Formule brute	Formule topologique	Fournisseur	Pureté annoncée	Impuretés principales
<i>n</i> -décanol (112-30-1)	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O		Sigma-Aldrich	>99%	Autres alcools, eau, aldéhydes
Alcool oléique (143-28-2)	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O		TCI Europe	>60%	Autres alcools gras
Tri- <i>n</i> -octylamine (1116-76-3)	C <sub>24</sub> H <sub>51</sub> N		Sigma-Aldrich	>98%	Octylamine, dioctylamine
Acide 3-hydroxypropionique (503-66-2)	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		TCI Europe	30% dans l'eau	Acide 3,3'-oxydipropionique, dimères ester

Afin d'éliminer les impuretés de la TOA, du fait de leur influence démontrée dans la publication n°1 sur l'extraction, un protocole a été mis en œuvre et est détaillé dans la publication n°1 « Éléments nouveaux dans les mécanismes d'extraction réactive d'acides organiques: approche expérimentale pour l'extraction de l'acide 3-hydroxypropionique par la tri-*n*-octylamine ».

Comme le 3-HP est relativement cher (185€ pour 7,5 g chez TCI Europe) et que pour la plupart de nos expériences il est utilisé sans ajout de contaminant extérieur, nous avons décidé de mettre au point un protocole de recyclage. Le 3-HP extrait en phase organique est récupéré intégralement par dés extraction à l'aide une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) en excès (CF publication n°4), si possible en concentrant le 3-HP dans cette étape par rapport à la phase organique. Dans le cas

d'expériences d'extraction et de dés extraction couplées avec NaOH, la phase de dés extraction est utilisée telle quelle. Le 3-HP est régénéré à l'aide d'une résine cationique forte, capable d'échanger les ions sodium  $\text{Na}^+$  par des ions hydronium  $\text{H}^+$ . La résine utilisée est la résine « Amberlite® IR120 hydrogen form » produite par Dow Chemical et achetée chez Sigma-Aldrich. La couleur orangée de la résine transférant fortement dans la solution à traiter, la résine est d'abord lavée à l'eau ultra pure jusqu'à ce que les eaux de lavage ne soient plus colorées. Elle est alors ajoutée aux flacons contenant les solutions de 3-HP et de NaOH avec un barreau aimanté pour agitation jusqu'à ce que le pH de la solution soit inférieur à 2.9. La résine est alors retirée par filtration sur papier filtre à 0,2  $\mu\text{m}$  de taille de pores et la solution de 3-HP régénérée est concentrée sous vide par évaporateur rotatif à 45°C sans évaporer à sec pour éviter la polymérisation du 3-HP et l'augmentation visuelle de la viscosité. Le titre de la nouvelle solution concentrée est déterminé par HPLC et elle est stockée en chambre froide à 4°C pour une nouvelle utilisation.

Selon le même raisonnement, pour éviter les pertes de solvants, les phases organiques utilisées en contacteur sont également recyclées après les expériences. Pour cela, elles sont mises en contact dans des flacons à centrifugation d'1L avec une solution d'hydroxyde de sodium en excès en agitant manuellement. Les flacons sont ensuite centrifugés à 15 000 g pendant 10 minutes. La phase organique surnageante est récupérée puis lavée à l'eau ultra pure pour retirer les éventuelles traces de sels en phase organique selon le même protocole que décrit pour le lavage à NaOH. Les phases organiques recyclées sont stockées dans un bidon de 5L à température ambiante.

Des essais ont été réalisés pour récupérer le 3-HP sous ses formes isolées après les expérimentations d'extraction suivie d'une dés extraction. Un sirop de 3-HP est récupéré après passage dans l'étape de recyclage décrite plus haut en concentrant plus fortement le produit jusqu'à l'obtention d'un produit très visqueux et l'arrêt visuel de la condensation de l'eau évaporée. Le produit obtenu est très visqueux et jaunâtre et contient probablement encore de l'eau (Figure 42). Il est stocké en chambre froide à -20°C. Le sel de 3-hydroxypropionate de sodium quant à lui est obtenu différemment. Lors de l'étape de l'ajout de résine décrite dans le protocole de recyclage, celui-ci est arrêté jusqu'à l'obtention d'un pH égal à 7. En effet, cela garantit l'élimination de l'hydroxyde de sodium en excès tout en maintenant le 3-HP sous sa forme de sel de sodium. Après filtration de la résine, la solution est évaporée à sec à 45°C sous vide à l'évaporateur rotatif. On obtient un solide blanc de 3-hydroxypropionate de sodium qui est stocké en chambre froide à -20°C également (Figure 42).



*Figure 42 : Précipité de 3-hydroxypropionate de sodium (gauche) et concentré d'acide 3-hydroxypropionique (droite)*

## Références

- [1] A.M. Kunjapur, K.L.J. Prather, Microbial Engineering for Aldehyde Synthesis, *Applied and Environmental Microbiology*. 81 (2015) 1892–1901. doi:10.1128/AEM.03319-14.
- [2] G. Burgé, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, F. Chemarin, M. Kniest, F. Allais, H.-E. Spinnler, V. Athès, Towards an extractive bioconversion of 3-hydroxypropionic acid: study of inhibition phenomena: Evaluation of bacterial cell inhibition during 3-HP extractive bioconversion, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. (2017). doi:10.1002/jctb.5253.
- [3] T.L. Talarico, I.A. Casas, T.C. Chung, W.J. Dobrogosz, Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*, *Antimicrob Agents Chemother*. 32 (1988). doi:10.1128/AAC.32.12.1854.
- [4] M.-T. Gao, T. Shimamura, N. Ishida, E. Nagamori, H. Takahashi, S. Umemoto, T. Omasa, H. Ohtake, Extractive lactic acid fermentation with tri-n-decylamine as the extractant, *Enzyme and Microbial Technology*. 44 (2009) 350–354. doi:10.1016/j.enzmictec.2008.12.001.





# **CHAPITRE III :**

# **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## Avant-propos

Cette partie est rédigée sous forme de cinq articles. Les résumés des articles sont présents en français et en anglais et le corps des articles est rédigé en anglais. Pour clarifier la lecture, après chaque article, les résultats clés sont résumés en français et des remarques supplémentaires sont ajoutées concernant des expériences dont les résultats n'ont pas été publiés ou dont les résultats font partie de publications dont je ne suis pas le premier auteur et qui ne sont donc pas jointes à ce manuscrit.

Conformément à ce qui a été écrit dans le chapitre précédent, ce travail concernant l'extraction réactive du 3-HP au regard d'un procédé intégré couplant bioconversion et extraction commence par le choix d'un système d'extraction par criblage de solvants et l'étude des impuretés de l'extractant commercial utilisé : la tri-*n*-octylamine. Ceci fait l'objet de la première publication.

## Publication n°1

### **Éléments nouveaux dans les mécanismes d'extraction réactive d'acides organique: approche expérimentale pour l'extraction de l'acide 3-hydroxypropionique par la tri-*n*-octylamine**

Une étude détaillée de l'extraction réactive de l'acide 3-hydroxypropionique (3-HP) par la tri-*n*-octylamine (TOA) est proposée pour la première fois. Son objectif est de dévoiler quelques interactions entre solvant et solutés et de fournir des mécanismes globaux pour mieux comprendre et concevoir l'extraction liquide-liquide réactive du 3-HP dans un procédé biotechnologique. Onze solvants de tailles moléculaires similaires et de différents types chimiques (alcools, esters et alcanes) ont été examinés pour comprendre leur rôle sur la faisabilité de l'extraction. Il a été trouvé que les alcools sont les meilleurs solvants grâce à leur propriété de donneur H et leur faculté à se charger en eau qui rendent possible une bonne solvatation des complexes acide-amine. Une étude plus poussée a été entreprise, pour le *n*-décanol et l'alcool oléique comme solvants, en variant les concentrations initiales de l'acide et de l'amine. A 1 g/L en 3-HP, les rendements d'extraction maximaux sont de 77% pour le decanol et de 51% pour l'alcool oléique pour une teneur de 20%v/v de TOA en phase organique. Il a été démontré que la pureté initiale de la TOA avait un effet majeur sur le rendement d'extraction quand la concentration initiale en acide est faible (<10 g/L). Les impuretés du procédé de fabrication de la TOA ont été identifiées comme étant la *n*-octylamine et la di-*n*-octylamine et leur quantification a été réalisée dans la phase aqueuse après extraction. Leur impact important sur le rendement d'extraction a été évalué, montrant jusqu'à 86% de réduction.

Mots-clés : extraction par solvant ; acide organique ; impuretés de la tri-*n*-octylamine ; récupération *in-situ*



## New insights in reactive extraction mechanisms of organic acids: An experimental approach for 3-hydroxypropionic acid extraction with tri-*n*-octylamine



F. Chemarin<sup>a,b</sup>, M. Moussa<sup>b</sup>, M. Chadni<sup>b</sup>, B. Pollet<sup>b</sup>, P. Lieben<sup>b</sup>, F. Allais<sup>a,b</sup>, I.C. Trelea<sup>b</sup>, V. Athès<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Chaire Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI), AgroParisTech, CEBB, 3 rue des Rouges Terres, Route de Bazancourt, F-51110 Pomacle, France

<sup>b</sup>UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, F-78850 Thiverval-Grignon, France

### Abstract

A detailed study of 3-hydroxypropionic acid (3-HP) reactive extraction with tri-*n*-octylamine (TOA) is proposed for the first time. It aims at uncovering some solvent-solutes interactions and providing global mechanisms to better understand and design the reactive liquid-liquid extraction of 3-HP in a biotechnological process. Eleven solvents of similar molecular sizes and several chemical types (alcohols, esters and alkanes) were investigated to understand their role on the extraction ability. Alcohols were found to be the best solvents thanks to their H-bond donor characteristic and water loading that allowed good solvation of the acid-amine complexes. Further investigations were then undertaken, for *n*-decanol and oleyl alcohol as solvents, varying acid (0.0028 – 0.56 mol/L corresponding to 0.25 – 50 g/L) and amine (0 – 2.3 mol/L corresponding to 0 – 100% v/v) concentrations. At 0.011 mol/L (1 g/L) of 3-HP, maximum extraction yields of 77% for *n*-decanol and 51% for oleyl alcohol were found for 0.46 mol/L TOA (20% v/v). The initial TOA purity proved to have a major impact on the extraction yield at low initial acid concentration (<0.1 mol/L = 10 g/L). Impurities from the TOA manufacturing process were identified as *n*-octylamine and di-*n*-octylamine and quantified in the aqueous phase after extraction. Their major effect on the extraction yield has been assessed (up to 86% decrease).

### Keywords

Solvent extraction; organic acid; active solvent; tri-*n*-octylamine impurity; *In Situ* Product Recovery;

## Abbreviations

3-HP: 3-hydroxypropionic acid

AH: acid under non-dissociated form

$[AH]_{HPLC}$ : total concentration of 3-HP under all forms in water as determined using HPLC (mol/L)

ANOVA: analysis of variance

B: organic base

$BH^+$ : conjugate acid of B

$H^+$ : hydrogen ion

$K_A^{AH}$ : dissociation constant of 3-HP in water

$K_A^{OA}$ : dissociation constant of *n*-octylammonium in water

$K_w$ : ionic product of water

$[OA]_{LCMS}$ : total concentration of *n*-octylamine (and di-*n*-octylamine) in water under all forms as determined using UHPLC-HRMS (mol/L)

p: stoichiometric coefficient

$\bar{p}$ : p-value of ANOVA tests

$pH_{th}$ : calculated pH according to  $[AH]_{HPLC}$  only

$pH_{th,OA}$ : calculated pH according to  $[AH]_{HPLC}$  and  $[OA]_{LCMS}$

q: stoichiometric coefficient

$R_3N$ : tertiary amine

TOA: tri-*n*-octylamine

Y: extraction yield

*Subscript and superscript:*

aq: in the aqueous phase

eq: at the equilibrium

ini: initially, before extraction

org: in the organic phase

## 1. Introduction

It is now recognized that 3-hydroxypropionic acid (3-HP) is a valuable platform molecule that can be used as a building-block for the production of new polymers like polyesters and acrylic acid derivatives such as acrylates or acrylamides [1]. This molecule is currently not widely used due to its exclusive and difficult synthesis via chemical pathways including transformation of petrochemical products such as propylene but is expected to exhibit a significant growth in the next years. Indeed, it has been referred as one of the Top 10 “chemical opportunities from biorefinery carbohydrates” [2]. Lately, research has focused on the production of 3-HP using biotechnologies with natural [3,4] and modified [5,6] micro-organisms able to convert glycerol or glucose into 3-HP [7]. Other substrates like CO<sub>2</sub>[8,9] and C5 sugars [10,11] are also currently studied. Biotechnology is considered as a promising route for the sustainable and efficient production of 3HP but one of the main drawbacks of this approach is the inhibitory effect the products can have on the micro-organisms, limiting productivity and final concentrations to quite low amounts, which is particularly true for the 3-HP production [7]. In this context, *in-situ* product recovery (ISPR) seems to be a promising approach because the simultaneous removal of the product from the bioconversion medium could favor higher yields, productivity and concentrations. Liquid-liquid reactive extraction for organic acids' recovery is known to be particularly efficient and selective for dilute media as an ISPR technique in biotechnological processes and can prevent toxic metabolites and/or products from accumulating [12,13].

Current concentrations of 3-HP in bioconversion media for the best current biotechnological performances found in the literature do not exceed about 70 g/L [6,14]. For short chain carboxylic acids in dilute streams such as 3-HP, their hydrophilic character prevents their direct recovery in an organic solvent and a reagent is needed in the organic phase to trap the compound in a rather hydrophobic complex. In the case of hydrophilic carboxylic acids, these reagents can be hydrophobic basic molecules being able to interact with acidic groups [15]. Among such molecules, long chained aliphatic amines have been widely studied for a large set of carboxylic acids, such as hydroxycarboxylic acids like citric [16–18], glycolic [19,20], malic [21,22] and tartaric [23–26] acids, C3 monocarboxylic acids like acrylic [27], propionic [28–31] and pyruvic [32–34] acids and even lactic acid, an  $\alpha$ -hydroxylated C3 monocarboxylic acid (positional isomer of 3-HP) [22,23,35].

Amine basicity, steric hindrance and water solubility are relevant parameters and have an influence on extraction performances. For example, Kyuchoukov and Yankov [36] tested several amines for the extraction of lactic acid and their results show that, when amines are used in oleyl alcohol, extraction yields decrease when the steric hindrance of the amines increases. The contrary is observed when amines are used without oleyl alcohol as the active diluent. Kaur and Elst [37] studied a wide range of

amines and diluents for the extraction of itaconic acid. For all the diluents tested, they found that short chain amines (tributylamine, *N,N*-dimethyloctylamine) and primary amines (*n*-octylamine) had the lowest performances. On the contrary, long chain secondary and tertiary amines proved to be very efficient with very high extraction yields, probably due to their higher basicity and very low solubility in water. Secondary amines (di-*n*-octylamine) had better performances than tertiary amines (tri-*n*-octylamine) [37], and this could be explained by the lesser extent of the steric hindrance around the reactive amine group, their higher basicity and higher density of amine groups. Similar results were found in a previous study which also demonstrated that primary amines were not to be used in reactive extraction due to moderate extraction efficiency, high water solubility and high interfacial activity causing emulsion [38].

The structure of the aliphatic amines is crucial for their role as extractants, but they cannot be used alone, due to their poor solvation ability and sometimes high viscosity [39]. Consequently, they are often used in mixture with organic solvents to increase their extraction performances. Diluents can be divided into two types: active and inert. Active diluents have chemically active functional groups such as hydroxyl or carbonyl groups that are able to interact with the amphiphilic acid-base complex through hydrogen bonds and dipole-dipole interactions [15,23]. Inert diluents such as hydrocarbons that cannot interact with diluted molecules show lower efficiency since they are not able to stabilize hydrophilic compounds in the organic phase. Solvent polarity decrease, *e.g.* when the length of the alkyl chain increases, tends to reduce the extraction efficiency and so does the steric hindrance around the active group. For example, secondary alcohols have lower solvation capacity than their primary isomers [37,40].

Apart from the effects of amines and diluents' characteristics, the acid hydrophobicity [19] and acidity [39] are key factors to evaluate the degree of extraction: the more hydrophobic and acidic the extracted acid, the higher the extraction yield [41]. Differences in extraction yields even exist when comparing very similar acids like the positional isomers 3-hydroxypropionic acid and 2-hydroxypropionic acid (lactic acid) [42]. Moreover, hydrophilic carboxylic acids being polar, they tend to bind together in apolar environments such as organic phases. It is known for example that they can form dimers, trimers, and so on [23,39]. This phenomenon is less likely to occur in more polar active diluents. In particular, protic diluents like alcohols or chloroform are known to prevent such phenomena because of their H-bond donor ability. The competition between the acid and the diluent to form H-bonds with free or complexed acid molecules tends to favor acid extraction through free and complexed acid monomers [39]. All the characteristics of the compounds found in these systems play an important role on the mechanisms of extraction.

Considering all these aspects, should be preferred for 3-HP extraction a water insoluble amine (high molecular weight) providing a high density of non-hindered reactive amine groups (low molecular weight). The optimum stays in the tertiary C8-C10 amines range [43]. Therefore, we selected tri-*n*-octylamine (TOA) to perform this study and investigated several diluents according to their physicochemical properties.

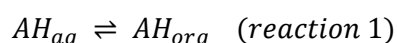
Since the purpose of an ISPR strategy is to keep the concentration of a product low to limit inhibition, in this study, 3-HP concentration will cover a rather dilute range of 0.0028 to 0.56 mol/L (0.25 to 50 g/L). The study focuses on phenomena occurring at low concentrations and related mechanisms such as the presence of impurities coming from the extractant phase.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Theory

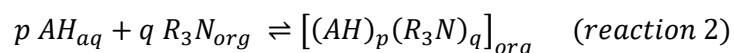
#### 2.1.1. Physical extraction

Reaction 1 describes the acid partitioning between the aqueous and organic phases:



#### 2.1.2. Reactive extraction

The formation of acid-amine complexes is the major reaction involved in acid recovery from aqueous phase. In an aqueous phase, acids and bases can react together through reversible reactions to give the corresponding solvated free conjugated bases and acids. In an organic phase, the weak polarity and dielectric constant can prevent species from forming the corresponding solvated free ions and the acidic and basic molecules can stay bound to each other through acid-base interactions. These interactions can consist in H-bondings and/or ion pair formation according to the polarity of the solvent and the strength of the acid-base interactions. As a general scheme, several acid and amine molecules can form aggregates of different stoichiometries [23]. The acid-amine complex formation can be described by the reaction 2:



### 2.2. Chemicals

#### 2.2.1. Commercial products

Solutions of 3-hydroxypropionic acid were prepared by diluting a commercial product (28.1%wt solution in water) from TCI Europe, Zwijndrecht, Belgium. The organic phase consisted in tri-*n*-



octylamine (TOA, 98% purity) diluted either in *n*-hexanol (99% purity), *n*-octanol (99% purity), *n*-decanol (99% purity), *n*-dodecanol (98% purity), ethyl octanoate (98% purity), butyl hexanoate (98% purity), *n*-hexane (99% purity), *n*-decane (99% purity), *n*-dodecane (99% purity) from Sigma-aldrich, Saint-Louis, the USA, oleyl alcohol (82.4% purity, with impurities consisting mainly in other fatty alcohols like linoleyl and stearyl alcohols [44,45]) from TCI Europe or refined sunflower oil (mainly triglycerides of oleic and linoleic acids, Lesieur, France).

In order to further investigate the influence of TOA purity on extraction efficiency, three different organic phases have been made with three different TOA purities. Two TOA solutions were purchased from the same commercial reference but had two lot numbers with different purity levels corresponding to the variations of production quality: 98.1%, solution 1, and 99.6%, solution 2, according to the certificates of analysis given by the supplier (Sigma-Aldrich). Solution 3 was obtained by purification of solution 2 as detailed below.

### 2.2.2. TOA purification

Purified TOA (solution 3) was produced as follows. The 99.6% TOA was washed using same volumes of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 M. After centrifugation, 3 homogeneous phases were observed. Only the top phase was recovered and further washed with NaOH 0.3 M. Indeed, the phase in-between is suspected to be loaded in acid-amine complexes [23] and to be sure that a maximum of impurities were removed from the TOA phase, only the top phase was recovered. These operations were repeated twice and the last TOA top phase was finally washed with deionized water. The pH of the final aqueous phase has been checked to be neutral, proving that no inorganic salts were left in purified TOA and this latter is called solution 3.

### 2.3. Experiments

Several experiments of reactive liquid-liquid extractions were performed for different initial concentrations of TOA and 3-HP. Unless specified, TOA of solution 2 (99.6% purity) was used. For each extraction, 10 mL of the aqueous phase and 10 mL of the organic phase were mixed in centrifuge tubes which were then manually shaken for 3 minutes. The stable emulsion formed was then left at 25 °C for one day before being shaken again for 3 minutes and centrifuged at 15557 *g* for 1 hour. Once the aqueous phase recovered, it was analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the extraction yield was calculated as follows:

$$Y = \frac{[AH]_{HPLC}^{ini} - [AH]_{HPLC}^{eq}}{[AH]_{HPLC}^{ini}} \quad (1)$$

with  $[AH]_{HPLC}^{ini}$  being the total initial acid concentration in the aqueous phase according to HPLC analysis and  $[AH]_{HPLC}^{eq}$  the same at equilibrium.

pH of the resulting aqueous phases was measured and compared to the theoretical pH value, based on the 3-HP dissociation (reaction 3) and calculated as follows:

$$AH \rightleftharpoons A^- + H^+ \quad K_A^{AH} = 3.09 \cdot 10^{-5} \text{ [46]} \quad (\text{reaction 3})$$

$$pH_{th} = -\log \left( \frac{-K_A^{AH} + \sqrt{(K_A^{AH})^2 + 4K_A^{AH}[AH]_{HPLC}}}{2} \right) \quad (2)$$

All the extractions were made in duplicates. For some experiments, organic phases have been back extracted with NaOH solutions (0.1-0.5 M) in order to confirm that mass balance was satisfied within 3% or less.

Experiments were centered on 0.011 mol/L (1 g/L) 3-HP and the optimal extractant concentration for this condition (0.46 mol/L = 20% v/v TOA) [42]. The initial acid concentration ranged from 0.0028 mol/L to 0.56 mol/L (0.25 to 50 g/L) for 0.46 mol/L (20% v/v) TOA in order to clearly observe limiting factors at low concentrations while having good quantification results in HPLC. Concerning the initial concentrations of amines, the whole range from 0 to 100% v/v (0 – 2.3 mol/L) was studied with steps of 10%v/v (0.23 mol/L) for 0.011 mol/L (1 g/L) 3-HP.

#### 2.4. Analytical methods

The 3-HP concentration in aqueous phases was determined using HPLC containing an Aminex HPX-87H H<sup>+</sup> exchange column (300x7.8 mm, Biorad, USA) and an H<sup>+</sup> Micro-Guard column (30mmx4.6mm, Biorad, USA). The mobile phase consisted in a 0.01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution circulating at a flowrate of 0.6 mL/min and the column temperature was set to 50 °C. An internal standard consisting in 10 g/L citric acid in water was added (50% v/v) to the samples and 20 µL of each sample were used for injection. Signals were obtained using a UV detector with the specific wavelength of 210 nm for acids. The overall HPLC analysis uncertainty, defined as the coefficient of variation of the internal standard peak area, was evaluated to 1%.

Impurities identification and titration in the aqueous phase were performed using Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled with High Resolution Mass Spectroscopy (UHPLC-HRMS). Separations were performed using a Hypersil Gold C18 column (50X2.1 mM; 1.9 µm particle size; Thermo Fisher Scientific, USA) with an Ultimate 3000 pump and Thermo 3000 RS autosampler

(Thermo Fisher Scientific, USA). The oven temperature was set to 25°C. The mobile phase was a mixture of LC/MS grade acetonitrile and water loaded with 0.1% formic acid (Optima, Thermo Fisher Scientific, USA) flowing at 250 µL/min. In a run, it first consisted in 2% acetonitrile for 4 minutes. Then a gradient was applied to reach 98% acetonitrile in 6 minutes and the mixture was then stabilized at 98% acetonitrile for 5 minutes. The mobile phase was finally set back to initial conditions (2% acetonitrile) with a 2 minutes gradient.

Samples were diluted 100-fold in water (Optima LC/MS grade, Thermo Fisher Scientific, USA) and filtered before assay with syringe filters (nylon membrane, 0.2 µm porosity and 13 mm diameter, Merck Millipore, USA).

MS analysis was carried out with a Q-EXACTIVE Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA) in positive mode with a Heated ElectroSpray Ionization (HESI) probe using a high resolution full scan. The MS resolution was 70000 in a full MS mass range (m/z) from 50 to 700 AMU. The ion transfer tube and vaporizer temperatures were set to 300°C. The electrospray voltage was set to 3 kV and the sheath, auxiliary and sweep gas (nitrogen) flow rates were set to 35, 10 and 0 arbitrary units, respectively.

IR analyses were performed using a Cary 630 Fourier Transform InfraRed spectrometer of Agilent Technologies (California, USA).

pH measurements were obtained from a SevenCompact pHmeter equipped with the Inlab Micro Pro-ISM combined pH electrode with temperature probe (Mettler Toledo, Switzerland).

Water concentration in the organic phase was determined using Karl-Fischer method with a 756 KF Coulometer (Metrohm, Switzerland). Methanol was the solvent for titration. Organic phase samples were analyzed in triplicate.

Statistical significance of differences between data was assessed using ANOVA tests at 0.05 level.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Solvents screening

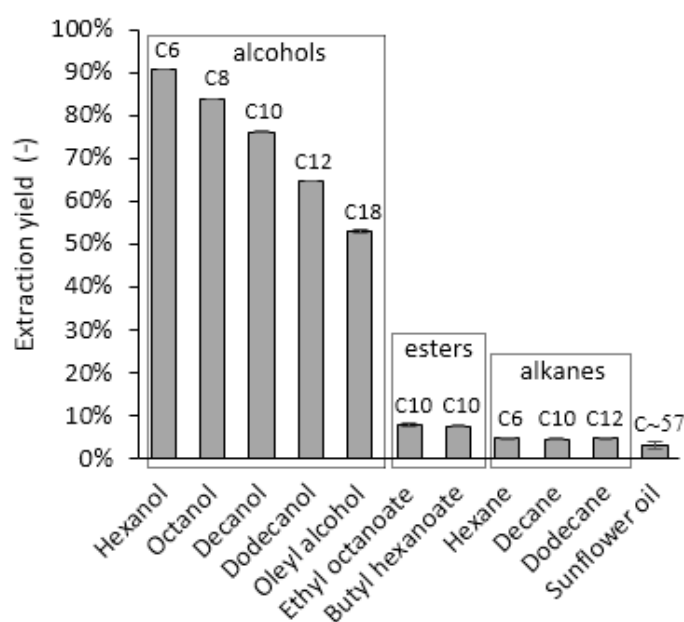


Figure I-1: Extraction yields for different solvents with 0.46 mol/L of TOA (20% v/v) and 0.011 mol/L of 3-HP (1 g/L). Error bars represent standard deviations ( $n=2$ ).

First, a set of 11 solvents were selected for a screening regarding the reactive extraction of 0.011 mol/L (1 g/L) of 3-HP in aqueous phase using 0.46 mol/L of purified TOA (20% v/v) in the organic phase. Figure I-1 provides the extraction yields for these solvents.

Three kinds of solvents were tested: alcohols, esters and alkanes with different lengths of alkyl chain and numbers of carbon atoms. They can be compared according to their extraction ability and physicochemical properties like polarity (dipole moment and relative permittivity) and H-bond ability.

The immediate conclusion from the observation of Figure I-1 is that alcohols have the highest extraction yields. Among alcohols, the shorter the chain, the higher the extraction yield: 91% for the C<sub>6</sub> hexanol, 53% for the C<sub>18</sub> oleyl alcohol. For alkanes and esters, the yield is independent of the chain length (ANOVA test with  $p=0.6$  for both), which means that the chain length cannot be used as a good parameter to discriminate solvents. If all the *n*-alcohols have approximately the same dipole moment (*i.e.* “molecular polarity”) and H-bond ability due to the same primary hydroxyl groups (Table I-1), they differ in their relative permittivity that is more related to the “bulk polarity” and hence to the molecular size and organization. In this case, the difference in solvent activity is given by their relative permittivity so that the smaller the *n*-alcohol the higher the yield.

Table I-1: Physicochemical properties of the studied solvents [47-50]

Solvent	Dipole moment (Debye)	Relative permittivity (25°C)	H-bond ability	Water solubility (mg/L, 25°C)	Number of carbon atoms	Molecular weight (g/mol)
Hexane	0	1.9	no	9.5	6	86
Decane	0	2.0	no	0.052	10	142
Dodecane	0	2.0	no	0.0037	12	170
Butylhexanoate	~ 1.8 <sup>a</sup>	~ 4.1 <sup>a</sup>	Acceptor	~ 40 <sup>c</sup>	10	172
Ethyl octanoate	~ 1.8 <sup>b</sup>	~ 4.2 <sup>b</sup>	Acceptor	70.1	10	172
Oleyl alcohol		3.8	Donor and acceptor	~ 0.02 <sup>c</sup>	18	268
Dodecanol	1.70	5.7	Donor and acceptor	4	12	186
Decanol	1.62	8.1	Donor and acceptor	37	10	158
Octanol	1.76	10.3	Donor and acceptor	540	8	130
Hexanol	1.55	13.0	Donor and acceptor	5 900	6	102
Water	1.85	78.4	Donor and acceptor		0	18
Triethylamine	0.8	~ 2.1	Acceptor	0.05 mg/L	24	354
Sunflower oil		~ 3.1	Acceptor		~ 57	~ 882

<sup>a</sup> approximate values from pentylpentanoate

<sup>b</sup> approximate values from octylacetate

<sup>c</sup> estimated values from EPI Suite™ estimation program (Syracuse Research Corporation and the U.S. Environmental Protection Agency; copyright 2000).

It is obvious that totally inert solvents like alkanes (apolar and without H-bond ability) are unable to extract the acid efficiently. *n*-hexane, *n*-decane and *n*-dodecane having the same values of relevant parameters (dipole moment, relative permittivity and H-bond ability), all provide the same efficiency as expected (5% yield). The same observations apply to the esters: both esters having the same relevant properties, they show equivalent performances (around 8% yield). This slightly, but significantly higher yield (ANOVA test with  $p < 0.02$ ), can be explained by the slightly higher polarity of the two esters compared to the three alkanes, which makes them a bit more active diluents. It is also interesting to compare esters and alcohols with similar polarities but different H-bond abilities like butylhexanoate and ethyl octanoate vs. oleyl alcohol and *n*-dodecanol. A much higher yield is obtained for both alcohols (7 times higher for oleyl alcohol than for the esters), which leads to the conclusion that the H-bond donor character of the solvent plays a key role, implying that alcohols stabilize the reactive system through H-bonding interactions. Ricker [43] suggests that the acidic hydrogen of the carboxylic acid being involved in the acid-amine bond, carboxyl becomes a strictly acceptor group. This would explain such a difference between H-bond donors and acceptors as solvents of otherwise similar polarities. Similar results in the literature confirm the importance of the solvent polarity and specific

H-bond donor character to favor the complex formation and increase the extraction yields [23,31,37,39].

Based on these results, *n*-decanol and oleyl alcohol were chosen for further investigations. *n*-hexanol and octanol were ruled out due to their excessive solubility in water that is expected to be toxic for microorganisms under integrated extractive bioconversion (ISPR) [51,52]. According to the literature review, some biocompatible vegetable oils, thanks to their low polarity and solubility in water, have been shown to be quite efficient for the removal of similar acids (propionic, pyruvic, lactic) from aqueous phases [47–49]. But in our present results, sunflower oil was found to be inefficient for 3-HP extraction with TOA (less than 7% yield) whatever the proportions used because of its weak solvation properties.

### 3.2. Physical extraction

For physical extraction experiments, concentration of 3-HP were varied from 0.0028 to 0.56 mol/L (0.25 to 50 g/L) with no TOA in the organic phase. In *n*-decanol, a linear dependence ( $R^2=0.96$ ) of the equilibrium acid concentration in the organic phase with respect to that in the aqueous phase was found (results not shown). The slope, i.e. the partition coefficient (defined as the ratio of the molar concentrations at equilibrium), was evaluated to  $0.020\pm 0.001$  by linear regression, meaning that physical extraction yield was around 2%. This is in line with Kertes and King's statement that the acid partition coefficient is independent on its concentration in the case of extraction using alcohols [15]. In oleyl alcohol, 3-HP partitioning was not detectable. Physical extraction yields were thus too low for practical purposes, confirming that the efficient liquid-liquid extraction of 3-HP needs to be driven by a chemical reaction.

### 3.3. Effects of initial amine concentration

Figure I-2 shows the extraction yield as a function of initial TOA concentration in the organic phase for 0.011 mol/L (1 g/L) of 3-HP initially in water, with *n*-decanol and oleyl alcohol as solvents. For both solvents, a bell-shaped profile can be observed. This profile illustrates the synergistic effect between TOA and these active diluents and thus the major role of the solvent. When used alone, neither TOA nor the solvents are able to extract 3-HP efficiently (less than 10% yield). However, a strong synergistic effect was observed when TOA was mixed with an active diluent. Indeed, TOA has poor solvation abilities to accumulate complexes whereas *n*-decanol and oleyl alcohol are not hydrophilic enough to extract such a hydrophilic compound in substantial proportions. When the amine and the solvent are used together, new hydrophobic properties of the complexed acid and new solvation abilities of the organic phase improve the extraction efficiency.

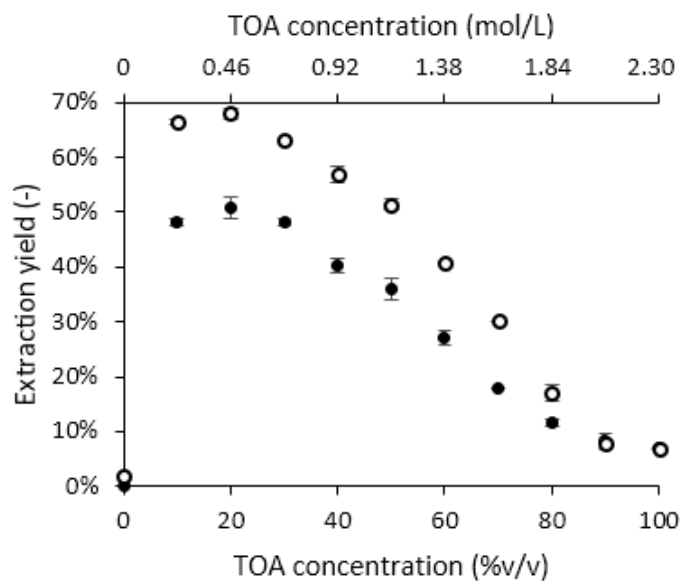


Figure I-2: Extractions yields as a function of TOA concentration in decanol (open circles) and oleyl alcohol (filled circles), with 0.011 mol/L (1g/L) of 3-HP initially. Error bars represent standard deviations ( $n=2$ ).

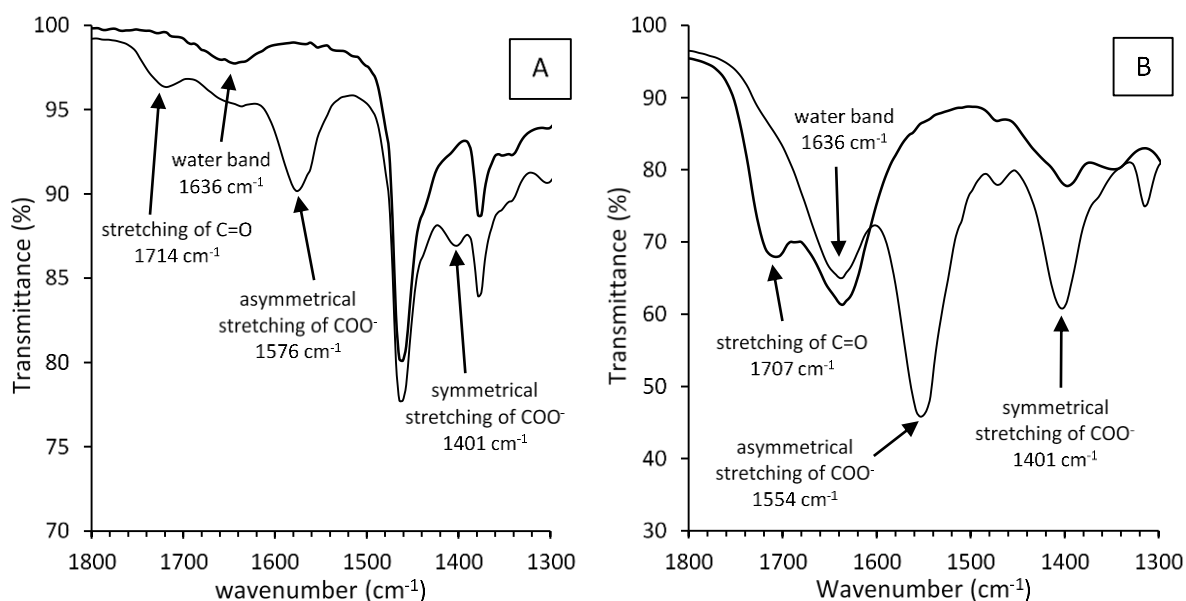


Figure I-3: IR spectra of organic phases after 3-HP extraction (53g/L in the organic phase, bold line) and after simple water contact (thin line) (A) and IR spectra of commercial aqueous phases of 3-HP before (bold line) and after (thin line) neutralization with NaOH (B)

Figure I-3 provides IR spectra obtained from two different solutions: Figure I-3A shows organic phases consisting in 20% v/v TOA in *n*-decanol and Figure I-3B shows aqueous phases of the 3-HP commercial solution for comparison. When TOA is present in the organic phase (Figure I-7A), characteristic infrared bands between 1300 and 1800  $\text{cm}^{-1}$  prove the existence of a delocalized carboxylate group in the organic phase demonstrating strong interactions between the acidic proton of 3-HP and the amine

leading to the formation of an ion pair. This observation is related to the formation of complexes involving 3-HP bonded to TOA. The fatty amine provides hydrophobic properties to the species formed, enabling a favorable distribution of the acid towards the organic phase. However, the anion, being such a polar part, needs a polar counterparts in the medium to be stabilized. Alcohols, with polar and H-bond donor hydroxyl groups, are thus able to stabilize the hydrophilic anionic conjugate in the organic phase.

As a consequence, the extraction yield of 3-HP decreases at high amine concentrations, a behavior that aligns well with reported data for acetic [43], lactic [36,56], malonic [57], propionic [30], succinic [23,57] and tartaric [25] acids in active diluents. This behavior is not observed in the case of inert diluents in which the yield increases along with the amines concentration [23]. The greatest extent of extraction of 3-HP is reached around 0.46 mol/L (20% v/v) TOA in both active diluents at 0.011 mol/L (1 g/L) of 3-HP initially with 68% and 51% yields for *n*-decanol and oleyl alcohol respectively. The maximum of the extraction yield corresponds to the optimal composition of the extracting phase.

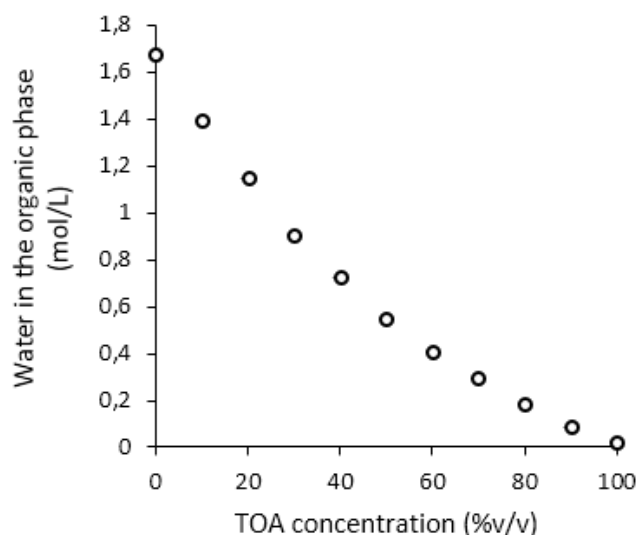


Figure I-4: Water solubility in the organic phase as a function of TOA concentration (0 – 2.3 mol/L) in decanol at 25°C. Error bars represent standard deviations ( $n=3$ ) and are masked by the symbols.

Moreover, water solubility appears to play a crucial role. As shown in Figure I-4, the more the organic phase is loaded with TOA, the less water is soluble, water being practically insoluble in TOA. Increasing the amount of TOA leads to a decrease of water content in the organic phase which could lead to a lesser stabilization of the complex and hence a lesser extraction efficiency. Tamada et al [57] reported that the amount of acid extracted and the stoichiometry of the complex in the organic phase depended on the water content in the organic phase. The amount of water soluble in the organic phase is supposed to stabilize the hydrophilic part of the complex in a rather apolar environment. Increasing the concentration of alcohol in the organic phase increases the water solubility and therefore the



solvation effect of alcohols could be in fact partially due to the solvation of water. The balance between the respective contributions in complex stabilisation cannot be assessed based on the present results because the amounts of water and alcohol are correlated.

### 3.4. Effects of initial acid concentration

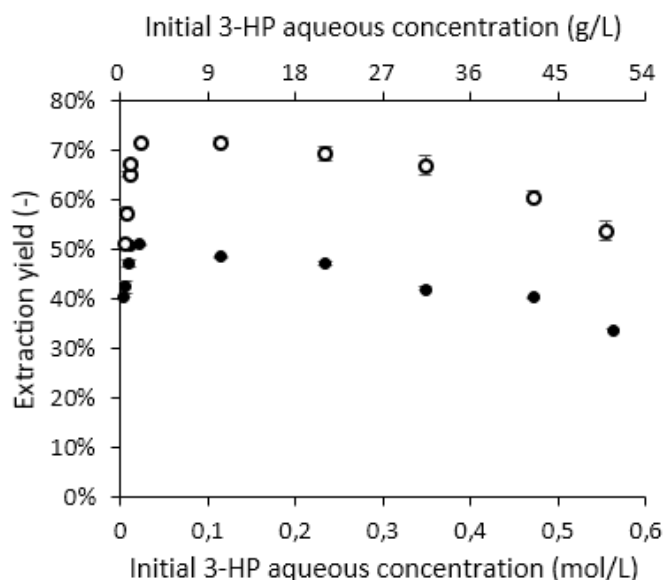


Figure I-5: Extraction yields in decanol (open circles) and oleyl alcohol (filled circles) with 0.46 mol/L TOA (20% v/v) as a function of initial acid concentration. Error bars represent standard deviations ( $n=2$ ).

Concerning the influence of the acid concentration, Figure I-5 shows that the plot of the extraction yield against initial acid concentration is not monotonic. If we consider only the partitioning of the acid and the complex formation, such a profile is not expected. Indeed, the more diluted is the acid and the more in excess are the amines; this should lead to a higher extent of reaction 2 (acid-amine complex formation) and therefore the increase of extraction yield with the decrease of 3-HP concentration. This behavior was indeed observed for initial acid concentration levels between 0.11 and 0.56 mol/L (10 – 50 g/L). But for the weakest concentration levels, a sharp decrease is observed and other phenomena are needed to explain such results. For example, in oleyl alcohol the extraction yield decreased from 51% to 40% and in *n*-decanol from 72% to 51% between 0.023 and 0.0041 mol/L (2 – 0.4 g/L) of 3-HP initially. Deeper investigations on pH effects were undertaken in the case of *n*-decanol to understand these phenomena (section 3.5.).

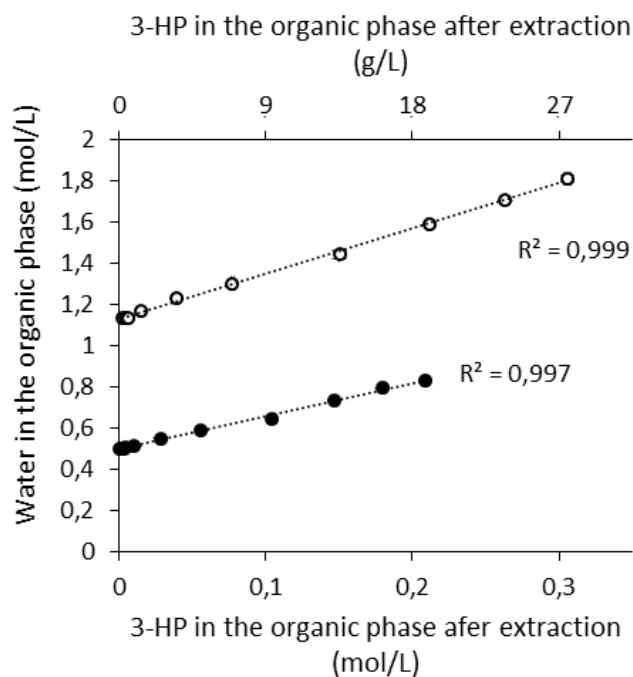


Figure I-6: water co-extraction in decanol (open circles) and oleyl alcohol (filled circles) with 0.46 mol/L TOA (20% v/v) as a function of the acid concentration in the organic phase after extraction. Error bars represent standard deviations ( $n=3$ ) and are masked by the symbols.

A further look at the water content of the organic phase after extraction proves that water is extracted in the organic phase jointly with the acid (Figure I-6). Indeed, the more acid extracted, the more water in the organic phase. Indeed, water concentration reached higher amounts than its solubility in *n*-decanol with 20%v/v TOA (1.14 mol H<sub>2</sub>O/L, Figure I-4) and in oleyl alcohol with 20%v/v TOA (0.50 mol H<sub>2</sub>O/L). Figure I-6 shows that the amount of water in the organic phase varies linearly with the acid concentration. This tends to prove that, in the range studied, each 3-HP molecule carries the same average number of water molecules in the organic phase. This hydration number (given by the slopes of the regression lines in Figure I-6) is around 2 for *n*-decanol and oleyl alcohol as solvents. This tendency of 3-HP to carry water molecules while being extracted in the organic phase could also partly explain why the extraction yield was very low with alkanes (section 3.1).

### 3.5. Influence of TOA impurities on extraction performances

### 3.5.1. pH at equilibrium

Table I-2: amount of amines (OA+DOA) found in the aqueous phase after extraction and associated measured ( $pH_{eq}$ ) and calculated ( $pH_{th}$  and  $pH_{th,OA}$ ) pH, as a function of initial 3-HP and TOA concentrations, for solutions 1 (98.1% of TOA purity), 2 (99.6% of TOA purity) and 3 (>99.6%: purified TOA)

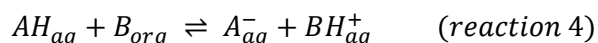
Solution 1 (TOA 98.1%)						Solution 3 (purified TOA)					
$[AH]_{ini}$ (mol/L)	$[TOA]_{ini}$ (mol/L)	$[OA]_{LCMS}$ (mmol/L)	$pH_{eq}$	$pH_{th}$	$pH_{th,OA}$	$[AH]_{ini}$ (mol/L)	$[TOA]_{ini}$ (mol/L)	$[OA]_{LCMS}$ (mmol/L)	$pH_{eq}$	$pH_{th}$	$pH_{th,OA}$
0.0028	0.46	2.0	5.4	3.6	5.1	0.0027	0.46	0.065	4.1	3.9	4.0
0.011	0.46	2.6	4.6	3.4	4.5	0.011	0.46	0.039	3.7	3.6	3.6
0.029	0.46	2.8	4.1	3.3	4.1	0.021	0.46	0.048	3.5	3.4	3.5
0.058	0.46	2.7	3.8	3.1	3.8	0.053	0.46	0.040	3.2	3.2	3.2
0.10	0.46	2.5	3.5	3.0	3.5	0.11	0.46	0.039	3.0	3.0	3.0
0.21	0.46	2.9	3.2	2.9	3.3	0.21	0.46	0.029	2.8	2.9	2.9
0.31	0.46	2.8	3.0	2.8	3.1	0.32	0.46	0.034	2.7	2.7	2.7
0.50	0.46	2.8	2.8	2.6	2.8	0.53	0.46	0.031	2.5	2.6	2.6
0.011	0.23	1.4	4.2	3.4	4.2	0.011	0.23	0.053	3.5	3.5	3.6
0.011	0.69	3.6	4.9	3.4	4.6	0.011	0.69	0.062	3.6	3.6	3.6
0.011	0.91	4.6	5.0	3.3	4.7	0.011	0.91	0.134	3.6	3.6	3.6
0.011	1.4	6.4	5.2	3.3	4.9	0.011	1.4	0.191	3.6	3.5	3.6
0.011	1.8	8.5	5.4	3.3	5.3	0.011	1.8	0.319	3.4	3.4	3.5
0.011	2.1	8.7	5.4	3.3	5.3	0.011	2.1	0.318	3.4	3.3	3.4

Solution 2 (TOA 99.6%)					
$[AH]_{ini}$ (mol/L)	$[TOA]_{ini}$ (mol/L)	$[OA]_{LCMS}$ (mmol/L)	$pH_{eq}$	$pH_{th}$	$pH_{th,OA}$
0.0041	0.46	1.0	4.8	3.6	4.5
0.011	0.46	1.2	4.3	3.5	4.2
0.023	0.46	1.2	4.1	3.4	3.9
0.11	0.46	1.2	3.4	3.0	3.3
0.23	0.46	1.2	3.2	2.8	3.0
0.35	0.46	1.2	3.2	2.7	2.9
0.55	0.46	1.3	2.9	2.6	2.7
0.011	0.23	0.54	4.1	3.5	3.8
0.011	0.69	1.5	4.5	3.5	4.3
0.011	0.91	2.3	4.6	3.4	4.5
0.011	1.4	3.4	4.5	3.4	4.5
0.011	1.8	4.9	4.5	3.3	4.5
0.011	2.1	5.4	4.5	3.3	4.5

pH of aqueous solutions were measured for after extraction and compared to the calculated values. Results are shown in Table I-2 (solution 2). Considering the pH at the equilibrium in the aqueous phase ( $pH_{eq}$ ), it appears that for the lowest acid concentrations the experimental data are above the calculated values from acid concentrations at equilibrium alone ( $pH_{th}$ , reaction 3, equation 2). This means that higher amounts of 3-HP molecules are deprotonated compared to what is expected with only 3-HP in water. When performing pH titrations of aqueous phases after acetic acid extraction by TOA in chloroform, Wardell and King [58] also reported pH deviations. They attributed this phenomenon to the transfer of tri-*n*-octylamine in the aqueous phase in the presence of acid. The same was found for lactic acid extraction at low concentration with Alamine 336 [59]. However, Ricker [43] demonstrated that, even in 10% wt acetic acid in water, TOA solubility would not exceed 10 ppm (*i.e.*  $< 3 \cdot 10^{-5}$  mol/L) and suggested that pH deviation may have been due to impurities in commercial products like primary and secondary amines, lower-molecular-weight tertiary amines and starting materials for the amine synthesis.

When sodium hydroxide was added to our aqueous samples after extraction, a condensation of organic species occurred and the solution became cloudy as already reported by some authors [57,58]. On the contrary, pure distilled water contacted with commercial TOA solution resulted in a neutral pH without any noticeable visual change when NaOH was added. This illustrates the fact that impurities are extracted in the aqueous phase under protonated form through reactive extraction with acidic species (see reaction 4) and that their partitioning as neutral forms can be neglected:



### 3.5.2. Identification of TOA impurities

Aqueous samples after extraction were analyzed with mass spectroscopy. Two main peaks appeared at  $m/z=130$  and  $m/z=242$  corresponding to both peaks of protonated *n*-octylamine ( $129 + 1 = 130$  g/mol) and protonated di-*n*-octylamine ( $241 + 1 = 242$  g/mol). Commercial samples of *n*-octylamine (OA) and di-*n*-octylamine (DOA) were also analyzed to confirm species identification. Several manufacturing processes exist for the production of fatty amines like nitrile hydrogenation or alcohols amination. For example, TOA has been produced by BASF using *n*-octanol amination with ammonia and OA leading to impurities of around 2% DOA and 1% OA [60]. This tends to confirm the presence of these impurities in the products in our study.

When acidic species are present in the aqueous phase, these TOA impurities (OA and DOA) undergo protonation and both deprotonated acid molecules and protonated amine molecules are released in the aqueous phase increasing the pH (Table I-2, solutions 1 and 2). This phenomenon can be neglected

at high acid concentration because impurities amount remains relatively low and the protonated form of TOA is practically insoluble in water [43] so that relatively low amount of acid is neutralized in the aqueous phase. Consequently, the increase of the dissociated part of 3-HP is significant only for low concentrations and this phenomenon significantly decreases the extraction yield only for concentrations under 0.1 mol/L (10 g/L, Figure I-5).

Potentiometric titration with colorimetry is often used to determine extraction yields in reactive extraction with phenolphthalein as a pH indicator [18,20,21,23,29,34]. However, the usual color turning point of phenolphthalein is at pH=8.2 [46] which means that acidic species at pH > 8.2 are not titrated. The pKa of *n*-octylammonium is 10.65 [46] which means that OA remains under its acidic form (*n*-octylammonium) above pH=8.2 and is not titrated. It implies that acidic species neutralized by *n*-octylamine are not taken into account in this titration method. From our results, it can be concluded that pH colorimetric titration is not appropriate to determine extraction yields when amines are used as extractants because it could lead to underestimated acid concentration in the aqueous phase and hence overestimating the yields, especially for low acid concentration.

### 3.5.2. Influence of TOA impurities on the extraction mechanisms

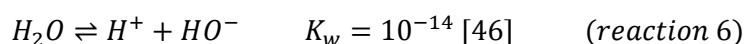
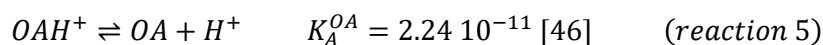
Three TOA solutions with different purity levels have been used in order to evaluate the impact of TOA impurities on the extraction process.

Analyses of aqueous phases after extraction proved that no significant TOA were released in the aqueous phases. However, OA and DOA were identified and quantified, with the former as the main amine in the aqueous phase (more than 90% of total amines concentration). Hence, total amount of amines (OA+DOA) in the aqueous phase is assimilated to OA to simplify further interpretation. The amount of OA varied between 0.031 and 9.1 mmol/L (Table I-2), depending on the following operating conditions: TOA initial concentration in the organic phase, purity of TOA and 3-HP initial concentration in the aqueous phase.

Amine transfer into the aqueous phase increases the pH. Accordingly, an amended formula should be used to calculate the pH by taking into account the amines. Knowing the total concentration of amines in the aqueous phase and their dissociation constants, the equilibrium pH of 3-HP solutions can then be calculated. If we consider that amines in the aqueous phase mainly consist in OA, the theoretical pH calculation becomes:

$$pH_{th,OA} = -\log([H^+]) \quad (3)$$

$[H^+]$  being the physical solution of the following equation (4), based on 3-HP dissociation (reaction 3), *n*-octylammonium dissociation (reaction 5), water autoprotolysis (reaction 6) and the electroneutrality principle:



$$\frac{K_A^{AH} [AH]_{HPLC}}{[H^+] + K_A^{AH}} + \frac{K_w}{[H^+]} - \frac{[H^+][OA]_{LCMS}}{K_A^{OA} + [H^+]} - [H^+] = 0 \quad (4)$$

As can be seen in table I-2, values of  $pH_{th,OA}$  are much closer to the pH measured experimentally. Accordingly, the deviations observed between  $pH_{eq}$  and  $pH_{th}$  are directly related to the impurities in commercial TOA. Moreover, pH measurement can give, as a first approximation, reliable information about the amount of impurities (OA) transferred into the aqueous phase.

Since only non-dissociated 3-HP can be extracted by TOA in the organic phase, amines transfer into the aqueous phase and the consequent increase in  $pH_{eq}$  reduces the amount of protonated 3-HP available for extraction. The final outcome of this phenomenon is the decrease of the extraction yield.

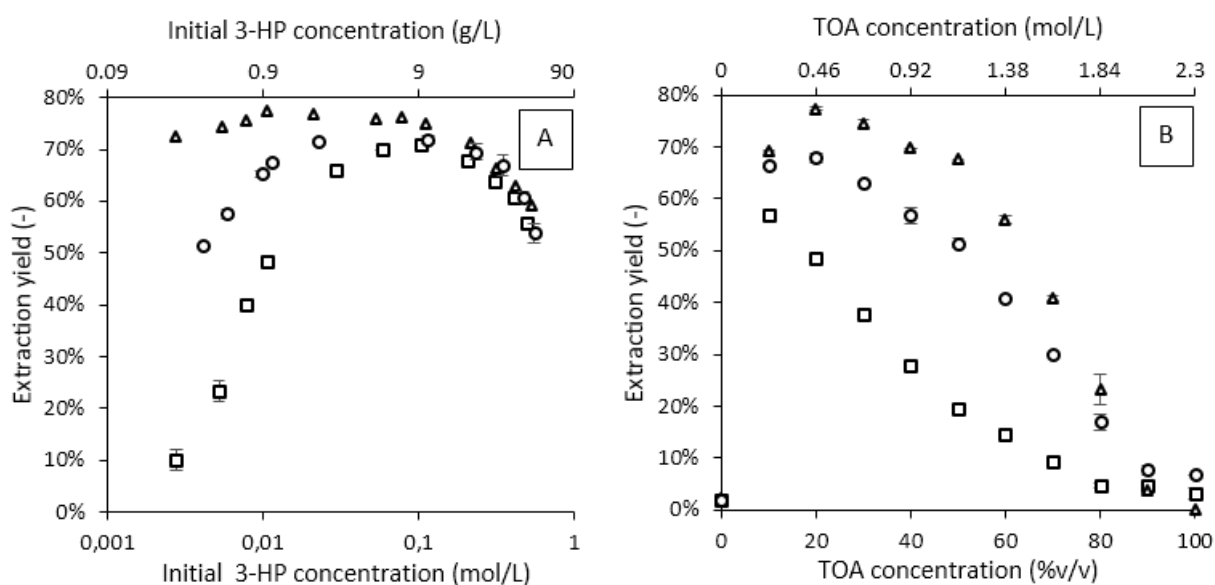


Figure I-7: Extraction yields for different TOA solutions (squares: solution 1 (98.1% purity); circles: solution 2 (99.6% purity); triangles: solution 3 (purified TOA)) in decanol as a function of initial acid concentration at 0.46 mol/L TOA (20% v/v) (A) and initial TOA concentration at 0.011 mol/L 3-HP (1 g/L) (B). Error bars represent standard deviations ( $n=2$ ).

Yield reduction caused by TOA impurities is illustrated in figures I-5 and I-7A for low acid concentrations. In Figure I-7A, the plot is given in logarithmic scale for initial 3-HP concentration in order to clearly observe the discrepancies for the small acid concentrations and the similarities for high

acid concentrations. For a given TOA concentration in the organic phase (0.46 mol/L = 20% v/v), the three solutions provide equivalent yields at high acid concentration (>0.11 mol/L = 10 g/L). This was expected since the amount of amines released in the aqueous phase is small compared to the acid concentration, and its influence on the yield becomes negligible. However, for low acid concentrations, OA and DOA impurities present in TOA solutions have a strong impact. For example, at around 5mmol/L (0.5 g/L) 3-HP initially, the extraction yield is 23% for solution 1 (2.5 mmol/L OA), 58% for solution 2 (1.0 mmol/L OA) and 74% for solution 3 (0.0058 mmol/L OA). The yield decrease at low acid concentration with commercial TOA (solutions 1 and 2) is dramatic whereas with purified TOA (solution 3) the decrease is much smaller. Nevertheless, it still denotes the release of weak amounts of impurities, but with much lower importance than from unpurified TOA. In figure I-7B, one can see a much smaller yield decrease for purified TOA (solution 3) than for solution 1 along with the increase of amine concentration, up to about 50% v/v TOA. This steeper decrease for unpurified TOA is due to impurities release, whereas for purified TOA only the solvating effect is noticeable.

In the case of purified TOA, results shown in Table I-2 confirm that the purification of TOA was effective, dividing the amount of amines released in the aqueous phase by a factor 30 when compared to solution 2 and a factor 65 when compared to solution 1. This decrease makes the amount of amines practically negligible in the aqueous phase, as confirmed by pH measurements. Besides the effects described above on the extraction chemistry, the diminution of the released amines by means of the purification step is particularly recommended if microorganisms are used in a biological process due to expected amine toxicity. For example, a similar lactate – long chains alkyl ammonium salt in an aqueous phase proved to be very toxic for several kinds of microorganisms [61]. Purification of fatty tertiary amines can be reached for example with an adsorption process as described in a US patent [62]. In continuous chemical processes, however, the presence of impurities would have less impact because the recycled organic phase would be washed by the continuous fresh aqueous flow and small amines would be readily depleted [43].

#### 4. Conclusion

This paper reports a comprehensive study of the reactive extraction of 3-HP, a valuable platform molecule. The experimental approach was designed in line with a potential application of reactive extraction for the *in situ* product recovery of this acid. It appeared from the solvent screening experiments, performed for the first time on 3-HP, that the type of solvent has a great influence on the extraction yield, with H-bond donor characteristic and polarity being the most important properties to increase the yield. This highlights strong interactions between the solvent and the complexes formed between acids and amines. Water solubility in the organic phase also seems to be

a major factor in complex stabilization. In active diluents like *n*-decanol and oleyl alcohol, a bell-shaped profile of the extraction yield as a function of amine concentration is observed with very low extraction yields at high amine concentrations. This proves the major role of the solvent in the extraction process. In these solvents, the increase in initial acid concentration from 0.003 up to 0.1 mol/L (0.25 – 10 g/L) led to an increase in extraction yield while a further increase from 0.1 to 0.56 mol/L (10 – 50 g/L) led to the reduction of the extraction yield. This phenomenon has been shown to be due to amines transfer in the aqueous phase, with significant impact for low acid concentrations. Deviation of equilibrium pH from what should be expected with the remaining acid in the aqueous phase demonstrated the presence of impurities. We identified the release of *n*-octylamine and di-*n*-octylamine coming from commercial TOA into the aqueous phase even with 99.6% purity. This transfer reduces extraction yields at low initial acid concentrations and increases equilibrium pH which is, accordingly, a reliable indicator of amines concentration in water. Given the extraction yield reduction and the suspected toxicity for microorganisms performing bioconversions, purification of TOA before use could be necessary. These results give insights in extraction mechanisms of organic acids, further clarifying the role of the organic solvent and water in the stabilization of the acid-amine complex and pointing out the role of the amine impurities in extraction yield reduction and biocompatibility of the extraction process. All this understanding is essential for further mechanistic and predictive modeling.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank AgroParisTech students of the 189<sup>th</sup> promotion and Dr Claire Saulou-Bérion for having provided valuable experimental assistance, and the Région Champagne-Ardenne, the Conseil départemental de la Marne and Reims Métropole for financial support.



## 5. Références

- [1] T. Werpy, G. Petersen, A. Aden, J. Bozell, J. Holladay, J. White, A. Manheim, D. Elliot, L. Lasure, S. Jones, M. Gerber, K. Ibsen, L. Lumberg, S. Kelley, Top Value Added Chemicals from Biomass, Volume 1—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, TN, 2004.
- [2] J.J. Bozell, G.R. Petersen, Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited, *Green Chemistry*. 12 (2010) 539.
- [3] T. Dishisha, L.P. Pereyra, S.-H. Pyo, R.A. Britton, R. Hatti-Kaul, Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol, *Microbial Cell Factories*. 13 (2014) 1–11.
- [4] G. Burgé, C. Saulou-Bérion, M. Moussa, B. Pollet, A. Flourat, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler, Diversity of *Lactobacillus reuteri* Strains in Converting Glycerol into 3-Hydroxypropionic Acid, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 177 (2015) 923–939.
- [5] K. Kim, S.-K. Kim, Y.-C. Park, J.-H. Seo, Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by modulation of glycerol metabolism in recombinant *Escherichia coli*, *Bioresource Technology*. 156 (2014) 170–175.
- [6] H.S. Chu, Y.S. Kim, C.M. Lee, J.H. Lee, W.S. Jung, J.-H. Ahn, S.H. Song, I.S. Choi, K.M. Cho, Metabolic engineering of 3-hydroxypropionic acid biosynthesis in *Escherichia coli*, *Biotechnology and Bioengineering*. 112 (2015) 356–364.
- [7] V. Kumar, S. Ashok, S. Park, Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid, *Biotechnology Advances*. 31 (2013).
- [8] E.I. Lan, D.S. Chuang, C.R. Shen, A.M. Lee, S.Y. Ro, J.C. Liao, Metabolic engineering of cyanobacteria for photosynthetic 3-hydroxypropionic acid production from CO<sub>2</sub> using *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Metabolic Engineering*. 31 (2015) 163–170.
- [9] Y. Wang, T. Sun, X. Gao, M. Shi, L. Wu, L. Chen, W. Zhang, Biosynthesis of platform chemical 3-hydroxypropionic acid (3-HP) directly from CO<sub>2</sub> in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Metabolic Engineering*. 34 (2016) 60–70.
- [10] I.-Y. Jung, J.-W. Lee, W.-K. Min, Y.-C. Park, J.-H. Seo, Simultaneous conversion of glucose and xylose to 3-hydroxypropionic acid in engineered *Escherichia coli* by modulation of sugar transport and glycerol synthesis, *Bioresource Technology*. 198 (2015) 709–716.
- [11] K.R. Kildegaard, Z. Wang, Y. Chen, J. Nielsen, I. Borodina, Production of 3-hydroxypropionic acid from glucose and xylose by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*, *Metabolic Engineering Communications*. 2 (2015) 132–136.
- [12] Z. Jin, S.-T. Yang, Extractive fermentation for enhanced propionic acid production from lactose by *Propionibacterium acidipropionici*, *Biotechnology Progress*. 14 (1998) 457–465.
- [13] Z. Wu, S.-T. Yang, Extractive fermentation for butyric acid production from glucose by *Clostridium tyrobutyricum*, *Biotechnology and Bioengineering*. 82 (2003) 93–102.
- [14] L. Zhao, J. Lin, H. Wang, J. Xie, D. Wei, Development of a two-step process for production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol using *Klebsiella pneumoniae* and *Gluconobacter oxydans*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 38 (2015) 2487–2495.
- [15] A.S. Kertes, C.J. King, Extraction Chemistry of Fermentation Product Carboxylic Acids, *Biotechnology and Bioengineering*. 28 (1986) 269–282.
- [16] V. Bízek, J. Horáček, M. Koušová, A. Heyberger, J. Procházka, Mathematical model of extraction of citric acid with amine, *Chemical Engineering Science*. 47 (1992) 1433–1440.
- [17] V. Bízek, J. Horáček, M. Koušová, Amine extraction of citric acid: effect of diluent, *Chemical Engineering Science*. 48 (1993) 1447–1457.

- [18] A. Keshav, P. Norge, K.L. Wasewar, Reactive Extraction of Citric Acid Using Tri-n-octylamine in Nontoxic Natural Diluents: Part 1—Equilibrium Studies from Aqueous Solutions, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 167 (2012) 197–213.
- [19] M. Matsumoto, T. Otono, K. Kondo, Synergistic extraction of organic acids with tri-n-octylamine and tri-n-butylphosphate, *Separation and Purification Technology*. 24 (2001) 337–342.
- [20] D. Datta, S. Kumar, Reactive Extraction of Glycolic Acid Using Tri-n-Butyl Phosphate and Tri-n-Octylamine in Six Different Diluents: Experimental Data and Theoretical Predictions, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 50 (2011) 3041–3048.
- [21] H. Uslu, Ş.İ. Kirbaşlar, Extraction of aqueous of malic acid by trioctylamine extractant in various diluents, *Fluid Phase Equilibria*. 287 (2010) 134–140.
- [22] J. Prochazka, A. Heyberger, V. Bizek, M. Kousova, E. Volaufova, Amine extraction of hydroxycarboxylic acids. 2. Comparison of equilibria for lactic, malic, and citric acids, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 33 (1994) 1565–1573.
- [23] J.A. Tamada, A.S. Kertes, C.J. King, Extraction of Carboxylic Acids with Amine Extractants. 1. Equilibria and Law of Mass Action Modeling, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 29 (1990) 1319–1326.
- [24] R.-S. Juang, R.-H. Huang, Comparison of extraction equilibria of succinic and tartaric acids from aqueous solutions with tri-n-octylamine, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 35 (1996) 1944–1950.
- [25] M. Marinova, G. Kyuchoukov, J. Albet, J. Molinier, G. Malmary, Separation of tartaric and lactic acids by means of solvent extraction, *Separation and Purification Technology*. 37 (2004) 199–207.
- [26] N. Marchitan, C. Cojocaru, A. Mereuta, G. Duca, I. Cretescu, M. Gonta, Modeling and optimization of tartaric acid reactive extraction from aqueous solutions: A comparison between response surface methodology and artificial neural network, *Separation and Purification Technology*. 75 (2010) 273–285.
- [27] A.F. Tuyun, H. Uslu, Reactive extraction of acrylic acid using trioctylamine (TOA) in versatile diluents, *Desalination and Water Treatment*. 55 (2015) 193–198.
- [28] K. Wang, Z. Chang, Y. Ma, C. Lei, S. Jin, Y. Wu, I. Mahmood, C. Hua, H. Liu, Equilibrium study on reactive extraction of propionic acid with N1923 in different diluents, *Fluid Phase Equilibria*. 278 (2009) 103–108.
- [29] S. Kumar, D. Datta, B.V. Babu, Experimental Data and Theoretical (Chemodel Using the Differential Evolution Approach and Linear Solvation Energy Relationship Model) Predictions on Reactive Extraction of Monocarboxylic Acids Using Tri-n-octylamine, *Journal of Chemical & Engineering Data*. 55 (2010) 4290–4300.
- [30] A. Keshav, K.L. Wasewar, S. Chand, Reactive extraction of propionic acid using tri-n-octylamine, *Chemical Engineering Communications*. 197 (2009) 606–626.
- [31] Y.S. Aşçı, İ. İnci, Extraction equilibria of propionic acid from aqueous solutions by Amberlite LA-2 in diluent solvents, *Chemical Engineering Journal*. 155 (2009) 784–788.
- [32] A. Senol, Influence of diluent on amine extraction of pyruvic acid using Alamine system, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 45 (2006) 755–763.
- [33] M.E. Marti, T. Gurkan, L.K. Doraiswamy, Equilibrium and Kinetic Studies on Reactive Extraction of Pyruvic Acid with Trioctylamine in 1-Octanol, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 50 (2011) 13518–13525.
- [34] D. Pal, A. Tripathi, A. Shukla, K.R. Gupta, A. Keshav, Reactive Extraction of Pyruvic Acid Using Tri-n-octylamine Diluted in Decanol/Kerosene: Equilibrium and Effect of Temperature, *Journal of Chemical & Engineering Data*. 60 (2015) 860–869.
- [35] R.-S. Juang, R.-H. Huang, Equilibrium studies on reactive extraction of lactic acid with an amine extractant, *Chemical Engineering Journal*. 65 (1997) 47–53.
- [36] G. Kyuchoukov, D. Yankov, Lactic Acid Extraction by Means of Long Chain Tertiary Amines: A Comparative Theoretical and Experimental Study, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 51 (2012) 9117–9122.

- [37] G. Kaur, K. Elst, Development of reactive extraction systems for itaconic acid: a step towards in situ product recovery for itaconic acid fermentation, *RSC Advances*. 4 (2014) 45029–45039.
- [38] M. Reschke, K. Schügerl, Reactive Extraction of Penicillin II: Distribution Coefficients and Degrees of Extraction, *Chemical Engineering Journal*. 28 (1984) B11–B20.
- [39] J.A. Tamada, C.J. King, Extraction of Carboxylic Acids with Amine Extractants. 2. Chemical Interactions and Interpretations of Data, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 29 (1990) 1327–1333.
- [40] H. Uslu, Ş. İsmail Kirbaşlar, K.L. Wasewar, Reactive Extraction of Levulinic Acid by Amberlite LA-2 Extractant, *Journal of Chemical & Engineering Data*. 54 (2009) 712–718.
- [41] A. Senol, Extraction equilibria of nicotinic acid using Alamine 336 and conventional solvents: effect of diluent, *Chemical Engineering Journal*. 83 (2001) 155–163.
- [42] M. Moussa, G. Burgé, F. Chemarin, R. Bounader, C. Saulou-Bérion, F. Allais, H.-E. Spinnler, V. Athès, Reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid from model aqueous solutions and real bioconversion media. Comparison with its isomer 2-hydroxypropionic (lactic) acid, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. (2015)
- [43] N.L. Ricker, C.J. King, Solvent Extraction of Wastewaters from Acetic-Acid Manufacture, Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory (U.S. Environmental Protection Agency), Ada, OK, United States, 1980.
- [44] D. Swern, H.B. Knight, T.W. Findley, Purification of oleic acid, methyl oleate, and oleyl alcohol for use as chemical intermediates, *Oil & Soap*. 21 (1944) 133–139.
- [45] M.A. Liebert, Final Report on the Safety Assessment of Stearyl Alcohol, oleyl Alcohol, and Octyl Dodecanol, *Journal of the American College of Toxicology*. 4 (1985).
- [46] D.L. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 84th ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 2003.
- [47] J. Śliwiok, T. Kowalska, Spectroscopic and dielectric examination of the oleyl alcohol-oleic acid system, *Microchemical Journal*. 18 (1973) 605–612.
- [48] J.P. Hawranek, A.S. Muszyński, J.Z. Flejszar-Olszewska, Infra-red dispersion of liquid trioctylamine, *Journal of Molecular Structure*. 436 (1997) 605–612.
- [49] C.L. Yaws, P.K. Narasimhan, *Thermophysical Properties of Chemicals and Hydrocarbons*, Chapter 19 Dipole moments - Organic compounds, William Andrew Publishing, Norwich, NY, 2009.
- [50] Y. Marcus, *Wiley series in solution chemistry: volume 4, The properties of solvents*, Wiley, Chichester ; New York, 1998.
- [51] M. Matsumoto, K. Mochiduki, K. Kondo, Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid-producing bacteria, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 98 (2004) 344–347.
- [52] M. Vermüë, J. Sikkema, A. Verheul, R. Bakker, J. Tramper, Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* Sp. and the gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Sp., *Biotechnology and Bioengineering*. 42 (1993) 747–758.
- [53] D. Pal, A. Keshav, Recovery of Pyruvic Acid using Tri-n-butylamine Dissolved in Non-Toxic Diluent (Rice Bran Oil), *Journal of The Institution of Engineers (India): Series E*. (2015).
- [54] T. Harington, M.M. Hossain, Extraction of lactic acid into sunflower oil and its recovery into an aqueous solution, *Desalination*. 218 (2008) 287–296.
- [55] A. Keshav, K.L. Wasewar, S. Chand, Reactive extraction of propionic acid using tri-n-octylamine, tri-n-butyl phosphate and aliquat 336 in sunflower oil as diluent, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 84 (2009) 484–489.
- [56] B. Choudhury, A. Basha, T. Swaminathan, Study of lactic acid extraction with higher molecular weight aliphatic amines, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 72 (1998) 111–116.
- [57] J.A. Tamada, C.J. King, Extraction of Carboxylic Acids by Amines Extractant, Lawrence Berkeley Laboratory, CA (USA), United States, 1989.
- [58] J.M. Wardell, C.J. King, Solvent equilibria for extraction of carboxylic acids from water, *Journal of Chemical and Engineering Data*. 23 (1978) 144–148.

- [59] L.-K. Ju, A. Verma, Characteristics of lactic acid transport in supported liquid membranes, *Separation Science and Technology*. 29 (1994) 2299–2315.
- [60] *Encyclopedia of Chemical Technology, Alkanolamines to Antibiotics*, 4th edition, Kirk-Othmer, 1993.
- [61] J. Cybulski, A. Wiśniewska, A. Kulig-Adamiak, L. Lewicka, A. Cieniecka-Rostonkiewicz, K. Kita, A. Fojutowski, J. Nawrot, K. Materna, J. Pernak, Long-Alkyl-Chain Quaternary Ammonium Lactate Based Ionic Liquids, *Chemistry - A European Journal*. 14 (2008) 9305–9311.
- [62] A. Coenen, K. Koswig, F. Von Praun, H.-P. Schüller, Purification of tertiary amines using an adsorbent, 4255356, 1981.

## 6. Principaux résultats et remarques supplémentaires

- Le rendement d'extraction dépend beaucoup du type de solvant. Les alcools sont les plus efficaces (90 – 50%) alors que les esters et les alcanes de taille similaire ne montre pas d'efficacité particulière (<10%) de même que l'huile de tournesol. Ceci est dû au caractère donneur des alcools pour la réalisation de liaisons hydrogène qui peuvent stabiliser la partie hydrophile du complexe acide-amine en phase organique.
- Ainsi, la présence du solvant est-elle nécessaire et un excès trop important d'amine en phase organique sera néfaste pour l'extraction. En effet, l'amine est un mauvais solvant pour le complexe et un optimum se trouve pour une composition de phase organique qui favorise à la fois l'excès d'amine pour la complexation et l'excès de solvant pour la stabilisation du complexe. Pour le décanol et l'alcool oléique, cet optimum se situe à 20%v/v TOA.
- L'extraction de 3-HP conduit à la co-extraction d'eau en phase organique, c'est-à-dire de l'eau au-dessus du niveau de saturation correspondant en absence de 3-HP. Cette eau fait donc partie du système de solvation du 3-HP en phase organique. Pour une phase organique constituée de 20%v/v TOA dans le décanol et l'alcool oléique, cette co-extraction se réalise à hauteur d'environ 2 molécules d'eau par molécule de 3-HP soit environ  $0,4 \text{ g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{3\text{-HP}}$ .
- Les valeurs anormalement élevées de pH après extraction ont conduit à l'hypothèse de la présence d'impuretés en phase organique venant neutraliser le 3-HP en phase aqueuse. Cette hypothèse a été vérifiée par l'identification et le dosage des espèces en question dans la phase aqueuse après extraction. Il s'agit de l'octylamine et de la dioctylamine. Des lavages acido-basiques de la TOA commerciale conduisent, après extraction, à des pH correspondant aux concentrations en 3-HP et les impuretés ne sont détectées qu'à l'état de traces négligeables pour l'extraction. Cependant, pour un usage en procédé ISPR, l'élimination totale de ces impuretés pourrait s'avérer nécessaire pour limiter la toxicité.

Le solvant choisi pour le reste de l'étude est le décanol car il s'agit d'un solvant très peu soluble dans l'eau avec une efficacité d'extraction raisonnable qui pourrait être envisagé dans le cadre d'un procédé ISPR. Dans le cadre de cette thèse, l'ajout d'Aliquat 336, un chlorure d'ammonium quaternaire aliphatique, au système d'extraction a également été testé. L'Aliquat 336 seul ou dans le décanol ne présente pas d'efficacité d'extraction particulière pour le 3-HP. Cependant, il a été trouvé qu'un système d'extractant binaire constitué de TOA et d'Aliquat 336 montrait une synergie avec une efficacité supérieure à la somme des deux extractants pris séparément et pour un mélange 10%v/v

TOA et 10%v/v Aliquat 336 dans le décanol des rendements d'extraction autour de 90% ont été observés. En effet, l'optimum du ratio TOA/Aliquat 336 se trouve autour de 1 pour un meilleur rendement. Certains de ces travaux ont fait l'objet de publications (CF liste des valorisations) mais ne seront pas traités plus avant dans ce manuscrit. Notamment à cause des aspects négatifs de l'utilisation de l'Aliquat 336 à savoir sa forte toxicité envers les micro-organismes producteurs, la difficulté à récupérer le 3-HP de la phase organique avec l'extractant binaire et l'introduction d'une nouvelle espèce chargée propice à des réactions parasites. Par exemple, le tableau I-3 ci-dessous représente l'impact de la fraction soluble dans l'eau à saturation de la phase organique correspondante sur la viabilité cellulaire de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, une bactérie capable de produire du 3-HP à partir de glycérol, au bout de 3h de contact. La méthode utilisée pour évaluer la viabilité cellulaire est la cytométrie en flux. Le taux de viabilité représente la part des cellules présentant une activité estérasiqque et une membrane cellulaire non-endommagée après le contact. On voit bien que l'Aliquat 336, même en quantité limitée (2% v/v), est très délétère.

Tableau I-3 : Influence de la présence de quelques solvants à niveau de saturation dans l'eau sur la viabilité cellulaire de *L. reuteri*

Eau osmosée saturée par	Viabilité cellulaire
n-décanol	84%
TOA (20% v/v) dans n-décanol	93%
TOA (18% v/v) et Aliquat 336 (2% v/v) dans n-décanol	39%

Des précisions concernant le mode opératoire exacte, le matériel utilisé ainsi que le principe de fonctionnement du cytomètre en flux sont disponibles dans la référence suivante :

G. Burgé, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, **F. Chemarin**, M. Kniest, F. Allais, H.-E. Spinnler, V. Athès, *Towards an extractive bioconversion of 3-hydroxypropionic acid: study of inhibition phenomena: Evaluation of bacterial cell inhibition during 3-HP extractive bioconversion*, J. Chem. Technol. Biotechnol. 92 (2017).2425–2432.

Après avoir révélé les phénomènes de solvation dans la phase organique, nous nous intéressons à présent à la détermination du mécanisme chimique exact d'extraction ainsi qu'à la quantification de l'influence du solvant dans les non-idéalités révélées. Pour ceci, nous nous appuyons sur la spectrométrie infra-rouge pour l'étude des liaisons chimiques et la modélisation mécanistique pour la prédiction des états d'équilibres et donc des rendements. Les modèles se doivent d'intégrer les phénomènes chimiques de complexation identifiés et les phénomènes physiques de solvation.

## Publication n°2

### **Modélisation mécanistique et prédiction de l'équilibre de l'extraction réactive d'acides organique par des amines : étude comparative de deux modèles de complexation-solvatation pour l'acide 3-hydroxypropionique**

Une étude complète des états d'équilibre de l'acide 3-hydroxypropionique (3-HP) par la tri-*n*-octylamine (TOA) dans le *n*-décanol est décrite. Les phénomènes de complexation entre le 3-HP et la TOA ont été révélés par spectrométrie infrarouge (IRTF). Cette étude démontre que le principal mécanisme de complexation est la formation d'une paire d'ions mettant en jeu la forme dissociée du 3-HP. Des modèles chimiques ont été élaborés prenant en compte la formation de la paire d'ion entre le 3-HP et la TOA et l'influence de la quantité de solvant dans la phase organique. Deux modèles sont proposés : (1) un modèle dit stoechiométrique où le solvant est considéré comme un réactif impliqué dans la complexation comme un extractant synergique avec toutefois une compétition de solvatation pour la TOA par liaison H, (2) un modèle où le solvant est considéré comme une espèce modifiant la phase organique en améliorant les propriétés physico-chimiques de l'extractant et qui change l'équilibre de complexation. Les deux modèles peuvent décrire les rendements d'extraction dans les gammes de concentrations étudiées, le modèle (2) étant particulièrement prédictif étant donné qu'il donne une erreur absolue moyenne sur les prédictions de moins de 2% en unités de rendement. Selon ce dernier modèle, le coefficient d'équilibre de la complexation augmente avec l'augmentation de la proportion de *n*-décanol dans la phase organique. Le modèle (2) montre que les effets de solvatation sont mieux décrits par des interactions non-stoechiométriques. Par conséquent, les deux modèles mécanistiques représentent assez précisément les rendements d'extraction sur une grande gamme de conditions initiales et sont potentiellement transposables à d'autres systèmes d'extraction réactive. Cette connaissance est essentielle pour la mise en œuvre plus approfondie d'un procédé downstream.

Mots-clés: extraction par solvant; acide organique ; solvatation de complexe, spectroscopie infrarouge ; modélisation d'équilibre



## Mechanistic modeling and equilibrium prediction of the reactive extraction of organic acids with amines: A comparative study of two complexation-solvation models using 3-hydroxypropionic acid



F. Chemarin<sup>a,b</sup>, M. Moussa<sup>b,\*</sup>, F. Allais<sup>a,b</sup>, V. Athès<sup>b</sup>, I.C. Trelea<sup>b</sup>

<sup>a</sup> AgroParisTech, Chaire Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI) – CEBB, 3 rue des Rouges Terres, 51110 Pomacle, France

<sup>b</sup> UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850 Thiverval-Grignon, France

### Abstract

A comprehensive study of equilibrium states involved in the reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid (3-HP) by tri-*n*-octylamine (TOA) in *n*-decanol is described. Complexation phenomena between 3-HP and TOA were revealed by infrared spectroscopy (FT-IR). This study demonstrated that the main extraction mechanism is the formation of an ion pair involving the dissociated form of 3-HP. Chemical models were then formulated, taking the formation of the ion pair between 3-HP and TOA and the influence of the amount of solvent in the organic phase into account. Two models are proposed: (1) a stoichiometric model where the solvent is seen as a reagent that is involved in the complexation as a synergistic extractant, but with competition for solvation via H-bond interactions with TOA; (2) a model where the solvent is seen as a phase modifier that improves the physicochemical properties of the extractant and that changes the complexation equilibrium. Both models describe the extraction yields in the investigated ranges, with Model (2) being particularly predictive since it provides a mean absolute prediction error of less than 2% in yield units. According to this latter model, the complexation equilibrium coefficient increases with the increase of the *n*-decanol proportion in the organic phase. Model (2) shows that solvation effects are better described as non-stoichiometric interactions. Therefore, the two mechanistic models accurately represent extraction yields over a wide range of initial conditions and are potentially transposable to other reactive extraction systems. Such knowledge is essential for further implementation of downstream processes.

### Keywords

Solvent extraction; organic acid; complex solvation; infrared spectroscopy; equilibrium modeling



## Abbreviations

3-HP: 3-hydroxypropionic acid

$a_k$ : polynomial coefficients

A<sup>-</sup>: organic acid in dissociated form

AH: organic acid in non-dissociated form

$[AH]_{ini}$ : initial aqueous concentration of organic acid in all forms (mol/L)

c: general chemical species

C: molar concentration of a chemical species (mol/L)

$K_{11}$ : complexation equilibrium constant for a complex containing one acid molecule and one amine molecule (L/mol)

$K_{11n}$ : complexation equilibrium constant for a 1:1 acid:amine complex including n solvent molecules in the complexation reaction ((L/mol)<sup>n+1</sup>)

$K_A$ : acidity constant of the organic acid (-)

$K_{aq}$ : equilibrium constant for the protonation of octylamine with AH (-)

$K_w$ : water autoprotolysis constant (-)

m: partition coefficient of AH between water and solvent (-)

n: stoichiometric coefficient

$N_1$ : number of experimental values used for the calibration of the models

$N_2$ : number of experimental values in the validation dataset

OA: octylamine

OAH<sup>+</sup>: octylammonium (protonated octylamine)

p: stoichiometric coefficient

P: number of fitted parameters in each model

RMSD: root mean squared deviation

SER: standard error of the regression

TOA: tri-*n*-octylamine

TOAH<sup>+</sup>: trioctylammonium (protonated tri-*n*-octylamine)

x: molar fraction

z: charge of an ionic species

$|\Delta X|$ : absolute error between a model value and an experimental value for variable X (unit of X)

$\gamma$ : activity coefficient

$\Gamma$ : function representing non-idealities

$\nu$ : general stoichiometric coefficient of a chemical reaction

$\varphi$ : volume fraction of the solvent in the organic phase

$\chi$ : electronegativity (Pauling scale)

*Subscripts and superscripts:*

aq: in the aqueous phase

ini: initially, before extraction

mod: concerning the model predicted values

org: in the organic phase

ROH: concerning the solvent (in this case, *n*-decanol)

TOT: takes all the chemical speciations of a species into account

## 1. Introduction

Reactive extraction has been widely investigated for the removal of organic acids from dilute aqueous phases, especially for organic acids produced by bioconversion. In such a process, a hydrophilic acidic molecule can be extracted based on its interaction with a basic hydrophobic amine diluted in an organic phase. Acid and amine interact with each other and are usually said to form a hydrophobic complex [1].

The scientific literature provides numerous equilibrium studies and modeling methods for the reactive extraction of organic acids with amines in different solvents. Determination of the equilibrium state and of the extraction yield from given initial conditions has been studied using several kinds of predictive and semi-predictive models. For example, the Linear Solvation Energy Relationship model that focuses on specific interactions between solutes and solvents requires a large number of tested solvents and fitted parameters [2,3]. Statistical methods based on experimental design like the response surface methodology or neural networks [4,5] result in models that do not take physicochemical mechanisms into account. Thermodynamic models [6–8] consider all physicochemical interactions but require activity coefficients obtained either through complex predictive calculations or the fitting of numerous parameters for semi-predictive models, a prerequisite due to a lack of experimental data for the studied systems. However, the most frequently used model is certainly the chemical one [1,9–11] (sometimes referred to as “chemodel”) thanks to its theoretical simplicity, accurate results and direct insights into extraction mechanisms. Chemical models assume that chemical interactions (i.e., specific relatively strong interactions involved in complex formation) are much stronger than physical interactions (i.e., nonspecific weak interactions such as solvation). The equilibrium behavior can be modeled by the formation of various reversible stoichiometric complexes of acids and amines with corresponding equilibrium constants. In chemodels, the stoichiometry of complexes is determined by the best fit between experimental measurements and predictions based on mass balance and mass action laws.

Our previous study [12] highlighted strong interactions between the solvent used, i.e., decanol, and the acid–amine complex. We provided experimental results that emphasized some physicochemical interactions involved in the complex formation and the importance of the amine purity. Scientific literature reports some studies dealing with C<sub>3</sub>-monocarboxylic acid extraction using aliphatic amines in decanol with or without diluents, e.g., propionic [13,14], acrylic [15,16], lactic [17,18] and pyruvic [19,20] acids. These studies tend to show that decanol is an active diluent that interacts with acid–amine complexes, increasing the yield when compared to inert diluents. In this paper, we aim at uncovering the extraction mechanisms involved in the case of 3-hydroxypropionic acid, a biobased

platform molecule of industrial interest [21], with tri-*n*-octylamine in *n*-decanol. To confirm the complex formation and elucidate its structure, an infrared spectroscopy study was carried out. We focus here on the modeling of equilibrium states as a mechanistic and predictive tool and propose two ways of taking complexation and solvent stabilizing interactions into account over a wide range of initial conditions.

## 2. Material and methods

### 2.1. Theory

#### 2.1.1. Physical extraction

When an aqueous phase of acid comes in contact with an organic phase, physical partitioning of the acid between the two phases occurs, i.e., the transfer from one phase to another due to solubility. When polar solvents such as alcohols and ketones are used, acid partitioning is reported to be independent of its concentration [1]:



#### 2.1.2. Reactive extraction

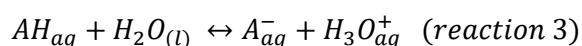
In an aqueous phase, acids and bases can react together through reversible reactions to give the corresponding solvated free conjugated bases and acids. In an organic phase, the weak polarity and dielectric constant can prevent the species from forming corresponding solvated free ions, and the acidic and basic molecules can remain bound together through acid-base interactions. These interactions can consist in H-bondings and/or ion pair formation according to the polarity of the solvent. In this model, we assume that the acid:amine complex is an ion pair with a 1:1 stoichiometry, as suggested by the infrared spectroscopy study presented below (reaction 2):



The validity of this assumption will be checked and further discussed in the Results, Section 3.1.

#### 2.1.3. Acid dissociation

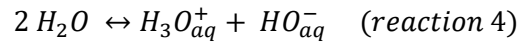
Acid dissociation in water is given by reaction 3:



The occurrence of such a reaction can reduce the amount of protonated acid in solution and has to be considered in the model since the amine extractant only reacts with the protonated form of the acid.

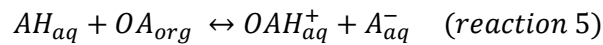
#### 2.1.4. Water autoprotolysis

Water autoprotolysis has to be considered for acid-base equilibria in the aqueous phase (reaction 4):



#### 2.1.5. Amine solubility in the aqueous phase

Our previous results [12] drew attention to the presence of impurities that reduced extraction yields for low acid concentrations. Tri-*n*-octylamine (TOA) impurities were identified as *n*-octylamine (OA) and di-*n*-octylamine. These organic impurities are extracted in the aqueous phase through reactive extraction with acidic species. Partition of long chain amines between the aqueous and the organic phases can be neglected but, in acidic environments, amines undergo protonation and become more soluble in water. This cannot be neglected for primary amines and is taken into account in reaction 5:



## 2.2. Modeling

### 2.2.1. Model 0: Complexation without explicit solvation effects

For the chemical system described above, three types of relationships can be used to find the equilibrium state:

#### 1. Ideal laws of mass action

Although mass action laws can be expressed with different types of concentrations, we chose to use molar concentrations, which are in fact recommended for liquid solutions [22] if volumes remain constant. We empirically observed that volumes were invariant in our experiments, contrary to the total mass or number of moles. Ideal laws of mass action corresponding to reactions (1)-(5) are given by equations 1-5:

$$m = \frac{[AH_{org}]}{[AH_{aq}]} \quad (1) \quad K_{11} = \frac{[(TOAH^+, A^-)_{org}]}{[TOA_{org}][AH_{aq}]} \quad (2) \quad K_A = \frac{[A_{aq}^-][H_3O_{aq}^+]}{[AH_{aq}]} \quad (3)$$

$$K_w = [H_3O_{aq}^+][HO_{aq}^-] \quad (4) \quad K_{aq} = \frac{[OAH_{aq}^+][A_{aq}^-]}{[AH_{aq}][OA_{org}]} \quad (5)$$

Equation (1) only holds for the decanol volume fraction of the organic phase.

#### 2. Material balances

Material balances between the initial and equilibrium states are written for amine, acid and impurities (equations 6 to 8):

$$\left\{ \begin{array}{l} [TOA]_{ini} = [TOA_{org}] + [(TOAH^+, A^-)_{org}] \quad (6) \\ [AH]_{ini} = [AH_{aq}] + [A_{aq}^-] + \frac{V_{org}}{V_{aq}} ([AH_{org}] + [(TOAH^+, A^-)_{org}]) \quad (7) \\ [OA_{org}]_{ini} = [OA_{org}] + \frac{V_{aq}}{V_{org}} [OAH_{aq}^+] \quad (8) \end{array} \right.$$

### 3. Electroneutrality principle

The electric charge balance is given for the ionic species involved in the considered system (equation 9):

$$[A_{aq}^-] + [HO_{aq}^-] = [OAH_{aq}^+] + [H_3O_{aq}^+] \quad (9)$$

All the concentrations were expressed as functions of  $[AH_{aq}]$ ,  $[TOA_{org}]$  and  $[OA_{org}]$  using equations (1) to (5) and (9), and the resulting nonlinear system with three equations and three unknowns was solved numerically. In particular, by combining equations (9) with (3)-(5), we obtain:

$$[A_{aq}^-] = \sqrt{\frac{[AH_{aq}](K_{aq}[OA_{org}] + K_A)}{1 + \frac{K_w}{K_A[AH_{aq}]}}} \quad (10)$$

Note that the variables are physically bounded so that there is only one set of solutions that can physically exist:

$$0 < [TOA_{org}] < [TOA]_{ini} \quad (11)$$

$$0 < [AH_{aq}] < [AH]_{ini} \quad (12)$$

$$0 < [OA_{org}] < [OA]_{ini} \quad (13)$$

Some of the reaction constants such as the acidity constant of 3-HP ( $K_A = 10^{-4.51}$ ), the ionic product of water ( $K_w = 10^{-14}$ ) and the partition coefficient of the acid between the aqueous and the organic phases ( $m = 0.02$ ) are known at the experimental temperature (25°C). Therefore, according to this model, there are only two equilibrium constants to be determined:  $K_{11}$  and  $K_{aq}$ .

Model yields and pH were calculated using the following equations:

$$Y_{mod0} \stackrel{\text{def}}{=} \frac{[AH_{org,TOT}]}{[AH]_{ini}} = \frac{V_{org}}{V_{aq}} \times \frac{\varphi m[AH_{aq}] + K_{11}[AH_{aq}][TOA_{org}]}{[AH]_{ini}} \quad (14)$$

$$pH_{mod} = pK_A + \log\left(\frac{[A_{aq}^-]}{[AH_{aq}]}\right) \quad (15)$$

where  $\varphi$  is the volume fraction of the solvent in the organic phase:

$$\varphi = \frac{V_{ROH}}{V_{org}} \quad (16)$$

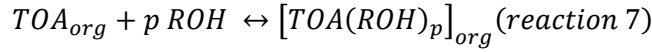
### 2.2.2. Model 1: The solvent as a synergistic extractant

In a previous publication [12], we showed the major role of the solvent on 3-HP extraction. We found that hydrogen-bonding ability for alcohols may be the leading mechanism of acid-amine complex stabilization in the organic phase, therefore determining the extraction yield. If complex-solvent interactions are strong enough, it is possible to consider including the solvent in the complex with a mass action law as a synergistic extractant. Alcohols are polar and protic, which gives them the considerable ability to solvate the complex resulting from the interactions between 3-HP and amines. Consequently, they have a huge importance in the extraction process. A simple way of including the solvent effect is to consider that it takes part in the reaction and to preserve the mathematical formalism of ideal solutions. To take the effects of the solvent on the extraction process into account in the case of strong interactions, Tamada *et al.* [9] suggested a stoichiometric reaction that includes the solvent in the complex formation as a synergistic extractant with amines:



This is equivalent to a synergistic reactive extraction by two extractants found in the literature for organic acids. For example, it was shown that tri-*n*-butylphosphate, a phosphorous bonded oxygen donor and a strongly solvating agent [1], was a good synergistic extractant with TOA for organic acids [23,24], as was di-2-ethylhexylphosphoric acid [25,26], a water insoluble phosphoric acid. These binary extractant systems allow stoichiometrically defined complexes consisting of three types of units: the organic acid, the amine and the synergistic extractant. The synergistic coefficient defined as the ratio between the distribution coefficient with the binary extractant and the sum of distribution coefficients of single extractants is sometimes provided to characterize the degree of synergy [20,27].

Given the H-bond acceptor character of the amine and the H-bond donor property of the alcohol solvent, we decided to introduce competition for solvation in the organic phase according to reaction 7. This enables a higher degree of freedom for the model and an easier comparison with Model 2:



These simple assumptions reflect the loss of activity of the solvent with the increase of amine concentration, resulting in low extraction yields when the amount of solvent in the organic phase is reduced. According to this model, the stoichiometric coefficients of the solvent and the equilibrium constants of reactions 6 and 7 are the four parameters that describe the role of the solvent in the extraction mechanisms.

The ideal laws of mass action used are (1)-(5) and the ones corresponding to reaction 6 (equation (17)) and 7 (equation (18)) are:

$$K_{11n} = \frac{[(TOAH^+, A^-)(ROH)_n]_{org}}{[AH_{aq}][TOA_{org}][ROH]^n} \quad (17)$$

$$K_{comp} = \frac{[TOA(ROH)_p]_{org}}{[TOA_{org}][ROH]^p} \quad (18)$$

Material balances used in this model are equations (8) and (19) to (21):

$$\left\{ \begin{array}{l} [ROH]_{ini} = [ROH] + n [(TOAH^+, A^-)(ROH)_n]_{org} + p [TOA(ROH)_p]_{org} \quad (19) \\ [TOA]_{ini} = [TOA_{org}] + [(TOAH^+, A^-)_{org}] + [(TOAH^+, A^-)(ROH)_n]_{org} + [TOA(ROH)_p]_{org} \quad (20) \\ [AH]_{ini} = [AH_{aq}] + [A^-_{aq}] + \frac{V_{org}}{V_{aq}} ([AH_{org}] + [(TOAH^+, A^-)_{org}] + [(TOAH^+, A^-)(ROH)_n]_{org}) \quad (21) \end{array} \right.$$

The electroneutrality principle is still given by equation (9).

All concentrations were expressed as functions of  $[AH_{aq}]$ ,  $[R_3N_{org}]$ ,  $[ROH]$  and  $[OA_{org}]$ , and the resulting nonlinear system with four equations and four unknowns was solved numerically.

The physical bounds of this system are given by equations (11) to (13) and (22):

$$0 < [ROH] < [ROH]_{ini} \quad (22)$$

According to this model, there are four equilibrium constants ( $K_{11}$ ,  $K_{11n}$ ,  $K_{aq}$ ,  $K_{comp}$ ) and two stoichiometric coefficients ( $n$  and  $p$ ) to be determined.

pH was calculated according to equation (15) and the extraction yield predicted by the model using equation (23):



$$Y_{mod1} \stackrel{\text{def}}{=} \frac{[AH_{org,TOT}]}{[AH]_{ini}} = \frac{V_{org}}{V_{aq}} \times \frac{\varphi m[AH_{aq}] + K_{11}[AH_{aq}][TOA_{org}] + K_{11n}[AH_{aq}][TOA_{org}][ROH]^n}{[AH]_{ini}} \quad (23)$$

### 2.2.3. Model 2: Composition-dependent equilibrium

It can be shown that the law of mass action for a chemical equilibrium ( $\sum_i \nu_i c_i = 0$ ) of a non-ideal liquid system can be expressed in the following form [22]:

$$\sum_i \ln(C_i^{\nu_i}) = \ln(K_{11}^{id}) + \Gamma \quad (24)$$

where  $\Gamma$  is a function representing non-idealities (volume effects, molecule properties and interactions, etc.) and depending on the composition of the system at constant temperature and pressure.

In the usual representation of non-ideal behavior with molar activity coefficients,  $\Gamma$  would represent the ratio of reactant activity coefficients and product activity coefficients. They only depend on the system composition at constant temperature and pressure.

$$\Gamma = - \sum_i \ln(\gamma_i^{\nu_i}) \quad (25)$$

In the aqueous phase, the main solute is the non-dissociated form of the acid that represents less than 1% mol/mol in the entire tested range. In such dilute conditions, the variation of acid concentration should not significantly impact the properties of the mixture and its impact can be averaged using a constant term, assuming a constant value of the activity coefficient. In the studied range, it was shown that the variation of the activity coefficient was less than 5% for the non-dissociated form of acetic acid in water, for example [28]. This contribution was thus assumed to be constant and was averaged in the equilibrium constant. In the case of diluted ions, activity coefficients can be estimated using the Davies equation [29]:

$$\log(\gamma_i) = -0.5z_i^2 \left( \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0.30I \right) \quad (26)$$

where  $I$  is the ionic strength, which is equal to the concentration of the  $H^+$  ion when the acid dissociation reaction is the only source of ions in solution. Given the equilibrium pH of our experiments, the Davies equation gave activity coefficients of ions in solution of between 0.99 and 0.95, varying in the same direction as the non-dissociated acid. Its impact on dissociation equilibrium calculations was therefore not taken into account. We thus assumed that all the activity coefficients in the aqueous phase were constants included in equilibrium constants, so that ideal laws of mass action were used

for aqueous reactions (3) and (4). These simplifications were also made for reaction 1 since the linearity between  $[AH_{aq}]$  and  $[AH_{org}]$  had been previously checked over our entire concentration range [12]. They also apply to reaction 5, which is expected to have a small impact on the results when purified reactants are used.

In the organic phase, the acid-amine complex is also rather diluted ( $< 5\%$  mol/mol) in our case, so it could be considered, at first glance, that the physicochemical properties of the medium are mainly based on solvent, TOA and soluble water, the latter accounting for up to 28% of the total number of moles [12]. However, such a ternary system has only one degree of freedom related to its composition because the initial amount of solvent determines the amount of TOA for a given ratio, which in turn determines water content through its solubility. We can thus assume that non-idealities depend only on one variable, the initial solvent mole fraction (or, equivalently, the TOA mole fraction), and are expressed by the function:

$$\Gamma = \Gamma(x_{ROH}^{ini}) \quad (27)$$

For convenience, this dependence was included in the equilibrium coefficient:

$$K_{11}(x_{ROH}^{ini}) = K_{11}^{id} \times e^{\Gamma(x_{ROH}^{ini})} = \frac{[(TOAH^+, A^-)_{aq}]}{[AH_{aq}][TOA_{org}]} \quad (28)$$

According to the Stone-Weierstrass theorem, this dependence can be approximated by a polynomial function of  $x_{ROH}$  between  $x_{ROH}=0$  and  $x_{ROH}=1$ :

$$\ln(K_{11}) = \sum_{k=0}^m a_k \cdot (x_{ROH}^{ini})^k \quad (29)$$

$K_{11}(x_{ROH}^{ini})$  is an apparent equilibrium coefficient, which is truly constant only for a given initial molar fraction of solvent in the organic phase. This is why it is called an equilibrium coefficient and not an equilibrium constant.

This model considers the decanol/TOA mixture as a more or less favorable medium for the complexation reaction rather than viewing the solvent as a reactant of the complexation. The quantity of solvent is then unchanged over the course of the reaction. Non-idealities are taken into account in the variation of the apparent equilibrium coefficient  $K_{11}$ , the material balances are given by equations (6)-(8), and the electroneutrality principle by equation (9). All the concentrations were expressed as functions of  $[AH_{aq}]$ ,  $[TOA_{org}]$  and  $[OA_{org}]$ , and the resulting nonlinear system with three equations and three unknowns was solved numerically. The physical bounds of this system are (11)-(13). The

parameters to be determined for this model are  $K_{aq}$  and the polynomial coefficients ( $a_k$ ) of  $K_{11}(x_{ROH}^{ini})$  in equation (27). The polynomial order was iteratively increased until the 95% confidence interval around the leading coefficient includes 0, meaning that this coefficient was not significantly different from 0.

pH was calculated according to (15) and model yields were calculated using equation (14) with  $K_{11}$  given by equation (29).

### 2.3. Experiments

#### *2.3.1. Spectroscopic study*

Fourier Transformed Infrared (FT-IR) analyses were performed using a Cary 630 Fourier Transform InfraRed spectrometer from Agilent Technologies (California, USA). A typical organic phase made of 20% v/v TOA in decanol was considered as the reference. Similar organic phases were loaded with four different concentrations of 3-HP through a liquid-liquid extraction up to equilibrium and then centrifuged at (15557 g, 1 h). The total concentration of 3-HP in the organic phase, as determined by back-extraction with NaOH solutions, ranged between 1 and 50 g/L. For the sake of band identification and to understand the mechanisms, other spectra were acquired, in particular for water, a commercial aqueous solution of 3-HP and organic phases after hydrochloric acid and 3-HP extraction.

#### *2.3.2. Reactive extractions*

Reactive liquid-liquid extractions of 3-hydroxypropionic acid in organic phases consisting of mixtures of purified tri-*n*-octylamine and *n*-decanol were performed. The initial concentration of 3-HP ranged between 0.25 and 50 g/L in order to represent depleted bioconversion broth conditions. All experimental and analytical conditions were previously detailed [12]. Previously published experimental data [12] were used as a calibration set for the models. Another set of independent extractions at 25°C was performed in order to validate the predictive nature of the models in the concentration range tested. Initial conditions of both sets of experiments are given in Table II-1.

Validation points were chosen in order to cover a large range of the experimental concentrations except the zone of low acid and high amine concentration, which is of little practical interest.

Table II-1: Experimental calibration and validation sets

Calibration set (25°C)				Validation set (25°C)	
Initial 3-HP concentration (g/L)	Initial TOA concentration (%v/v)	Initial 3-HP concentration (g/L)	Initial TOA concentration (%v/v)	Initial 3-HP concentration (g/L)	Initial TOA concentration (%v/v)
1	0	0.25	20	0.5	10
1	10	0.5	20	2	30
1	20	0.75	20	3.5	25
1	30	2	20	5	15
1	40	5	20	5	50
1	50	7	20	15	40
1	60	10	20	20	10
1	70	20	20	30	40
1	80	30	20	40	80
1	90	40	20		
1	100	50	20		

### 2.3.3. Determination of model parameters

As detailed above in the Theory section, the following model parameters had to be determined based on experimental data in order to predict the final composition of the system and, consequently, the extraction yield:  $K_{11}$ ,  $K_{11n}$ ,  $K_{comp}$ ,  $K_{aq}$ ,  $n$  and  $p$  for Model 1 and  $K_{11}(x_{ROH}^{ini})$ , i.e., polynomial coefficients  $a_k$  and  $K_{aq}$ , for Model 2. All calculations were performed with Matlab® 2015b numeric computation software (MathWorks, Natick, MA, USA) equipped with the Optimization and Statistics Toolboxes. The specified parameters were initialized to 1 and their values were iteratively refined, aiming at the best possible fit (in a least-squares sense) between the predicted and the measured extraction yields and equilibrium pH, for the experiments in the calibration dataset. Model calibration based on two different types of experimental measurements simultaneously aims at reproducing real physical mechanisms at best. The acidic pH values for the fitting procedure have been multiplied by 1/7 in order to have numeric values between 0 and 1, in the same order of magnitude as the yield values. Yield and pH thus had a similar weight in the model calibration process, resulting in a better fit. Iterative parameter estimation was performed using the *nlinfit* function in Matlab, implementing the Levenberg-Marquardt optimization algorithm. For Model 1, in each iteration of the algorithm and for each initial experimental condition, the system of equations (8) and (19-21) with bounds (11-13) and (21) was solved for the equilibrium concentrations  $[ROH]$ ,  $[TOA_{org}]$ ,  $[AH_{aq}]$  and  $[OA_{org}]$  using the *lsqnonlin* function of Matlab. For Model 2, in each iteration of the algorithm and for each initial experimental condition, the system of equations (6-8) with bounds (11-13) was solved for the equilibrium variables  $[TOA_{org}]$ ,  $[AH_{aq}]$  and  $[OA_{org}]$  using the *lsqnonlin* function of Matlab.

The Standard Error of the Regression for a variable X for both models was used to evaluate their accuracy, with X being either yield or pH:

$$SER = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_1} (X_{mod,i} - X_i)^2}{N_1 - P}} \quad (30)$$

where  $N_1$  is the number of experimental values in the calibration dataset and P the number of fitted parameters.

For the validation dataset, the root mean squared deviation of a variable X was used to compare model predictions to measured values:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_2} (X_{mod,i} - X_i)^2}{N_2}} \quad (31)$$

where  $N_2$  is the total number of experimental values in the validation dataset.

The absolute error between model and experimental values was also calculated as follows:

$$|\Delta X_i| = |X_{mod,i} - X_i| \quad (32)$$

And the mean absolute error:

$$\overline{|\Delta X|} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\Delta X_i| \quad (33)$$

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Nature of the acid:amine complex

##### *3.1.1. Spectroscopic study*

The infrared spectroscopy study was performed to explore the complex formation and to elucidate its structure. IR spectra are presented in Figs. II-1 (A to D) and 3 for different solutions, with identification of representative bands. Spectra of pure compounds can be found in the Appendix.

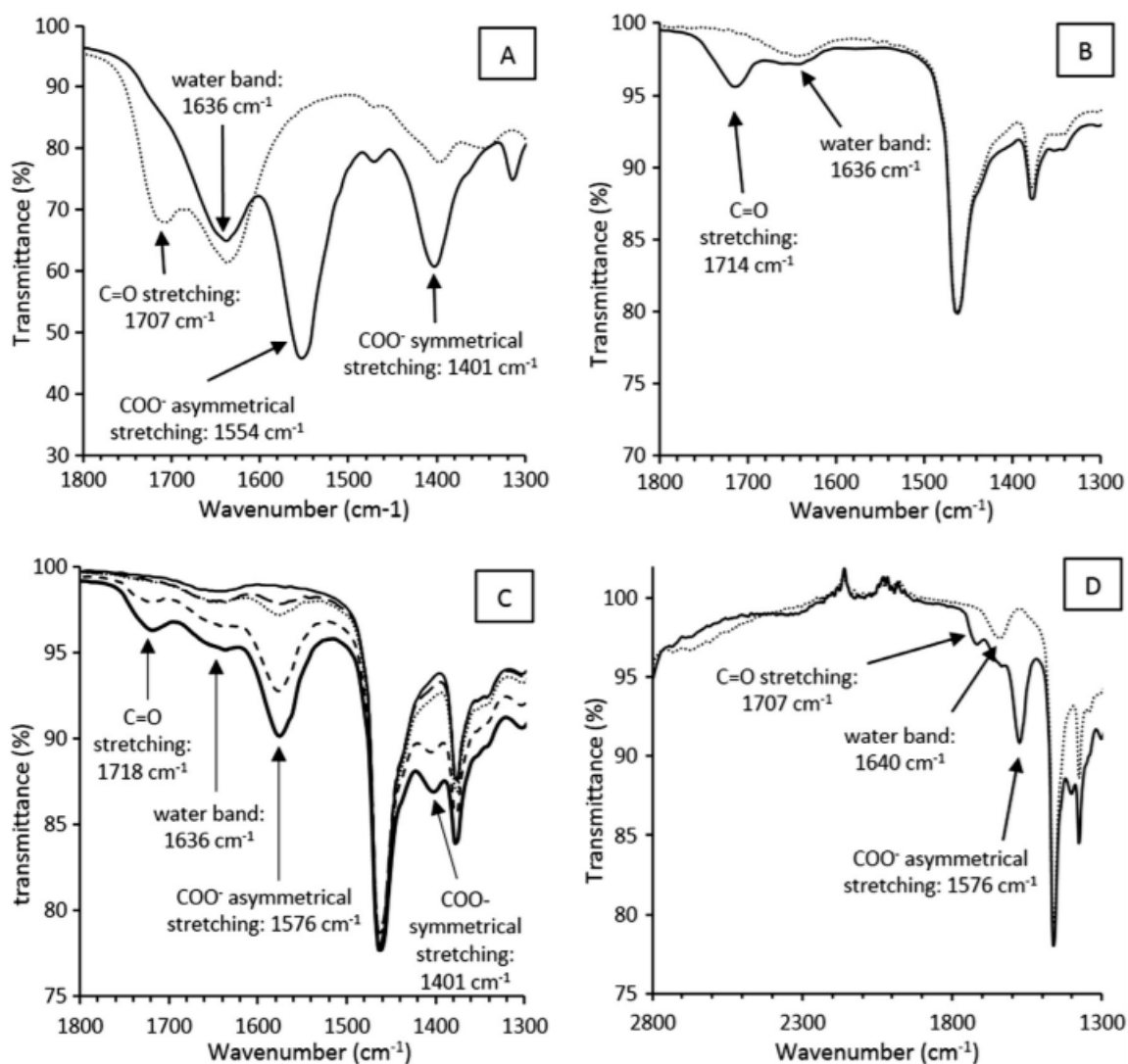


Figure II-1: Infrared spectra:

- A: aqueous phase of the commercial 3-HP solution (dotted line) and the same one neutralized with NaOH (bold line);
- B: organic phases after physical extraction, i.e., using only decanol, of commercial 3-HP solution (bold line) and after contact with water alone (dotted line);
- C: organic phases (20% v/v TOA in decanol) after reactive extractions of 3-HP (from upper spectrum: 0.8 g/L, 4.5 g/L, 7.7 g/L, 33 g/L and 53 g/L of 3-HP in the organic phase);
- D: organic phases (20% v/v TOA in decanol) after reactive extraction of 1.2 mol/L of aqueous hydrochloric acid (dotted line) and 3-HP (53 g/L in the organic phase).

It was observed that the main significant differences between spectra were situated in the 1300–1800 cm<sup>-1</sup> region with six main bands (Fig. II-1C), without solvent bands hindering variations between samples. That is why only this region is presented in most of the spectra. The band at 1636 cm<sup>-1</sup> can be attributed to water (see the water spectrum in the Appendix) extracted in the organic phase. Bands at

1463 and 1377  $\text{cm}^{-1}$  are mainly due to the hydrocarbon skeletons of the organic species, as can be seen in decanol and TOA spectra in the Appendix, whereas the three other bands at 1401, 1575, and 1718  $\text{cm}^{-1}$  should be characteristic of chemical changes due to acid extraction.

According to the spectrum of the commercial solution in Fig. II-1A, we can observe a band at 1707  $\text{cm}^{-1}$  that is absent in water and in neutralized solution spectra. This band is attributed to the C=O stretching of the hydrogen-bonded carbonyl function of the carboxyl group (COOH) [30,31]. In the neutralized solution spectra, two bands appear at 1403 and 1553  $\text{cm}^{-1}$ , which are attributed to symmetric and asymmetric stretching of the delocalized carboxylate group ( $\text{COO}^-$ ), respectively [30,31]. These values are similar to other acids in aqueous phases [31]. Therefore, in Fig. II-1C, the bands at 1401 and 1575  $\text{cm}^{-1}$  can be attributed to the carboxylate group and the band at 1718  $\text{cm}^{-1}$  to the hydrogen-bonded carbonyl function of the carboxyl group. These values also correspond to other acids in organic phases containing amines [32].

The spectrum of the organic phase after extraction without amine (so-called physical extraction) (Fig. II-1B) has a single characteristic band at 1714  $\text{cm}^{-1}$ . It can be attributed to C=O stretching of the carboxyl group that is hydrogen-bonded [30,31] to decanol and/or other carboxyl groups (intermolecular) and/or to the alcohol function of 3-HP (intramolecular) and/or to water. It clearly shows that the behavior is totally different from the extraction with amines and that 3-HP only exists in its non-dissociated form.

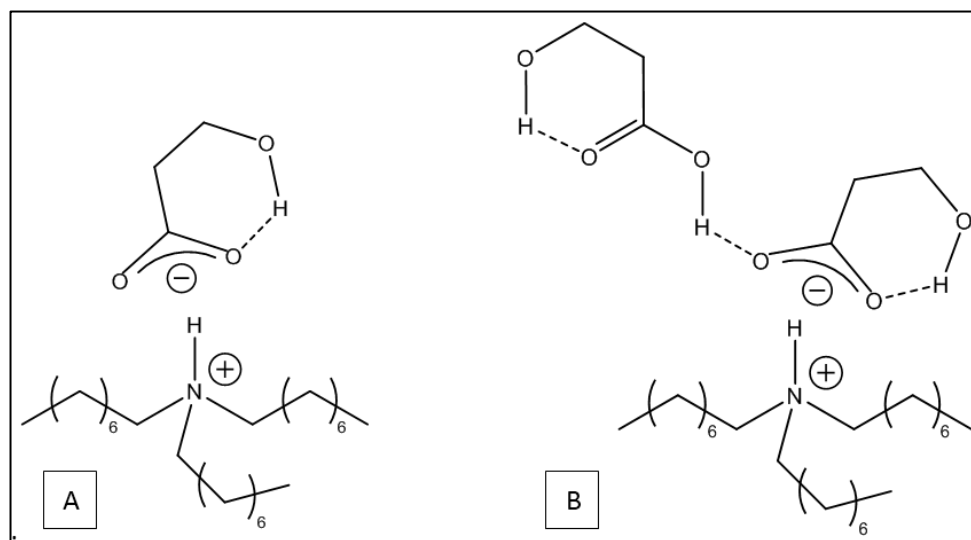


Figure II-2: Proposed structures for the (1:1) (A) and (2:1) (B) acid-amine complexes.

In reactive extraction, the main band due to a carboxylate group (1575  $\text{cm}^{-1}$ ) demonstrates strong interactions between the amine and the acidic proton of the carboxyl group. It can denote the dissociation of 3-HP in the organic phase, especially in an active proton-donating solvent like decanol and, hence, the formation of an ion pair as proposed in Fig. II-2A, even though the expected very weak

N-H ammonium band is not obvious around  $2500\text{ cm}^{-1}$ . This absence is most probably due to the solvent (decanol + water) since even substantial hydrochloric acid extraction does not allow N-H band formation (Fig. II-1D) and characteristic solvent bands hinder the observation of the specific bands of interest.

In order to further study the supposed N-H bond, attempts were made to obtain the reaction products of acid:amine complexation in a concentrated form and to exclude the influence of the solvent. A comparison with a strong acid, hydrochloric acid, is also provided in order to have a better interpretation of spectra. The idea of the experiment is to force the separation of the organic phase into polar and apolar water insoluble phases. The polar phase appears after extraction between the aqueous and the top organic phase and is called the third phase, while the apolar phase remains at the top of the tube and includes the original organic phase compounds. The third phase is meant to consist mainly in acid:amine complexes, acid and water. When hydrochloric acid was used, a high initial concentration of  $1.2\text{ mol/L}$  in the aqueous phase was brought into contact with an organic phase made of  $20\% \text{ v/v}$  TOA in *n*-decane. To observe the third phase formation in the case of 3-HP, it was necessary to directly use the commercial solution with pure TOA since *n*-decane totally prevented 3-HP extraction. The result was the formation of an extremely viscous third phase. Both third phases were recovered and their IR spectra are presented in Fig. II-3.

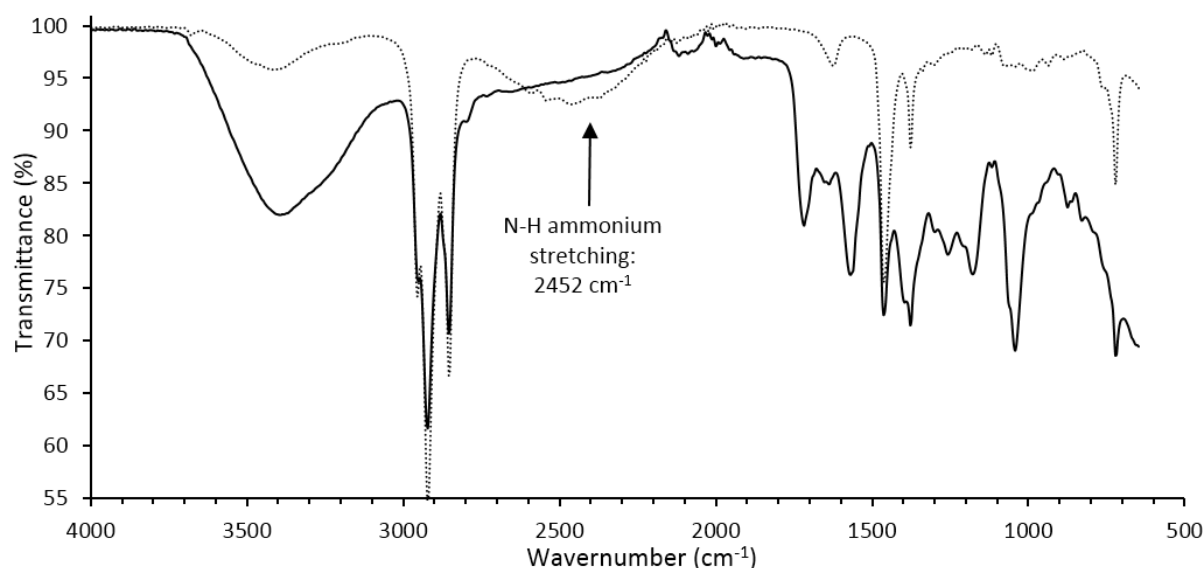


Figure II-3: Infrared spectra of third phases formed after extraction of  $1.2\text{ mol/L}$  of aqueous hydrochloric acid with  $20\% \text{ v/v}$  TOA in decane (dotted line) and commercial 3-HP solution with pure TOA (bold line)

With hydrochloric acid, a broad N-H band can be observed at  $2500\text{ cm}^{-1}$  while the C-N band at  $1095\text{ cm}^{-1}$  and the Bohlmann band at  $2795\text{ cm}^{-1}$  have disappeared (see TOA spectrum in the Appendix)



indicating that the nitrogen lone pair is involved in a complex [33,34]. Contrary to hydrochloric acid and despite the observation of the carboxylate bands, the spectrum of the 3-HP third phase revealed no clear sign of the N-H ammonium bond but, instead, a broad absorption covering the entire wavenumber range up to  $3300\text{ cm}^{-1}$ . This might be a sign of an unlocalized N-H ammonium bond made impossible in the case of the strong acid [35] or simply a strong water/acid absorption. However, this situation is not very representative of the protic and quite polar decanol, which is a quite favorable medium for ionization. Results are not easily comparable as shown by the fact that ammonium bands are absent in decanol for both acids.

In decanol, when the concentration of 3-HP is close to or exceeds the one of amine, another band appears at  $1718\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to the carbonyl bond of the carboxyl group, like in Fig. II-1B. Following are some reasons why this bond may be able to exist at such high concentrations of 3-HP:

- (i) free acid is not negligible in solution as in the case of physical extraction (see Fig. II-1B);
- (ii) an equilibrium exists between ion-pairing and H-bonding for acid:amine interactions shifted toward the ion pair;
- (iii) more than one acid molecules is involved in complexes, supplementary molecules being H-bonded to the first one, which is itself bonded to the ammonium part of the complex, as illustrated in Fig. II-2B.

The third suggestion is the only one able to explain the overloading observed when comparing 3-HP ( $53\text{ g/L} = 0.59\text{ mol/L}$ ) and amine ( $20\% \text{ v/v} = 0.46\text{ mol/L}$ ) concentrations at the highest tested value of acid concentration. This suggests the possibility to form (2:1) acid:amine complexes (Fig. II-2B) for the highest concentrations tested in the calibration set. However, (2:1) acid:amine complexes should only concern a few concentrations in our experimental set and in weak proportions when compared to the (1:1) complex, so we will only consider the ion pair formation like in Fig. II-2A.

### *3.1.2. Validation of stoichiometry with model 0*

The stoichiometry of the acid-amine complex was first checked. For that, a simple model that only takes acid-amine complexes without solvation (Model 0) into account was tested for given excess amounts of TOA ( $0.46\text{ mol/L} = 20\% \text{ v/v}$ ) and solvent, compared to the 3-HP initial concentration ( $0.011\text{ mol/L} = 1\text{ g/L}$ ). The results are presented in Fig. II-4.

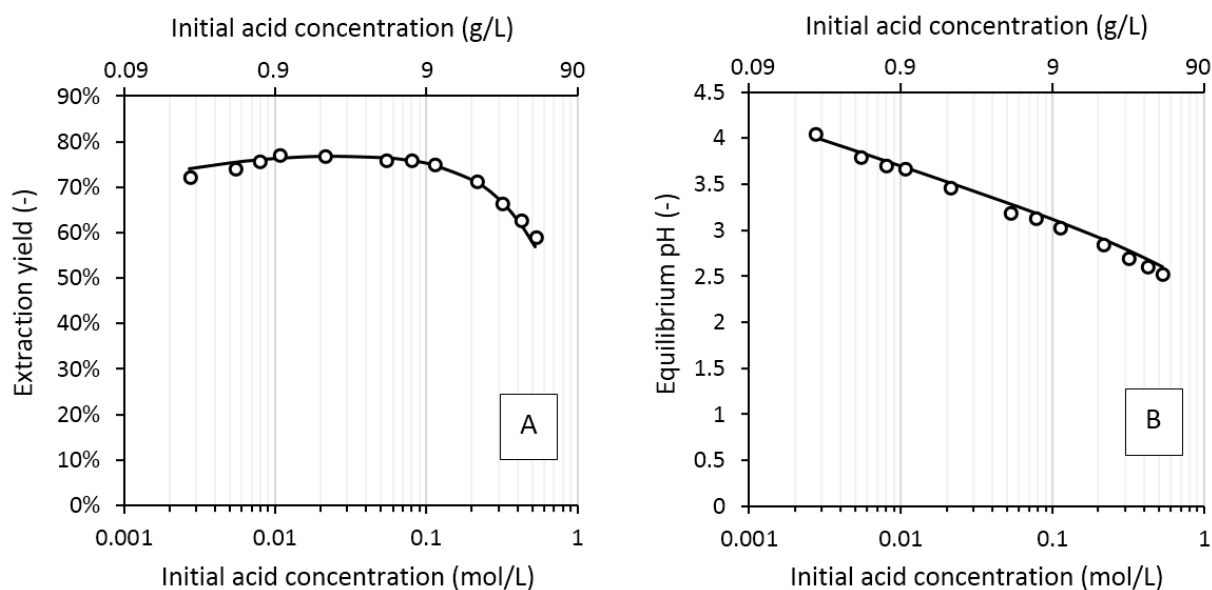


Figure II-4 : Experimental extraction yields (A) and pH at equilibrium (B) as a function of initial acid concentration (symbols). Calculation with Model 0 assuming a (1 :1) stoichiometry for the acide:amine complex (solid lines):  $K_{11} = 8.17 \pm 0.14 \text{ L. mol}^{-1}$  and  $K_{aq} = 0.131 \pm 0.061$ .

It appears that the (1:1) stoichiometry reasonably fits the data. This result aligns with the literature because the amine was in excess and the solvent is polar and protic, allowing intermolecular H-bonding between the solvent and the complex, thus inhibiting acid oligomerization. This latter phenomenon is called overloading. Tamada and King [15] observed a lesser overloading of amines, i.e., (n:1) stoichiometry with  $n > 1$  when lactic acid was used compared to acetic acid. These authors speculated that this effect was due to the proximity between the hydroxyl group of lactic acid and the carboxylate group, allowing strained but possible intramolecular H-bonding [30]. Indeed, theoretical calculations and experimental results proved the 5-member ring H-bondings as the most stable conformers for isolated lactic acid [36]. The 3-HP structure also shows strong interactions between its hydroxyl and carbonyl groups. The most stable conformations involve electrostatic interactions and H bonding between the H of the hydroxyl group and the carbonyl oxygen of the carboxyl group [37]. It results in the formation of less strained six-member rings (Fig. II-2) and, consequently, is even more favorable than their 5-member counterparts in lactic acid. This conformation could be a part of the explanation for the observed (1:1) stoichiometry.

We have therefore shown that Model 0 was able to provide accurate results for a given composition of the organic phase. Given the highly protic character of the solvent used, the possible intramolecular H-bonding involving the carboxyl part of the complex, the dilution of 3-HP and the excess of amines in the organic phase, we assume the (1:1) acid-amine stoichiometry to be the main complexation mechanism over the whole range tested. However, extrapolating the complexation equilibrium

constant found to the calculation of equilibrium with other organic phase compositions (i.e., increasing the amine content and decreasing the solvent concentration) provided inaccurate predictions, as it can be seen in Fig. II-5. This motivated the development of more complete models able to take the solvating power of the organic phase into account.

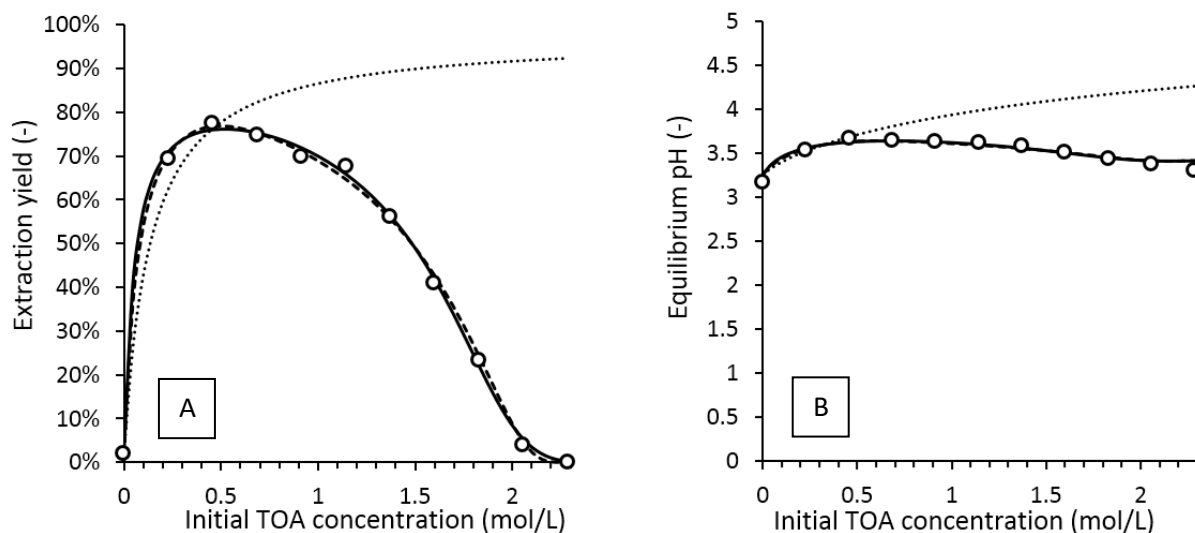


Figure II-5: Experimental yields (A) and pH (B) as a function of initial TOA concentration (symbols) with the calculations of Model 0 (dotted lines), Model 1 (dashed lines) and Model 2 (solid lines).

### 3.2. Calibration of Model 1

Table II-2: Parameters determined for Model 1

	Parameter values	Standard error
$K_{11}(L \cdot mol^{-1})$	0	-
$K_{11n}(L^{n+1} \cdot mol^{-(n+1)})$	0.88	$\pm 0.30$
$n (-)$	4.63	$\pm 0.63$
$K_{aq} (-)$	0.037	$\pm 0.015$
$K_{comp}(L^{p+1} \cdot mol^{-(p+1)})$	0.162	$\pm 0.063$
$p$	4.04	$\pm 0.77$
$R^2$	0.996	

Parameters fitted by the numerical procedure and the coefficient of determination of the regression are given in Table II-2. Parameter  $K_{11}$  was found to be not different from zero at a 0.05 significance level. It was therefore set to exactly 0 and the values of the other parameters recalculated accordingly. Figure II-5 shows the results of Model 1 for the calibration data focusing on the influence of TOA concentration in the organic phase. Model 1 is able to reproduce experimental yield and pH quite accurately. Hence, a complex structure including the solvent is able to describe extraction yield decrease for high amine concentrations. The stoichiometry of decanol in the complex ( $n$ ) is found to be around 5. This solvation number allows the model to reproduce the bell-shaped profiles of the

extraction yields. This type of model was used by Tamada and King [30] for succinic acid and Alamine 336 in chloroform. They found a stoichiometry of 2 for chloroform when used alone as a diluent and 3 when mixed with heptane, an inert diluent. The same was found when dichloromethane was used as the active diluent in a mixture with heptane. For malonic acid with Alamine 336 in MIBK, the solvent stoichiometry was found to be 2. For synergistic extractants, solvation numbers of 1 and 2 for TBP and 1 or 2 for D2EHPA were found. Numerical values of extraction constants in this case are difficult to compare with the literature because they are not provided in the same units and the solvents used do not have the same molar volume, implying a great variability in molar concentrations. In a previous paper [12], we showed that each molecule of extracted 3-HP adds two molecules of water in the organic phase. Accordingly, a representation of the result of Model 1 would be the following complex:  $[(TOAH^+, A^-)(ROH)_5(H_2O)_2]_{org}$ . This is useful to predict the amount of water in the organic phase at equilibrium. However, such a high stoichiometric coefficient for decanol suggests a general solvation phenomenon described by non-stoichiometric interactions. This is the scope of Model 2.

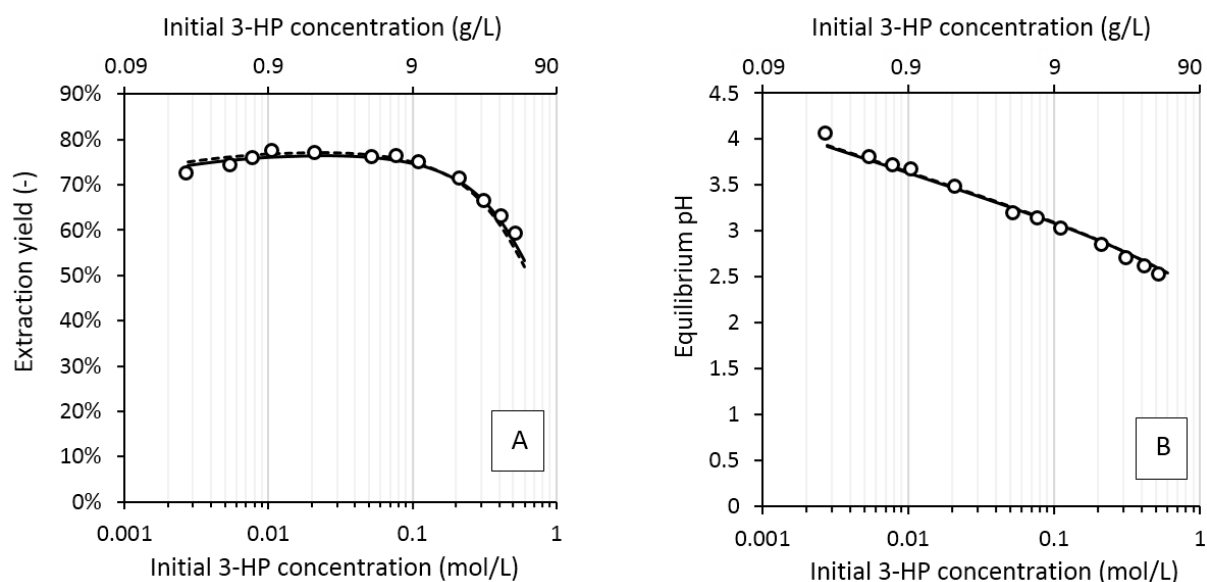


Figure II-6: Experimental yields (A) and pH (B) as a function of initial acid concentration (symbols) with simulations of Model 1 (dashed lines) and Model 2 (solid lines).

Figure II-6 focuses on the influence of the initial acid concentration on the extraction yield and pH. Model values are in good agreement with measurements. The pH is correctly predicted by Model 1 in the entire range tested. The main parameter influencing the pH is  $K_{aq}$ , the transfer of impurities in the aqueous phase (reaction 5). We demonstrated in a previous paper [12] that this transfer was very weak in the case of purified TOA, with practically no effects. This is why a high uncertainty existed for the determined value of  $K_{aq}$  (Table II-2), suggesting that this parameter and reaction 5 could be removed from the model when using purified TOA.

### 3.3. Calibration of Model 2

Table II-3: Parameter values determined for Model 2.

	Parameters value	Standard error
$a_0$ ( $L \cdot mol^{-1}$ )	-6.84	$\pm 0.60$
$a_1$ ( $L \cdot mol^{-1}$ )	19.7	$\pm 3.1$
$a_2$ ( $L \cdot mol^{-1}$ )	-19.4	$\pm 5.0$
$a_3$ ( $L \cdot mol^{-1}$ )	9.5	$\pm 2.6$
$K_{aq}$	0.036	$\pm 0.012$
$R^2$	0.997	

The parameters determined for Model 2 and the corresponding coefficient of determination of the regression are given in Table II-3. The polynomial order was found to be 3. The relationship giving the value of the apparent equilibrium coefficient as a function of the solvent fraction (Equation 27) becomes:

$$\ln(K_{11}) \approx -6.84 + 19.7x_{ROH}^{ini} - 19.4(x_{ROH}^{ini})^2 + 9.5(x_{ROH}^{ini})^3 \quad (34)$$

It can be seen in Figs. II-5 and II-6 that Model 2 well fits the calibration data for the yields and pH.

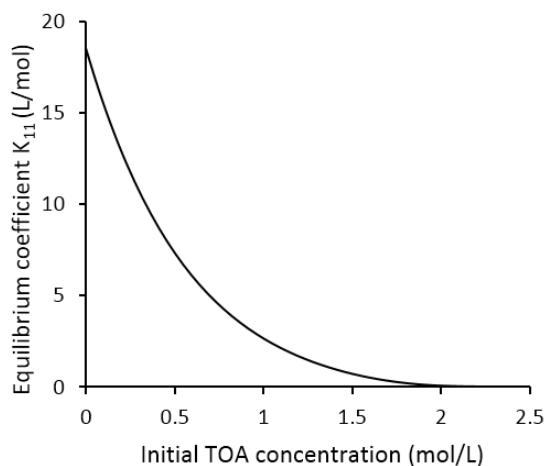


Figure II-7: Apparent equilibrium coefficient of complexation as a function of the initial concentration of amine.

Figure II-7 shows the variation of the apparent equilibrium coefficient with the initial amount of TOA in the organic phase. It appears that when the concentration of amine in the organic phase increases, this complexation coefficient decreases. In terms of activity coefficients, the equilibrium coefficient should be proportional to the TOA activity coefficient and inversely proportional to the complex activity coefficient. We know that the complex is insoluble in TOA, as shown by the formation of a third phase when using only TOA as an extractant phase. This proves that the complex is highly unstable in

TOA, meaning that it should have a higher activity coefficient when the organic phase becomes enriched in TOA to the detriment of decanol, with better physicochemical properties. This is consistent with the fact that when the TOA concentration is too high, the solvation of the complex by decanol and water is less efficient. Since the TOA is essentially apolar and strictly H-bond acceptor, it has no ability to stabilize the complex in the organic phase since the stabilization was shown to be due to the H-bond donor character of the solvent [12]. TOA is a hydrophobic species, insoluble in water, ethanol or acetone, for example, and should therefore be less stable in hydrophilic environments and more reactive, with a higher activity coefficient. Accordingly, this coefficient should decrease with the increase in the TOA content in alcohols. Indeed, we know from primary calculations (UNIFAC, not shown here) that its activity coefficient should decrease when increasing the amount of TOA from 10 to 20% v/v in a mixture containing decanol. All this explains the decrease of the equilibrium coefficient  $K_{11}$  with the amount of TOA.

The values of the equilibrium coefficient  $K_{11}$  determined in this study can be compared to similar extractions of other oxygenated C3 carboxylic acids. For example, Wasewar *et al.* [18] reported the complexation constant  $K_{11} = 45 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  for lactic acid extraction in decanol by Alamine 336 in the range of 20-40% v/v (0.46–0.92 mol/L), and Pal *et al.* [19] reported the complexation constant  $K_{11} = 133 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  for pyruvic acid extraction in decanol by TOA in the range of 5-15% v/v (0.09–0.28 mol/L). These higher values can be explained by the higher hydrophobicity and stronger acidity of these two acids when compared to 3-HP.

Equilibrium pH is also perfectly described by Model 2. The value of  $K_{aq}$  is the same as in Model 1, which is consistent with the fact that it is not meant to depend on the solvation model choice.

#### 3.4. Validation and comparison of Models 1 and 2

Validation experiments involved initial concentrations other than those used for the calibration of the models. For predictions, model parameters were unchanged, as given in Tables II-2 and II-3. Figure II-8 provides a visual comparison of model accuracy, while Table II-4 gives the corresponding statistics.

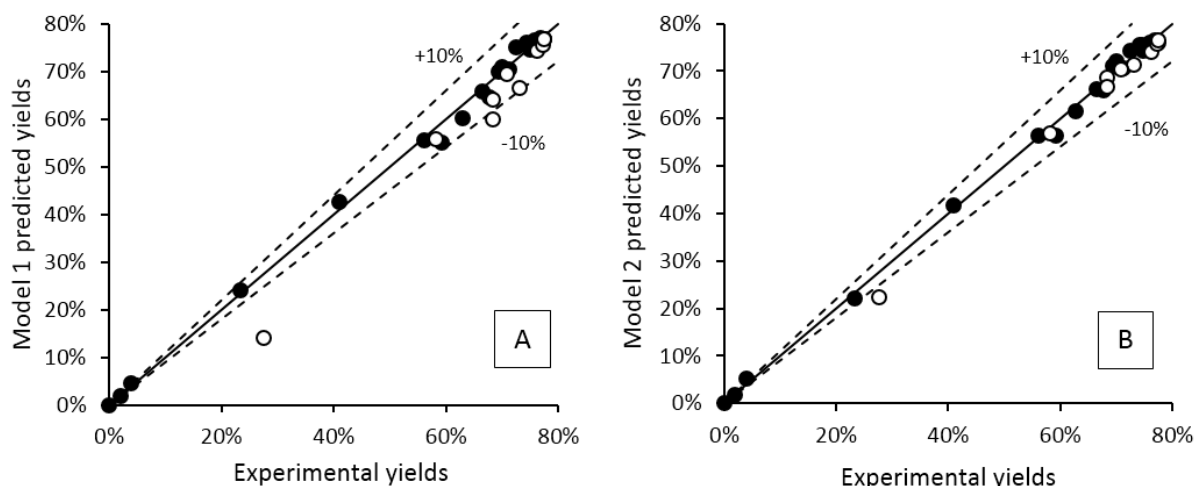


Figure II-8: Model 1 (A) and Model 2 (B) predicted yields as a function of experimental yields for the calibration (filled circles) and the validation (open circles) experiments.

Table II-4: Comparison of model accuracy, in percent of extraction yield

	SER	$\overline{ \Delta Y }$	$\max( \Delta Y )$		RMSD	$\overline{ \Delta Y }$	$\max( \Delta Y )$
Model 1 calibration set	1.7	1.1	4.2	Model 1 validation set	6.0	4.5	13.5
Model 2 calibration set	1.4	1.0	2.6	Model 2 validation set	2.2	1.7	5.3

It can be seen that both models provide good predictions with most of the points being within the 10% relative error. Calibrations of both models give very similar statistics. However, according to Table II-4, Model 2 predictions appear to be two or three times more accurate than those of Model 1. The reason is to be found in the very structure of the models and this is emphasized when plotting the yield prediction surfaces of both models as a function of initial TOA and 3-HP concentrations (Fig. II-9). It can be observed that surfaces present an optimal yield of 77%, around 0.5 mol/L TOA (22% v/v) and 0.024 mol/L 3-HP (2 g/L).

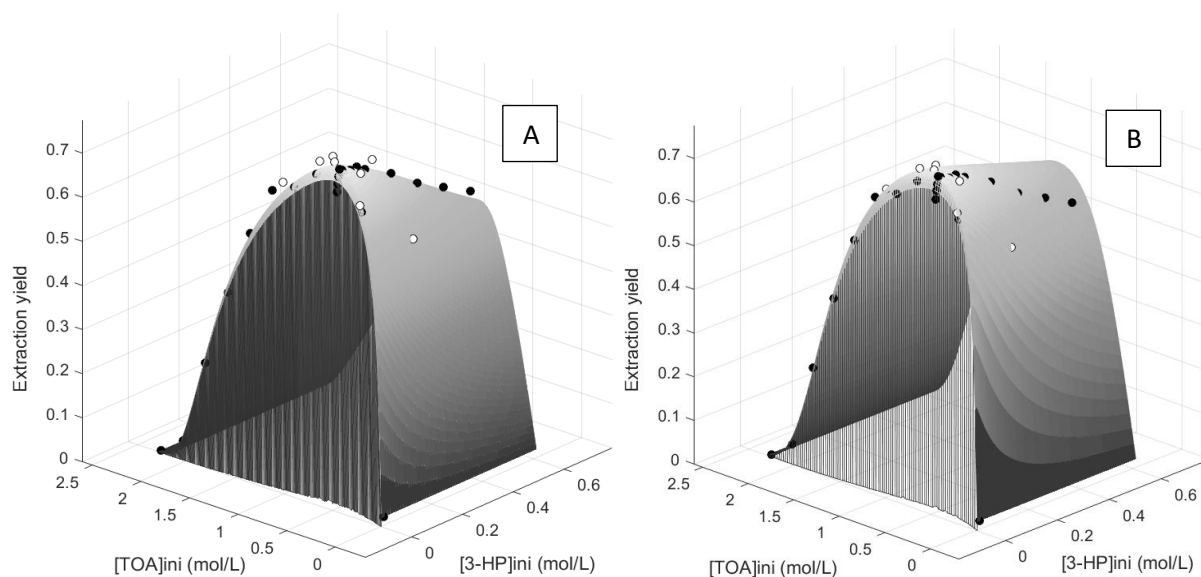


Figure II-9: Extrapolation of Model 1 (A) and Model 2 (B) predictions in the whole range of acid and amine concentrations tested, with superimposed experimental measurements: calibration (filled circles) and validation (open circles).

It appears from Fig. II-9 that the major discrepancy between both models is the faster decrease of the yield with the increase of initial acid concentration in Model 1 (left) than in Model 2 (right). This is due to the high consumption of decanol in the complex formation: nearly five molecules of decanol in one molecule of complex, implying that decanol is rapidly depleted, preventing the formation of even more complexes. This problem could certainly be avoided by adding more types of complexes corresponding to different degrees of solvation, but that would mean more parameters to fit a stoichiometric model with the possibility of non-stoichiometric phenomena. Moreover, this model totally ignores the importance of water in the acid extraction. In contrast, Model 2 with the same number of adjusted parameters representing global changes in the phase's properties provides better predictions and can therefore be seen as a better tool to describe reactive extraction.

Tamada [9,30] warned that the stoichiometric model could only be used for strong interactions between the solvent and the acid-amine core. Indeed, solvation is a complex phenomenon resulting in non-stoichiometric organizations of matter in solutions [1], leading to non-ideal thermodynamic behavior. These assemblages may be the leading mechanism of the solvent effect [9]. Solvents like phosphoryl species are known to show stoichiometric behavior as extractants for complexation [1] and synergistic effects with amines [24], but they are capable of much stronger interactions than C-O solvents [38]. The higher polarity of the P-O bond ( $\Delta\chi_{P-O} = 1.25 > \Delta\chi_{C-O} = 0.89$ ) and quantum considerations make the P-O bond an extremely polarized group in phosphine oxides, for example [39,40]. This explains the stronger Lewis base character of P-O extractants like TBP compared to C-O



extractants, and the possibility to use defined stoichiometric coefficients over a large range of concentrations.

To sum up, the global decrease of the extraction yield with the increase of TOA concentration may be due to the reduction of the solvent available for H-bonding to stabilize the complex, to an increase in competing interactions between decanol (H-bond donor) and TOA (H-bond acceptor), and to the decreased stabilization of the complex.

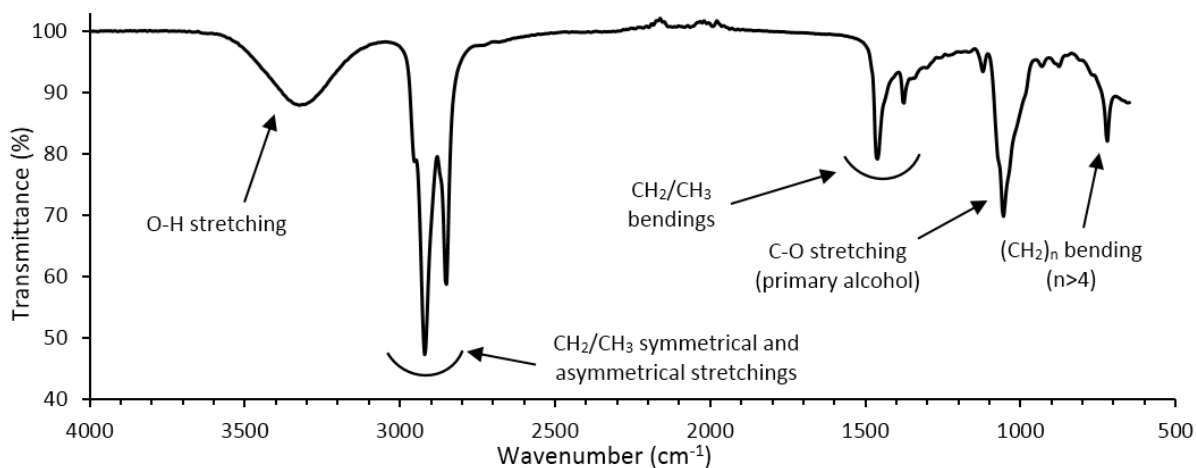
#### 4. Conclusion

This paper describes an in-depth study of the acid:amine complexation when aqueous 3-HP is extracted by tri-*n*-octylamine in *n*-decanol. The main extraction mechanism for dilute aqueous solutions is the formation of an ion pair involving the carboxylate ion of 3-HP in the organic phase. This mechanism was described by a chemical model based on mass action laws but this usual model was shown to be unable to describe the impact of initial amine concentration in the organic phase (Model 0). To take the solvation effects of the diluting agent into account, i.e. decanol, the model had to describe yield variations, especially the sharp decrease in extraction yield when the decanol amount was low. Indeed, the variation of the physicochemical properties of the medium strongly shifts the complexation equilibrium because amine and solvent have very different properties (H-bond ability, polarity, dissociating power, etc.). This is better described by the variation of the complexation equilibrium constant (Model 2) rather than assuming the complexation of the solvent as a synergistic extractant on the acid:amine core (Model 1). The complexation equilibrium coefficient in Model 2 appeared to vary from 0 to 19 L.mol<sup>-1</sup> when the decanol proportion in the organic phase ranged between 0 and 100%, denoting huge differences in system properties. This model allows a good prediction of extraction yield with only a 2% root mean squared deviation over wide concentration ranges (initially 0.25–50 g/L aqueous 3-HP and 0–100% v/v = 0–2.3 mol/L TOA in the organic phase) and is potentially applicable to other reactive extraction systems.

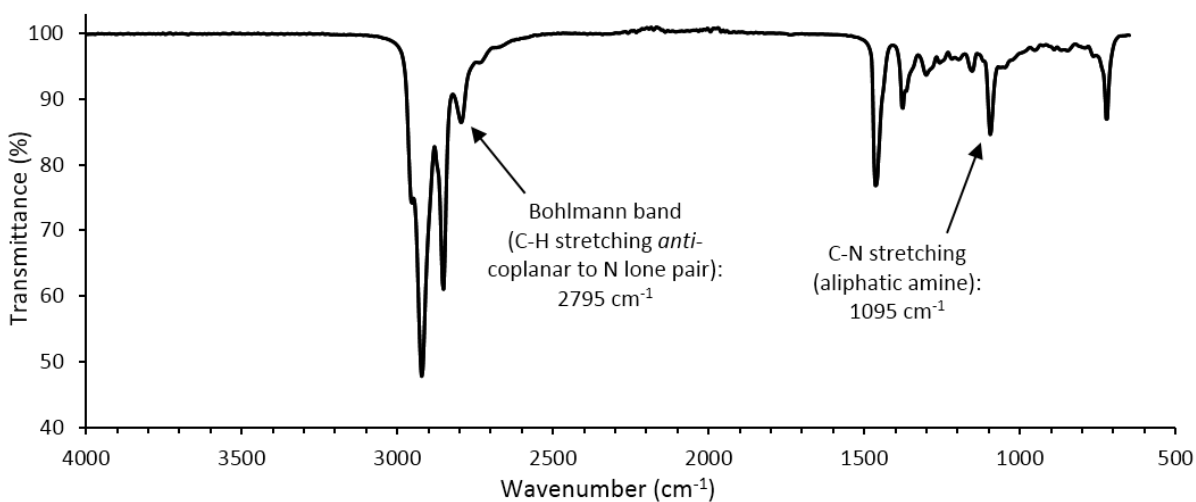
#### Acknowledgements

The authors are grateful to the Champagne-Ardenne Region and the Conseil Départemental de la Marne and Reims Métropole for financial support.

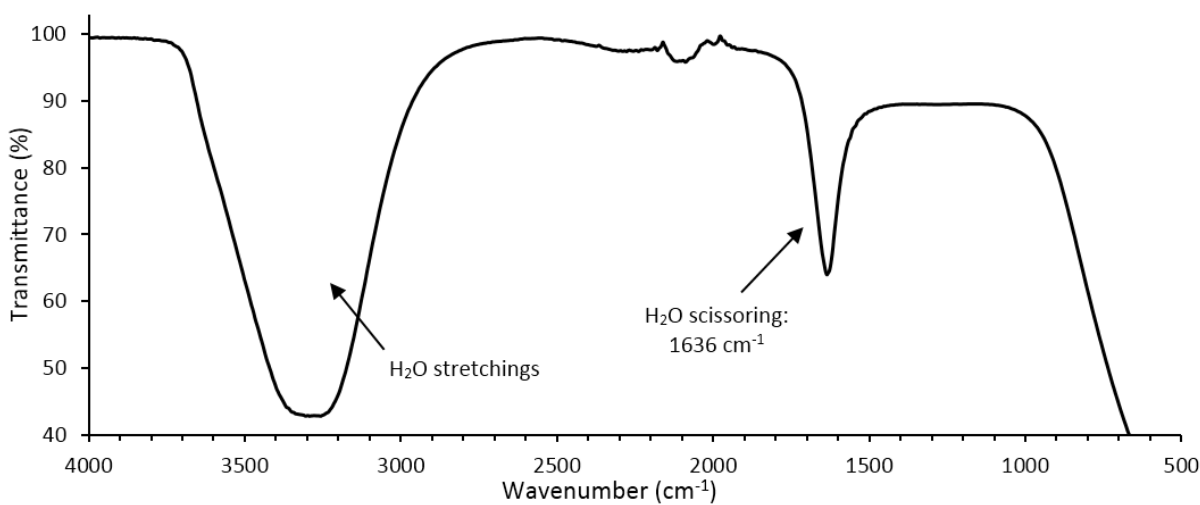
## Appendices



Appendix 1: Infrared spectrum of *n*-decanol.



Appendix 2: Infrared spectrum of tri-*n*-octylamine.



Appendix 3: Infrared spectrum of water.

## 5. Références

- [1] A.S. Kertes, C.J. King, Extraction Chemistry of Fermentation Product Carboxylic Acids, *Biotechnology and Bioengineering*. 28 (1986) 269–282.
- [2] V. Bízek, J. Horáček, M. Koušová, Amine extraction of citric acid: effect of diluent, *Chemical Engineering Science*. 48 (1993) 1447–1457.
- [3] H. Uslu, C. Bayat, S. Gökmen, Y. Yorulmaz, Reactive extraction and LSER model consideration of lactic acid with tripropylamine+organic solvent systems from aqueous solution at room temperature, *Desalination*. 249 (2009) 694–698.
- [4] N. Marchitan, C. Cojocaru, A. Mereuta, G. Duca, I. Cretescu, M. Gonta, Modeling and optimization of tartaric acid reactive extraction from aqueous solutions: A comparison between response surface methodology and artificial neural network, *Separation and Purification Technology*. 75 (2010) 273–285.
- [5] D. Datta, S. Kumar, Modeling using response surface methodology and optimization using differential evolution of reactive extraction of glycolic acid, *Chemical Engineering Communications*. 202 (2015) 59–69.
- [6] E.E. Spala, J.E. Ricker, Thermodynamic Model for Solvating Solutions with Physical Interactions, *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*. 21 (1982) 409–415.
- [7] T. Kirsch, H. Ziegenfuss, G. Maurer, Distribution of citric, acetic and oxalic acids between water and organic solutions of tri-*n*-octylamine, *Fluid Phase Equilibria*. 129 (1997) 235–266.
- [8] G. Maurer, Modeling the liquid–liquid equilibrium for the recovery of carboxylic acids from aqueous solutions, *Fluid Phase Equilibria*. 241 (2006) 86–95.
- [9] J.A. Tamada, A.S. Kertes, C.J. King, Extraction of Carboxylic Acids with Amine Extractants. 1. Equilibria and Law of Mass Action Modeling, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 29 (1990) 1319–1326.
- [10] A. Keshav, K.L. Wasewar, S. Chand, Extraction of propionic acid with tri-*n*-octyl amine in different diluents, *Separation and Purification Technology*. 63 (2008) 179–183.
- [11] H. Uslu, D. Datta, Experimental and Theoretical Investigations on the Reactive Extraction of Itaconic (2-Methylidenebutanedioic) Acid Using Trioctylamine ( *N,N*-Dioctyl-octan-1-amine), *Journal of Chemical & Engineering Data*. 60 (2015) 1426–1433.
- [12] F. Chemarin, M. Moussa, M. Chadni, B. Pollet, P. Lieben, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, New insights in reactive extraction mechanisms of organic acids: An experimental approach for 3-hydroxypropionic acid extraction with tri-*n*-octylamine, *Separation and Purification Technology*. 179 (2017) 523–532.
- [13] S. Kumar, B.V. Babu, K.L. Wasewar, Investigations of biocompatible systems for reactive extraction of propionic acid using aminic extractants (TOA and Aliquat 336), *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 17 (2012) 1252–1260.
- [14] A. Keshav, K.L. Wasewar, S. Chand, REACTIVE EXTRACTION OF PROPIONIC ACID USING TRI-*n*-OCTYLAMINE, *Chemical Engineering Communications*. 197 (2009) 606–626.
- [15] A.F. Tuyun, H. Uslu, Reactive extraction of acrylic acid using trioctylamine (TOA) in versatile diluents, *Desalination and Water Treatment*. 55 (2015) 193–198.
- [16] H. Uslu, Investigation of acrylic acid extractability from aqueous solution using tridodecyl amine extractant, *Desalination and Water Treatment*. 28 (2011) 189–195. doi:10.5004/dwt.2011.2246.
- [17] D. Yankov, J. Molinier, J. Albet, G. Malmay, G. Kyuchoukov, Lactic acid extraction from aqueous solutions with tri-*n*-octylamine dissolved in decanol and dodecane, *Biochemical Engineering Journal*. 21 (2004) 63–71.
- [18] K.L. Wasewar, A.B.M. Heesink, G.F. Versteeg, V.G. Pangarkar, Equilibria and kinetics for reactive extraction of lactic acid using Alamine 336 in decanol, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 77 (2002) 1068–1075.

- [19] D. Pal, A. Tripathi, A. Shukla, K.R. Gupta, A. Keshav, Reactive Extraction of Pyruvic Acid Using Tri-n-octylamine Diluted in Decanol/Kerosene: Equilibrium and Effect of Temperature, *Journal of Chemical & Engineering Data*. 60 (2015) 860–869.
- [20] D. Pal, N. Thakre, A. Kumar, A. Keshav, Reactive extraction of pyruvic acid using mixed extractants, *Separation Science and Technology*. 51 (2016) 1141–1150.
- [21] T. Werpy, G. Petersen, A. Aden, J. Bozell, J. Holladay, J. White, A. Manheim, D. Elliot, L. Lasure, S. Jones, M. Gerber, K. Ibsen, L. Lumberg, S. Kelley, *Top Value Added Chemicals from Biomass, Volume 1—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, TN, 2004.
- [22] A. Koudriavtsev, R.F. Jameson, W. Linert, *The Law of Mass Action*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2001.
- [23] A. Keshav, K.L. Wasewar, S. Chand, H. Uslu, Effect of binary extractants and modifier–diluent systems on equilibria of propionic acid extraction, *Fluid Phase Equilibria*. 275 (2009) 21–26.
- [24] M. Matsumoto, T. Otono, K. Kondo, Synergistic extraction of organic acids with tri-n-octylamine and tri-n-butylphosphate, *Separation and Purification Technology*. 24 (2001) 337–342.
- [25] R.-S. Juang, R.-T. Wu, Effect of a Water-Insoluble Organic Acid on Amine Extraction of Acetic Acid from Aqueous Solutions. *Equilibrium Studies, Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 66 (1996) 160–168.
- [26] M. Matsumoto, Y. Kawamura, K. Kondo, Synergistic Extraction of Organic Acids with Tri-n-Octylamine and Di-2-Ethylhexylphosphoric Acid, *Journal of Chemical Engineering of Japan*. 37 (2004) 1150–1154.
- [27] M. Moussa, G. Burgé, F. Chemarin, R. Bounader, C. Saulou-Bérion, F. Allais, H.-E. Spinnler, V. Athès, Reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid from model aqueous solutions and real bioconversion media. Comparison with its isomer 2-hydroxypropionic (lactic) acid, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2015) 2276–2285.
- [28] R.S. Hansen, F.A. Miller, S.D. Christian, Activity Coefficients of Components in the Systems Water–Acetic Acid, Water–Propionic Acid and Water–n-Butyric Acid at 25°, *The Journal of Physical Chemistry*. 59 (1955) 391–395.
- [29] C.W. Davies, *Ion Association*, Butterworths, London, 1962.
- [30] J.A. Tamada, C.J. King, *Extraction of Carboxylic Acids by Amines Extractant*, Lawrence Berkeley Laboratory, CA (USA), United States, 1989.
- [31] J.-J. Max, C. Chapados, Infrared Spectroscopy of Aqueous Carboxylic Acids: Comparison between Different Acids and Their Salts, *The Journal of Physical Chemistry A*. 108 (2004) 3324–3337.
- [32] J.A. Tamada, C.J. King, Extraction of Carboxylic Acids with Amine Extractants. 2. Chemical Interactions and Interpretations of Data, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 29 (1990) 1327–1333.
- [33] J.A. Richman Jr, A qualitative study of the “Bohlmann Band,” Master’s Theses, Paper 986, University of Richmond, 1967.
- [34] T. Kirsch, G. Maurer, Distribution of oxalic acid between water and organic solutions of tri-n-octylamine, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 35 (1996) 1722–1735.
- [35] D.F. DeTar, R.W. Novak, Carboxylic acid-amine equilibria in nonaqueous solvents, *Journal of the American Chemical Society*. 92 (1970) 1361–1365.
- [36] P. Nagy, Competing Intramolecular vs. Intermolecular Hydrogen Bonds in Solution, *International Journal of Molecular Sciences*. 15 (2014) 19562–19633.
- [37] V.K.W. Cheng, M. Flock, M. Ramek, Ab Initio SCF Structure Investigation of  $\beta$ -Hydroxypropionic Acid and 3-Aminopropionamide, *International Journal of Quantum Chemistry*. 57 (1996) 929–941.
- [38] J.M. Wardell, C.J. King, Solvent equilibria for extraction of carboxylic acids from water, *Journal of Chemical and Engineering Data*. 23 (1978) 144–148.
- [39] D.B. Chesnut, A. Savin, The electron localization function (ELF) description of the PO bond in phosphine oxide, *Journal of the American Chemical Society*. 121 (1999) 2335–2336.

[40] D.G. Gilheany, No d orbitals but Walsh diagrams and maybe banana bonds: chemical bonding in phosphines, phosphine oxides, and phosphonium ylides, *Chemical Reviews*. 94 (1994) 1339–1374.

## 6. Principaux résultats et remarques supplémentaires

- La spectrométrie infrarouge nous a permis d'identifier 3 bandes caractéristiques de l'acide en phase organique : une bande d'élongation de la double liaison C=O d'un acide carboxylique non-dissocié et deux bandes d'élongation symétrique et asymétrique du groupe carboxylate avec la double liaison délocalisée sur trois centres pour un acide dissocié.
- Quand il n'y a pas d'amine en phase organique, la faible part d'acide extraite est présente sous forme non-dissociée en phase organique.
- Quand la quantité d'acide en phase organique est inférieure à la quantité d'amine le mécanisme réactionnel est la formation d'une paire d'ions et l'acide est présent sous forme déprotonnée.
- Quand la quantité d'acide est similaire à celle de l'amine un deuxième mécanisme d'extraction de l'acide sous forme non-dissociée est observé suggérant la formation de complexes oligomériques où des molécules de 3-HP non-dissocié supplémentaires peuvent se lier par liaison H, la première se liant à l'anion carboxylate du complexe. Cependant, dans nos conditions, ce mécanisme reste extrêmement minoritaire et n'est pas pris en compte dans la modélisation
- Un modèle basé sur les bilans matière, les lois d'action de masse et l'influence du solvant sur la constante d'équilibre de complexation permet de prédire les rendements d'extraction du système sur une large gamme de concentrations initiales (3-HP : 0.25 – 50 g/L, TOA : 0 – 100% v/v) représentant des conditions probables de concentrations en procédé biotechnologique couplé à une étape d'ISPR.
- L'erreur moyenne du modèle lors de sa calibration et pour les expériences de validation externes est de seulement 1 et 1,7% respectivement en unité de rendement.

Par la suite, nous nous servirons des résultats de ce modèle d'équilibre afin de concevoir un modèle prédictif de la dynamique du transfert lors de la mise en œuvre de l'extraction réactive en contacteur membranaire. Cependant, une telle phase aqueuse de 3-HP pur dilué dans de l'eau n'est pas totalement représentative d'un milieu de bioconversion dans lequel le 3-HP serait produit. Nous nous intéressons donc dans l'étude suivante à l'influence des composés d'un milieu de bioconversion solubles dans l'eau sur l'efficacité de l'extraction en contacteur membranaire et en particulier l'impact de leur concentration.

## Publication n°3

### **Vers un procédé de récupération *in situ* de l'acide 3-hydroxypropionique biosourcé : influence des composants d'un milieu de bioconversion sur l'extraction réactive en contacteur membranaire**

Ce papier traite de l'effet de la composition d'un milieu de bioconversion sur l'efficacité de l'extraction réactive assistée par contacteur membranaire d'un acide organique, l'acide 3-hydroxypropionique (3-HP), par la tri-*n*-octylamine (TOA) dans le *n*-décanol en vue d'un procédé de récupération *in situ*. Les milieux de bioconversion sont des milieux complexes avec des micro-organismes qui convertissent des substrats en produits d'intérêts et coproduits et qui peuvent libérer des biomolécules telles que des protéines. Des sels et des sources d'azote sont souvent nécessaires ainsi que d'autres nutriments. Pendant la bioconversion, les concentrations des espèces sont censées varier et le pH est la plupart du temps un paramètre clé de contrôle du procédé. Nous nous concentrons ici sur l'influence de la concentration en acide (entre 0.5 et 10 g/L en 3-HP), le pH initial de la solution (de 3 à 5) et la présence de protéines et de sels (chlorure et dihydrogénophosphate) sur les rendements et cinétiques d'extraction. Il a été trouvé que réduire la concentration initiale en acide engendrait une accélération de la cinétique d'extraction. Les effets pH sont considérables : augmenter le pH de 3 à 5 a diminué le rendement d'extraction de 74 à seulement 5% tout en accélérant la cinétique. Les protéines n'ont pas montré d'impact significatif sur le rendement ni sur la cinétique dans la gamme de concentration étudiée dans ce travail probablement à cause de la résistance négligeable qu'elles induisent au transfert de matière à l'interface à l'embouchure des pores de la membrane. En effet, dans le cas des membranes hydrophobes, la résistance principale au transfert de matière est située dans les pores de la membrane remplis par la phase organique. A l'inverse, l'effet de la présence de sels était très important, les rendements diminuant avec la concentration en sels. Dans le cas des ions chlorure par exemple, il a été montré que ce phénomène est dû à un échange d'anions entre l'anion carboxylate du 3-HP et l'anion du sel dans le complexe avec l'amine dans la phase organique. Les ions chlorure ont plus d'affinité pour le cation tri-*n*-octylammonium dans la phase organique que les ions dihydrogénophosphate. Ces résultats donnent des informations valorisables pour la mise en œuvre de l'extraction réactive à membrane en tant que procédé de récupération *in situ* tout en suggérant des recommandations pour la mise au point des bioconversions.

Mots-clés : trioctylamine ; extraction réactive ; acide organique ; milieu de bioconversion

## **Towards an *In Situ* Product Recovery of bio-based 3-hydroxypropionic acid: influence of bioconversion broth components on membrane-assisted reactive extraction**

F. Chemarin<sup>a,b</sup>, V. Athès<sup>b</sup>, M. Bedu<sup>c</sup>, T. Loty<sup>a,b</sup>, F. Allais<sup>a,b</sup>, I.C. Trelea<sup>b</sup>, M. Moussa<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> AgroParisTech, Chaire Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI), Centre Européen de Biotechnologie et Bioéconomie (CEBB), 3 Rue des Rouges Terres, F-51110 Pomacle, France

<sup>b</sup> UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, F-78850, Thiverval-Grignon, France

<sup>c</sup> UMR GENIAL, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, F-91300, Massy, France

\* Corresponding author: marwen.moussa@agroparistech.fr

### Abstract:

This paper deals with the impact of bioconversion broth composition on the membrane-based reactive extraction efficiency of an organic acid, 3-hydroxypropionic acid (3-HP), by tri-*n*-octylamine in *n*-decanol toward an *in-situ* product recovery. Bioconversion broths are complex media with microorganisms that convert substrates into products and coproducts and that may release biomolecules such as proteins. Salts and nitrogen sources are often needed as well as other nutrients. During the bioconversion, species concentrations are meant to vary and pH is most of the time a key control parameter. We focus here on the influence of the acid concentration (3-HP between 0.5 and 10 g/L), initial pH of the solution (3 to 5), presence of proteins and salts (chloride and biphosphate) on the extraction yields and kinetics. It was found that reducing the initial acid concentration caused an acceleration of the extraction kinetics. pH effects were dramatic as enhancing the pH from 3 to 5 decreased the extraction yield from 74 to only 5% while accelerating the extraction kinetics. Proteins were shown to have negligible impact on the extraction yield and kinetics in the range of concentration studied in this work, probably because of the negligible mass transfer resistance brought by the proteins at the membrane pore interface level. Indeed, in the case of hydrophobic membrane, the main mass transfer resistance is located in the membrane pores filled with the organic phase. Conversely, the presence of salts were highly impacting, yields decreasing with the increase of salts concentrations. In the case of chloride for example, this phenomenon was shown to be due to anion exchange between the carboxylate anion of 3-HP and the anion of the salt in the amine complex in the organic phase. Chloride ions were found to have more affinity for the tri-*n*-octylammonium cation in the organic phase than the biphosphate ions. These results give valuable information for the implementation of a membrane-based reactive extraction as an *in-situ* product recovery process, suggesting recommendations for bioconversion tuning.

Keywords: trioctylamine, reactive extraction, organic acid, bioconversion broth

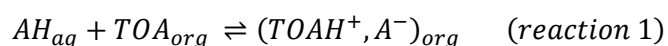


## 1. Introduction

Within the actual trend of the bioeconomy development, bio-based platform molecules such as 3-hydroxypropionic acid (3-HP) are widely investigated. Indeed, the American department of energy ranked 3-HP among the top 10 value-added chemicals from biomass[1]. It is seen as a potential precursor for a large set of chemicals like polyesters and acrylic acid and its derivatives to produce bio-based polymers such as polyacrylates and polyacrylamides. The main routes studied for the production of 3-hydroxypropionic acid are biotechnological conversions of bio-sourced substrates like glycerol, glucose, xylose, 1,3-propanediol and even CO<sub>2</sub>.

Several examples of organic acids bioproduction were shown to be limited, in most cases because of the inhibitory effects of the produced molecules. The case of inhibition during 3-HP production has been reported in literature [2], and recently studied in detail regarding a *L. reuterii* strain producing 3-HP from glycerol, in the perspective of a combined production / extraction system to remove inhibition [3]. Indeed, toxicity was shown to be due to an intermediate (3-hydroxypropionaldehyde) and the final product (3-HP) accumulations. The intermediate can be prevented in optimal fed-batch conditions [4] while the toxicity of the final product could be reduced by extracting it continuously.

This latter strategy to improve the bioconversion performances through removing the acid from the bioconversion medium as soon as it is produced is called *In Situ* Product Recovery (ISPR). Instead of neutralizing 3-HP with a base in the bioconversion broth, the reactivity of the acidic group of 3-HP can be used to remove selectively the acid from the broth using reactive extraction [5]. This consists in reacting the acid in the aqueous phase with a reactant, called extractant, located in an organic phase. The product of the reaction is a reversible complex soluble in the organic phase, useful to remove the acid from the aqueous phase. A good extraction system for 3-HP is tri-*n*-octylamine (TOA) solvated in *n*-decanol (decanol), as it shows reasonably high extraction yields [6]. In this system, the main reaction occurring is:



To implement the extraction as an *in-situ* product recovery technique, membrane contactors seem very attractive as already reported in previous publications of extractive fermentations of organic acids [7–9].

The extraction mechanisms of 3-HP by TOA in decanol have been investigated in a previous study, demonstrating the formation of a (1:1) stoichiometry complex which means that one molecule of 3-HP reacts with one molecule of TOA resulting in an ion pair solvated by decanol and water in the organic phase [10]. However in real conditions of extraction from bioconversion media, the initial

aqueous phase can be much more complex than just an acid diluted in pure water. Hence, the presence of broth components and cell originating molecules can interfere with the extraction mechanisms of 3-HP.

Bioconversion media are known to contain microorganisms, salts, substrates, co-products and biomolecules as major impurities, in the case of optimized bioconversion conditions regarding pH and products yield [11–13]. Regarding substrates, a wide variety are used in biotechnology, most recurrent ones are sugars like sucrose, lactose and glucose. These compounds have shown negligible effects on extraction performances for concentrations usually found in bioconversion media in the case of propionic and lactic acid [14,15]. Choudhury et al [16] showed that glucose and nitrogen-containing compounds (from yeast extract) were only very poorly extracted in TOA, octanol and MIBK. For 3-HP production from glycerol, major co-products are 3-hydroxypropionaldehyde and 1,3-propanediol [4,17]. It has been found that these 3 compounds had no effect on the extraction yields and were poorly or not extracted at all in the organic phase consisting in TOA and/or Aliquat 336 in decanol [5]. Accordingly, low molecular weight non-reactive molecules have rather low impacts on reactive extraction when present in common bioconversion concentrations.

The bioconversion medium pH is probably the most studied parameter [14,18–23]. The driving force for the complex formation in the organic phase being the acid-base interaction between the carboxyl group of the acid and the amine group of the extractant, pH is expected to have an important impact on extraction efficiency. Accordingly, it has been reported for many organic acids that if the pH of the solution is higher than the pKa of the acid then the extraction yield is dramatically decreased when compared to acid solutions without pH modification. For example, in the case of lactic acid (7 g/L in water; pKa = 3.86) extraction by 30%v/v TOA in decanol, the extraction yield falls from more than 90% at initial pH between 2 and 3 to 0% at initial pH=6 [24]. For 3-HP, extraction yields also decrease with pH in the case of TOA with or without Aliquat 336 in decanol [5,25].

Besides this pH effect affecting extraction yield, some mass transfer limitations could occur because of microorganisms and biomolecules like proteins, acting as surface-active agents, that may significantly modify the liquid-liquid interface. It has been shown for example that the presence of microorganisms reduces the interfacial tension due to the presence of cells at the liquid-liquid interface. For example, it has been observed that yeasts accumulate at decanol/water interface, inducing a physical blockage of the interface, thus reducing the extraction kinetics [26]. Pursell et al [27] reported a 50% decrease of the mass transfer coefficient of chloramphenicol for biomass concentration of 0.1 g/L. However, even when cells are removed from bioconversion media, substantial effects remain that are thought to be due to biological surface-active agents as in the case of the reactive extraction of phenylalanine

with Aliquat 336 from fermentation broth [28]. In particular, proteins, even at low concentrations, are able to cover the interface by denaturation and unfolding of their chains along the interface [29]. It was shown that the addition of 1 mg/L of albumin from bovine serum (BSA) decreased the interfacial tension and slowed down the extraction progress by reducing the mass transfer coefficient of chloramphenicol of 70% across the water/octanol interface [27].

Finally, a wide variety of salts could be found in the bioconversion broths. The effects of inorganic salts have been described as very impacting in reactive extraction of carboxylic acids with amines, inducing most of the time a dramatic reduction of the extraction yield. One could have expected a salting-out effect as for the classic liquid-liquid (non-reactive) extraction of an organic solute, due to the disturbance of the water molecules organization around the compound resulting in lower solvation by water which is more susceptible to solvate the ions from the salt [30], but salt level encountered in bioconversion media are not of the same order of magnitude than the one that could increase the extraction yield by an organic phase. Moreover, in the case of reactive extraction, inorganic salts often induce a dramatic reduction of the extraction yield, for example for acetic [31–33], citric [34,35] or lactic acids [15]. These studies reported the effects of chlorides, phosphates, nitrates and sulfates from sodium, potassium or ammonium salts, decreasing the extraction yield.

Thus, the compounds found in complex biological media can strongly interfere in organic acids reactive extraction. Therefore, this paper aims to study the influence of selected bioconversion broth components on the efficiency of reactive liquid-liquid extraction of 3-hydroxypropionic acid with tri-*n*-octylamine in decanol using a membrane contactor and in particular the influence of acid concentration, pH, some salts and proteins.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental strategy

Membrane-based reactive liquid-liquid extractions were performed by varying the amounts of aqueous phase species while the organic phase was maintained in its optimal composition for 3-HP extraction with 20% v/v TOA in *n*-decanol [6]. Three initial 3-HP concentrations were tested in order to represent the orders of magnitude of a depleted medium of extractive bioconversion: 0.5, 1 and 10 g/L. The initial pH was also varied within 3 values: pH=3.2 (natural pH), pH=4 and pH=5. To this aim, potassium hydroxide for an initial concentration in 3-HP of 1 g/L. It aims at representing pH variation in a bioconversion process. Salts were also tested, potassium chloride and potassium biphosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) were selected, as they represent widely used buffers and pH regulating agents. Three molar ratios of inorganic anion/3-HP were studied in order to understand the influence of the amount of

salts: 1/10, 1/2 and 1/1. Potassium chloride being a neutral salt and considering its weak concentration, its addition into 3-HP solutions did not significantly change the pH. On the contrary, potassium biphosphate is an acidic and basic salt. In order to prevent pH deviations, 3-HP solutions containing potassium biphosphate were made with the targeted amounts of 3-HP and the corresponding amount of phosphoric acid and then neutralized with potassium hydroxide to the natural pH of the corresponding 3-HP concentration. The first and second pKa of phosphoric acid being 2.15 and 7.2, biphosphate ion is almost the only form of phosphoric acid present in solution during all the experiments. Other forms (non-dissociated phosphoric acid, hydrogenophosphate and phosphate ions) are thus neglected.

In order to mimic biomolecules release, the protein albumin from bovine serum (BSA) was used as a model biosurfactant. Its concentration was set to correspond to the estimated proteins concentration of reported 3-HP bioconversions [3] measured using Bradford titration with BSA as a standard, i.e. around 8 mg/L. Each experiment was repeated twice.

## 2.2. Chemicals

Organic phases were made of 20% v/v tri-*n*-octylamine (TOA, 98% purity, Sigma-Aldrich, USA) diluted in *n*-decanol (99% purity, Sigma-Aldrich, USA). Aqueous phases consisted in 3-HP (28.1% wt in water, TCI Europe, Belgium) diluted in ultrapure water with on purpose additions of potassium chloride (KCl, >97%, VWR, USA), phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 85% wt in water, Thermo Fisher Scientific, USA), potassium hydroxide and BSA (≥ 98%, Sigma-Aldrich, USA). Octylamine (99% purity) and di-*n*-octylamine (97% purity) were freely provided by Sigma-Aldrich for TOA impurities analyses.

## 2.3. Membrane-assisted reactive extraction

Liquid-liquid extractions were performed using a hollow fiber membrane contactor (HFMC), the 2.5x8 X50 Liqui-Cel® module with hydrophobic polypropylene fibers (Membrana, USA). The aqueous phase was pumped through the lumen side of the fibers at a flowrate of 8.6 mL/s and the organic phase through the shell side of the module at a flowrate of 8.1 mL/s in counter-current cross-flow configuration using volumetric pumps (Magnet Gear Pump, model MDG-H2T, Iwaki, Japan). Both phases were maintained in closed loop configurations as in Figure III-1 with a transmembrane pressure of 0.4 bar between the outlet of the aqueous phase and the inlet of the organic phase. Each phase had a global volume of 500 mL and was stirred with a magnetic stirrer and maintained at 25 ± 1°C with heated water baths. Samples of the aqueous phase were taken at regular times for further analyses.

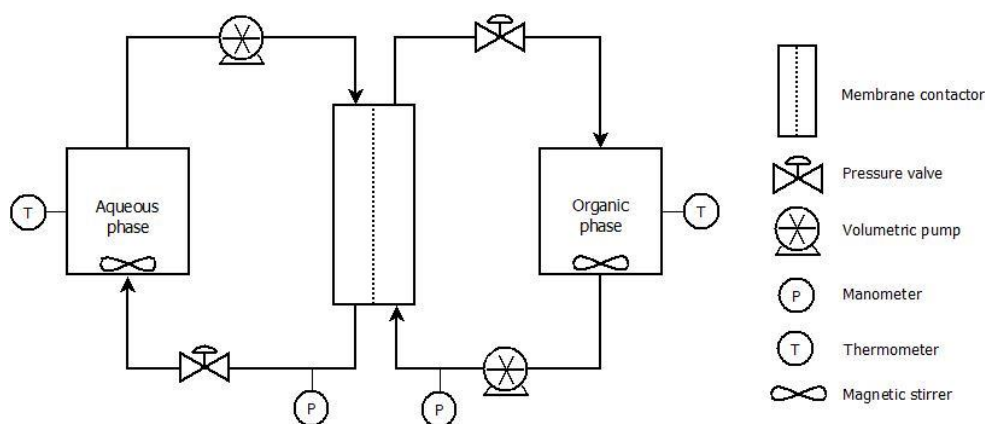


Figure III-1: Process flow diagram of the membrane-assisted reactive extraction experimental set-up

## 2.4. Calculated parameters

The extraction yield ( $Y$ ) represents the proportion of acid removed from the aqueous phase. As the phase volumes are observed to be constant during experiments, the extraction yield was calculated as follows:

$$Y = \frac{[AH]_{ini} - [AH]_{eq}}{[AH]_{ini}}$$

The kinetics were evaluated using the  $t_{63\%}$ , the time needed to extract 63% of the total extracted acid. This parameter was determined graphically, referring at the curves shape, showing an empirical first order decrease. In that case,  $t_{63\%}$  would correspond to a time constant.

## 2.5. Analytical methods

The concentration of biphosphate and chloride ions in the aqueous phase was determined using High-Performance Anion Exchange Chromatography (HPAEC) coupled with Conductimetric Detection (ICS-2000, Dionex, USA) with an IonPac AS14 anion exchange column (4x250 mm, Thermo Fischer Scientific, USA) and an IonPac AG50 guard column (4x50 mm, Thermo Fischer Scientific, USA) followed by an anion suppressor ASRS 300 (Dionex, USA) for suppressed conductivity detection. The mobile phase was a sodium carbonate (3.5 mM)-bicarbonate (1 mM) buffer flowing at 1.2 mL/min.

3-HP was analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC) and octylamine and dioctylamine present in aqueous phases with ultra-high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectroscopy (HPLC-HRMS). Both analytical methods were detailed in a previous publication [6]. When proteins were present in the samples, 140  $\mu$ L of 90 %wt trichloroacetic acid was added to 860  $\mu$ L of the sample and the new samples were left an hour at 4 °C. These samples were then centrifuged and passed through 0.2  $\mu$ m filters before HPLC analyses.

pH values were measured with a Jenco vision 6071 pH meter.

The statistical significance of difference between data was assessed using ANOVA tests with a significance level set to 0.05. For comparison, p-values ( $p$ ) are given in the results when necessary. For correlation between two measured parameters, the coefficient of determination ( $R^2$ ) is provided.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Influence of initial acid concentration

In a first set of experiments, the extraction kinetics in membrane contactor were studied as a function of initial 3-HP concentration. Results are shown in Figure III-2 and the deduced parameters, yield and time constant, in Table III-1.

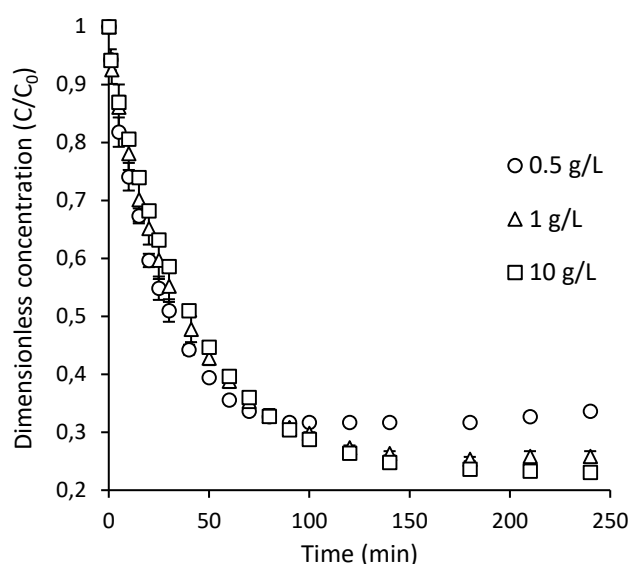


Figure III-2: Dimensionless concentration of 3-HP in the aqueous phase over time for different initial acid concentrations

First, we observe significant differences ( $p < 0.05$  for both yield and  $t_{63\%}$ ) among the three final yields and kinetics. Indeed, for the 3-HP concentration levels studied, the higher the initial concentration, the higher the extraction yield (66 – 77%, from 0.5 to 10 g/L) and the slower the kinetics ( $t_{63\%}$  between 22 and 40 min from 0.5 to 10 g/L) (Table III-1). Such yield variations were shown to be due to organic impurities [6] released in the aqueous phase, in particular primary and secondary amines residues initially present in TOA, and not to a limitation in terms of the complexation reaction of extraction. Indeed according to reaction 1, a lower initial 3-HP concentration for the same amine concentration means a higher excess of amine and accordingly leads to a higher complexation yield. This explains why the extraction kinetics is faster for the lower acid concentration, because of a slightly higher complexation yield regarding the TOA in excess. The transfer of small primary and secondary amines from the organic to the aqueous phase is not expected to change this kinetics. 3-HP extraction kinetics

was also shown to be slowed down when increasing concentration from 0.5 to 2 g/L using a similar membrane contactor with a different extractant phase made of TOA and Aliquat 336 in *n*-decanol [25].

Table III-1: summary of yield and kinetics parameters for all experimental conditions

[3-HP] (g/L)	Cl <sup>-</sup> /3-HP (mol ratio)	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> /3-HP (mol ratio)	BSA (mg/L)	Initial pH	Yield (%)	t <sub>63%</sub> (min)
0.5	0	0	0	3.4	66 ± 1	22 ± 2
1	0	0	0	3.2	74 ± 1	33 ± 4
10	0	0	0	2.7	77 ± 1	40 ± 1
1	0	0	0	4	43 ± 1	21 ± 2
1	0	0	0	5	5 ± 2	8 ± 5
1	1	0	0	3.2	18 ± 1	16 ± 4
1	1/2	0	0	3.2	32 ± 1	24 ± 1
1	1/10	0	0	3.2	55 ± 1	25 ± 1
1	0	1	0	3.2	38 ± 1	20 ± 1
1	0	1/2	0	3.2	46 ± 1	20 ± 1
1	0	1/10	0	3.2	54 ± 1	22 ± 1
1	0	0	8	3.3	73 ± 1	28 ± 1

### 3.2. Influence of initial pH

Extraction kinetics with 3 different initial pH (3.2, 4 and 5) with the same initial acid concentration (1 g/L) are disclosed in Figure III-3.

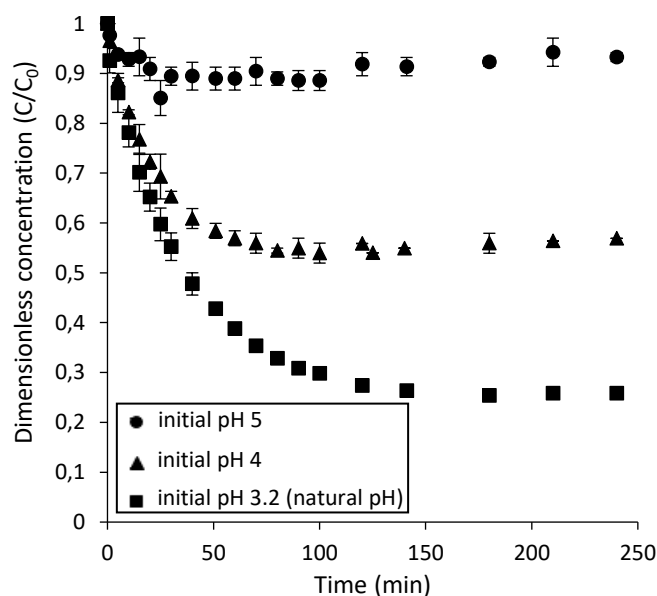


Figure III-3: Dimensionless concentration of 3-HP in the aqueous phase over time for different initial pH (initial 3-HP concentration: 1 g/L)

At pH = 5, the extraction yield is very weak around 8%, while, at pH = 4 and natural pH, 43% and 74% are obtained respectively (Table III-1). As the amine is only able to extract the protonated form of the

acid, it is consistent with the gradual diminution of initial fraction of non-dissociated acid with initial pH. Indeed, pH 5, 4 and 3.2 correspond to 24%, 76% and 97% of non-dissociated fractions of 3-HP in solution respectively and hence the extraction yield of 3-HP (based on the total 3-HP concentration as dissociated and non-dissociated) decreases accordingly with the dissociated part remaining in the aqueous phase which increases its pH. As a matter of fact, the equilibrium pH reached 6.6 for a solution with an initial pH 5. This behavior is similar to what has been found for other carboxylic acids [20,21,24]. Concerning the kinetics, it can be noticed that the higher the pH, the faster the extraction ( $t_{63\%} = 8$  min at pH 5 and 33 min at pH 3.2). The effects are comparable to the concentration effects shown in Figure III-2. Thus, the pH effects are actually mainly due to the variation of concentration of the non-dissociated fraction of 3-HP. For the implementation of an integrated process of 3-HP extractive bioconversion, it would be necessary to use pH-tolerant microorganisms such as yeasts [11,36–38] or acetic acid bacteria, for example from acetobacter [39] or gluconobacter [40] genera with a pH regulation mainly undertaken by the acid removal.

### 3.3. Influence of the presence of salts

Figures III-4 and III-5 provide the extraction kinetics of 1 g/L 3-HP initially in the presence of potassium chloride and potassium biphosphate in different proportions.

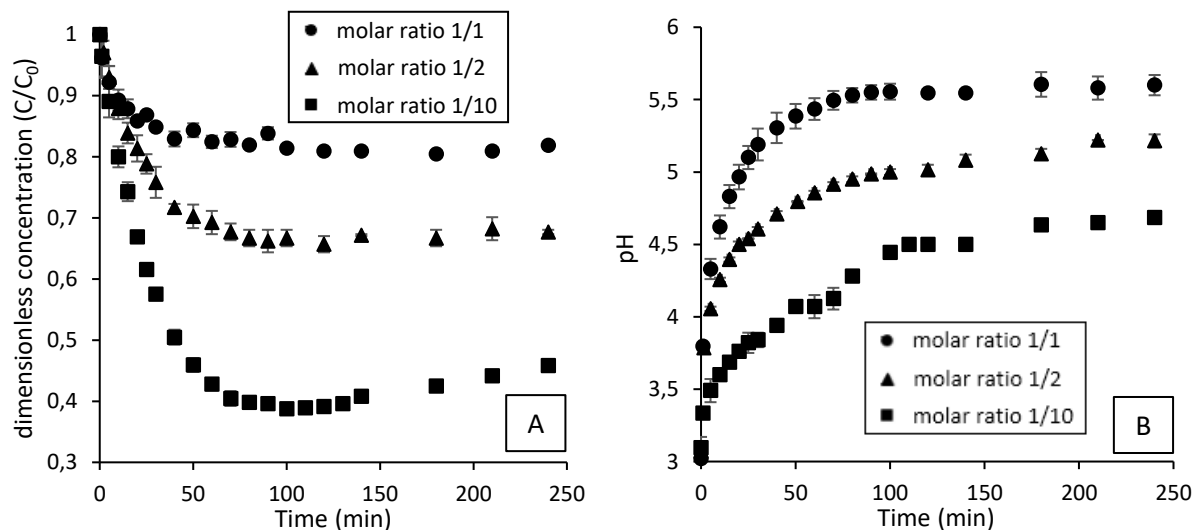


Figure III-4: Dimensionless concentration of 3-HP (A) and pH evolution in the aqueous phase (B) over time for different initial Cl<sup>-</sup>/3-HP molar ratios (initial concentration of 3-HP= 1 g/L)



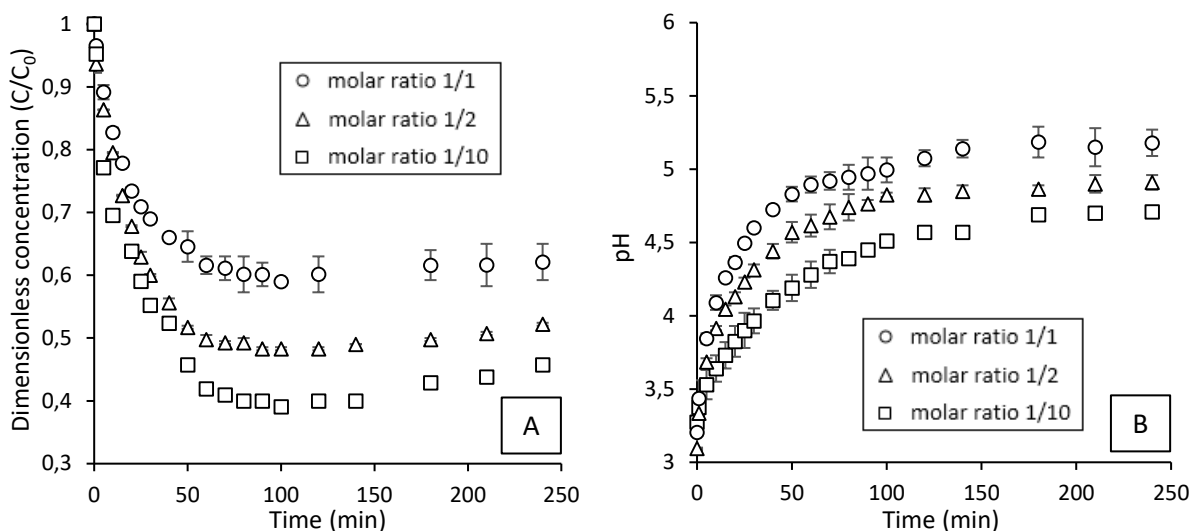


Figure III-5: Dimensionless concentration of 3-HP (A) and pH evolution in the aqueous phase (B) over time for different initial  $H_2PO_4^-$ /3-HP molar ratios (initial concentration of 3-HP = 1 g/L)

Both biphosphate and chloride salts hindered the extraction of 3-HP. The higher the salt concentration, the lesser the extraction yield. Potassium biphosphate appears to have less impact on 3-HP extraction than potassium chloride which means that chloride anions interfere more than biphosphate anions with the reactive extraction mechanism. For example, for a 1/1 ratio at  $t=100$  min, 81% of initial 3-HP remain in the aqueous phase with the chloride ions whereas only 59% remain for the biphosphate ions. For both salts, after 100 minutes of extraction, the concentration of 3-HP tends to increase in the aqueous phase. This is due to interactions with TOA impurities (water soluble protonated octylamine and dioctylamine) and will be discussed in detail further.

The more salt in solution, the higher the final pH of the solution ( $p < 0.01$ ) of otherwise similar initial pH before the beginning of the reactive extraction. The impact of chloride ions seems again greater than the biphosphate ions on pH. Final pH of 5.6 or 4.9, for example, corresponding to experimental 3-HP concentrations of 8 and 7 mM respectively were found (figures III-4 and III-5). Such high pH for acid concentrations between  $10^{-3}$  and  $10^{-2}$  M indicate the production of the conjugate base of 3-HP without the presence of any basic species in the aqueous phase initially.

To understand these variations in extraction yield and pH and clarify how the salts interfere with the extraction, the concentrations of the different species present in the aqueous phase were determined (Figure III-6).

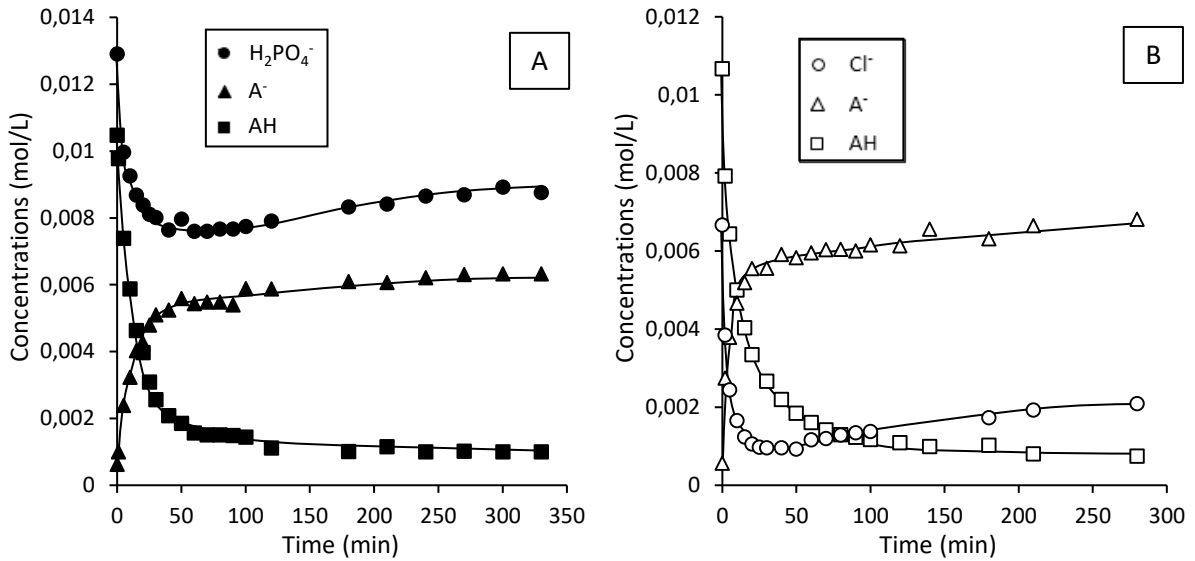


Figure III-6: Concentrations as a function of time in the case of the presence of potassium biphosphate (A) and potassium chloride (B) with initial KCl/3-HP and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/3-HP molar ratios of 1/1 and 1/2 respectively (initial 3-HP concentration = 1 g/L)

Concentrations of dissociated (A<sup>-</sup>) and non-dissociated (AH) forms of 3-HP were calculated from pH measurements according to:

$$[A^-] = \frac{10^{pH-pK_A}}{1 + 10^{pH-pK_A}} [AH]_{HPLC}$$

$$[AH] = \frac{1}{1 + 10^{pH-pK_A}} [AH]_{HPLC}$$

where  $[AH]_{HPLC}$  is the total concentration (dissociated and non-dissociated) of 3-HP as determined by HPLC.

Figure III-6 shows that the concentration of inorganic anions is decreasing rapidly over time indicating they are transferred to the organic phase. This phenomenon is not observed when there is no 3-HP in the aqueous phase since the inorganic salts are not extracted when they are alone (data not shown). Along with the fast decrease of the inorganic anions, we can observe a high increase of the dissociated 3-HP, a carboxylate anion, at the opposite rate.

These observations argue in favor of an anion exchange as described in reactions 2 and 3, a mechanism that induces a decrease in the extraction yield when 3-HP is extracted in the presence of salts (for example a 4 times decrease for a molar ratio of 1/1 between 3-HP and KCl, see Table III-1):



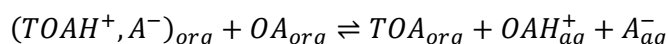
Indeed, the release of the carboxylate conjugate of 3-HP in the aqueous phase increases the pH of the solution. The more salt in solution, the more carboxylate released and then the higher the pH and the lesser the extraction yield. From the present results, we can see that chloride ions are more readily extracted (faster with a higher yield) than the biphosphate ions which demonstrates a higher affinity of  $\text{Cl}^-$  for the ammonium cation. The smaller size of chloride, its non-delocalized charge and the stronger acidity of hydrochloric acid when compared to phosphoric acid could be the explanation in a protic solvent.

Similar results were also reported in the literature. In a very recent work [41], Matsumoto et al also reported a large antagonism for 3-HP extraction upon the addition of NaCl in high concentrations ( $>1$  mol/L) with an extracting system made of TOA in *n*-octanol. It has been demonstrated that when there is no acid in the aqueous phase, the extraction of the salt is negligible and its concentration remains constant. But when there is an organic acid in the solution, the anion concentration decreases while the cation concentration remains unchanged in solution [31]. It seems that while the cation of the salt does not take part in any chemical reaction and has a constant concentration over extractions, the anion is extracted in the organic phase through the formation of an anion pair with ammonium very similarly to the extraction of the corresponding inorganic acid. As a result, the aqueous phase is loaded with carboxylates of the organic acid, and an increase in pH can be observed. This effect is such that a saline aqueous solution can be used as a back-extraction phase to recover the organic acid from a loaded organic phase, with back-extraction efficiency varying according to the anion of the salt [42]. The presence of salts induces a drastic decrease in the extraction yield with the increase of salt concentrations by an anion exchange mechanism releasing the carboxylate conjugate of the acid in the aqueous phase. Limiting salts accumulation in the broth is then necessary to master the process efficiency.

#### 3.4. TOA impurities effects

As mentioned before on Figures III-4 and III-5, one could notice a significant increase of the 3-HP concentration for the lowest salt/acid ratio tested (1/10) after 100 min of extraction. This increase is only due to the carboxylate form of 3-HP. It is not related to an anion exchange mechanism or to non-dissociated 3-HP since non-dissociated 3-HP and inorganic anions concentrations remain rather constant over time after  $t=100$  min (figure III-7). The only possibility left is that the carboxylate anions come from the organic phase of extraction where the carboxylate is part of the  $(\text{TOAH}^+, \text{A}^-)$  complex (reaction 1), if so, a cation must be equally released in the aqueous phase and the only existing cations in the organic phase are ammoniums. Tri-*n*-octylammonium is very poorly soluble in water and we think that this phenomena is mainly due to impurities consisting in octylamine (OA) and di-*n*-

octylamine (DOA) as already reported in a previous work [6]. The concentration of smaller amines (i.e. OA and DOA) has been measured over time during the extraction and is plotted in figure III-7 as well as the other concentrations (inorganic anion, dissociated and non-dissociated form of 3-HP). It is obvious that after  $t = 50$  min 3-hydroxypropionate anions and amines (ammoniums) in the aqueous phase are strongly correlated ( $R^2=0.99$ ). Thus, we show that 3-HP is first extracted in the organic phase probably forming a TOA complex which then might rearrange to form the octylammonium salt with the residual octylamine and the salt is then released in the aqueous phase.



This would explain the delayed increase observed for 3-HP concentration compared to its extraction. This phenomenon also occurs with salt/acid ratios of 1/2 and 1/1 but, in these cases, the inorganic anion being the major species extracted, it is mainly the inorganic ion concentrations that increase after  $t=50$  min as can be seen on figure III-6.

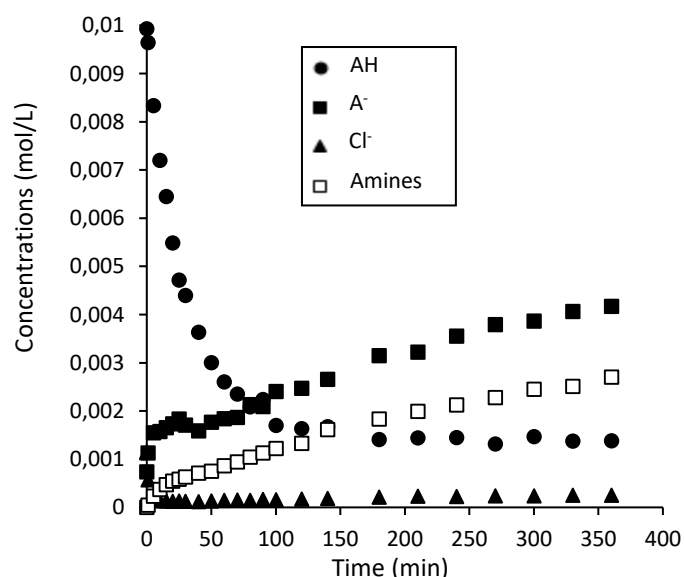


Figure III-7: Concentrations in aqueous phase as a function of time in the presence of potassium chloride with a molar ratio 3-HP/KCl of 1/10 (amines = octylamine + dioctylamine)

Unlike salts, the influence of non-reacting biomolecules should be different as they are not meant to interact chemically with the complex. However an influence on the kinetics could be expected. Concerning the influence of proteins, we tested a protein concentration of 8 mg/L representing what has been found in some bioconversion broth while avoiding pH buffering effects. The results are depicted in figure III-8.

### 3.5. Influence of the presence of proteins

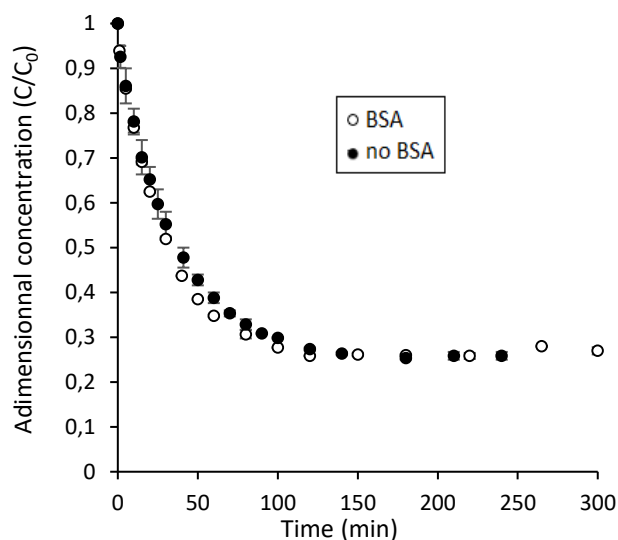


Figure III-8: dimensionless 3-HP concentration in the aqueous phase over time in the presence (8mg/L) and absence of BSA

No significant difference in yields or kinetics can be observed between the presence and the absence of proteins. Indeed, BSA is not supposed to interact strongly with 3-HP or the complex formed with TOA and, accordingly, the yield remains unchanged ( $p > 0.5$ ) at 74% (Table III-1). The extraction kinetics are also not significantly different ( $p > 0.3$ ), the parameter  $t_{63\%}$  being  $28 \pm 1$  and  $33 \pm 4$  min with and without BSA respectively. Several reasons can be suggested for this. The size of a BSA molecule (modeled as a prolate ellipsoid with a major axis of 14 nm and a minor axis of 4 nm at 25 °C in water [43]) is in the same order of magnitude than the pore size of the membrane (average diameter of 30 nm). However, the most probable explanation is that the supplementary interfacial resistance due to proteins adsorption, creating sort of a thin permeable wall, may be negligible in comparison with the high membrane resistance whose 100  $\mu\text{m}$ -longed pores are filled with a stagnant viscous organic phase. Moreover, the decrease of interfacial tension due to the presence of surface-active compounds can lead to emulsion problems in dispersive extractions. Membrane-assisted extraction being a non-dispersive process, lowering interfacial tension is a bit less problematical. Therefore, the presence of proteins seems to have no impact on the membrane-assisted extraction in the short term for such concentrations.

#### 4. Conclusion

The influence of the composition of the bioconversion broth on membrane-based reactive extraction of organic acids is here reported for the case of 3-hydroxypropionic acid using tri-*n*-octylamine in *n*-decanol. It was shown that the reduction of acid concentration favored the kinetics of the extraction, probably due to higher complexation extent inducing a higher driving force for mass transfer. Moreover, increasing the pH from 3 to 5 was shown to strongly decrease the performances of the extraction process, and it is then advised to operate at acidic pH and use pH-tolerant microorganisms

(e.g. yeasts, other fungi or acetic acid bacteria) for the implementation of such a process as an *in-situ* product recovery method. Furthermore, it was found that salts had a major impact, decreasing the extraction yield with the increase of salt concentrations by an anion exchange mechanism releasing the carboxylate conjugate of the acid in the aqueous phase. Limiting salts accumulation in the broth is then necessary for a good process efficiency. Conversely, no influence of proteins on the kinetics, because of the preponderant membrane resistance, nor on the yield of extraction was detected. Accordingly, based on these results, the implementation of an *in situ* product recovery process needs a thorough reflection on the unit operations coupling for running on optimal conditions, either on bioconversion medium composition or extractant purity in the organic medium.

### **Acknowledgement**

The authors are grateful to Région Grand Est, and the Conseil Départemental de la Marne and Grand Reims for financial support.

## 5. Références

- [1] T. Werpy, G. Petersen, A. Aden, J. Bozell, J. Holladay, J. White, A. Manheim, D. Elliot, L. Lasure, S. Jones, M. Gerber, K. Ibsen, L. Lumberg, S. Kelley, *Top Value Added Chemicals from Biomass, Volume 1—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, TN, 2004.
- [2] V. Kumar, S. Ashok, S. Park, Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid, *Biotechnol Adv.* 31 (2013). doi:10.1016/j.biotechadv.2013.02.008.
- [3] G. Burgé, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, F. Chemarin, M. Kniest, F. Allais, H.-E. Spinnler, V. Athès, Towards an extractive bioconversion of 3-hydroxypropionic acid: study of inhibition phenomena: Evaluation of bacterial cell inhibition during 3-HP extractive bioconversion, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* (2017). doi:10.1002/jctb.5253.
- [4] T. Dishisha, L.P. Pereyra, S.-H. Pyo, R.A. Britton, R. Hatti-Kaul, Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol, *Microbial Cell Factories.* 13 (2014) 1–11. doi:10.1186/1475-2859-13-76.
- [5] M. Moussa, G. Burgé, F. Chemarin, R. Bounader, C. Saulou-Bérion, F. Allais, H.-E. Spinnler, V. Athès, Reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid from model aqueous solutions and real bioconversion media. Comparison with its isomer 2-hydroxypropionic (lactic) acid, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2015) 2276–2285. doi:10.1002/jctb.4813.
- [6] F. Chemarin, M. Moussa, M. Chadni, B. Pollet, P. Lieben, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, New insights in reactive extraction mechanisms of organic acids: An experimental approach for 3-hydroxypropionic acid extraction with tri-n-octylamine, *Separation and Purification Technology.* 179 (2017) 523–532. doi:10.1016/j.seppur.2017.02.018.
- [7] R. Nelson, D. Peterson, E. Karp, G. Beckham, D. Salvachúa, Mixed Carboxylic Acid Production by *Megasphaera elsdenii* from Glucose and Lignocellulosic Hydrolysate, *Fermentation.* 3 (2017) 10. doi:10.3390/fermentation3010010.
- [8] Z. Wu, S.-T. Yang, Extractive fermentation for butyric acid production from glucose by *Clostridium tyrobutyricum*, *Biotechnology and Bioengineering.* 82 (2003) 93–102. doi:10.1002/bit.10542.
- [9] V.P. Lewis, S.T. Yang, A novel extractive fermentation process for propionic acid production from whey lactose, *Biotechnology Progress.* 8 (1992) 104–110.
- [10] F. Chemarin, M. Moussa, F. Allais, V. Athès, I.C. Trelea, Mechanistic modeling and equilibrium prediction of the reactive extraction of organic acids with amines: A comparative study of two complexation-solvation models using 3-hydroxypropionic acid, *Separation and Purification Technology.* 189 (2017) 475–487. doi:10.1016/j.seppur.2017.07.083.
- [11] T.W. Abraham, E. Allen, J.J. Hahn, P. Tsobanakis, E.C. Bohnert, C.L. Frank, Recovery of 3-hydroxypropionic acid, US 2016/0060204 A1, 2014.
- [12] D.M. Adkesson, J.S. Disney, B.C. Dravis, J.M. Gaddy, W.F. Lehnhardt, J.C. Lievens, G.M. Wenndt, T.T. Ames, P. Fitzgibbon, F.G. Gallagher, others, Purification of biologically-produced 1, 3-propanediol, US 2005/0069997 A1, 2005.
- [13] J. Schulze, W. Tietz, I. Waengler, K. Kuehlein, Method for purifying carboxylic acids from fermentation broth, US 2014/0371486 A1, 2014.
- [14] A. Keshav, K.L. Wasewar, S. Chand, Extraction of propionic acid from model solutions: Effect of pH, salts, substrate, and temperature, *AIChE Journal.* 55 (2009) 1705–1711. doi:10.1002/aic.11780.
- [15] M. San-Martín, C. Pazos, J. Coca, Reactive extraction of lactic acid with alamine 336 in the presence of salts and lactose, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 54 (1992) 1–6.
- [16] B. Choudhury, A. Basha, T. Swaminathan, Study of lactic acid extraction with higher molecular weight aliphatic amines, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 72 (1998) 111–116. doi:10.1002/(SICI)1097-4660(199806)72:2<111::AID-JCTB878>3.0.CO;2-O.

- [17] G. Burgé, C. Saulou-Bérion, M. Moussa, B. Pollet, A. Flourat, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler, Diversity of *Lactobacillus reuteri* Strains in Converting Glycerol into 3-Hydroxypropionic Acid, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 177 (2015) 923–939. doi:10.1007/s12010-015-1787-8.
- [18] S.T. Yang, S.A. White, S.T. Hsu, Extraction of carboxylic acids with tertiary and quaternary amines: effect of pH, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 30 (1991) 1335–1342.
- [19] M. Puttemans, L. Dryon, D.L. Massart, Extraction of organic acids by ion-pair formation with tri-n-octylamine: Part. 1. Extraction Rate and Influence of pH and Ionic Strength, *Analytica Chimica Acta*. 161 (1984) 221–229.
- [20] M.M. Hossain, J.L. Maisuria, Effects of Organic Phase, Fermentation Media, and Operating Conditions on Lactic Acid Extraction, *Biotechnology Progress*. 24 (2008) 757–765. doi:10.1021/bp0702267.
- [21] J. Gorden, T. Zeiner, C. Brandenbusch, Reactive extraction of cis,cis-muconic acid, *Fluid Phase Equilibria*. 393 (2015) 78–84. doi:10.1016/j.fluid.2015.02.030.
- [22] R. Canari, A.M. Eyal, Effect of pH on Dicarboxylic Acids Extraction by Amine-Based Extractants, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 42 (2003) 1293–1300. doi:10.1021/ie010579p.
- [23] A.-I. Galaction, A.-C. Blaga, D. Cascaval, The influence of pH and solvent polarity on the mechanism and efficiency of folic acid extraction with amberlite LA-2, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 11 (2005) 63–68.
- [24] G. Kyuchoukov, M. Marinova, J. Molinier, J. Albet, G. Malmay, Extraction of Lactic Acid by Means of a Mixed Extractant, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 40 (2001) 5635–5639. doi:10.1021/ie010137d.
- [25] G. Burgé, F. Chemarin, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, F. Allais, H.-É. Spinnler, V. Athès, Reactive extraction of bio-based 3-hydroxypropionic acid assisted by hollow-fiber membrane contactor using TOA and Aliquat 336 in *n*-decanol, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 91 (2016) 2705–2712. doi:10.1002/jctb.4878.
- [26] L.R. Weatherley, Some Fundamental Innovations in Direct Solvent Extraction of Low Molecular Weight Biological Products, *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*. 18 (1998) 147–174. doi:10.1080/08827509808914155.
- [27] M.R. Pursell, M.A. Mendes-Tassis, D.C. Stuckey, Effect of fermentation broth and biosurfactants on mass transfer during liquid-liquid extraction, *Biotechnology and Bioengineering*. 85 (2004) 155–165. doi:10.1002/bit.10840.
- [28] M.R. Pursell, M.A. Mendes-Tassis, D.C. Stuckey, Co-Extraction during Reactive Extraction of Phenylalanine using Aliquat 336: Interfacial Mass Transfer, *Biotechnology Progress*. 19 (2003) 469–476. doi:10.1021/bp025630e.
- [29] V.B. Fainerman, E.H. Lucassen-Reynders, R. Miller, Adsorption of surfactants and proteins at fluid interfaces, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 143 (1998) 141–165.
- [30] V.S. Kislik, *Solvent extraction: classical and novel approaches*, 1st ed, Elsevier, Amsterdam ; Boston, 2012.
- [31] E. Reyhanitash, B. Zaalberg, S.R.A. Kersten, B. Schuur, Extraction of volatile fatty acids from fermented wastewater, *Separation and Purification Technology*. 161 (2016) 61–68. doi:10.1016/j.seppur.2016.01.037.
- [32] A. Schunk, G. Maurer, On the influence of some strong electrolytes on the partitioning of acetic acid to aqueous/organic two-phase systems in the presence of tri-n-octylamine, *Fluid Phase Equilibria*. 239 (2006) 223–239. doi:10.1016/j.fluid.2005.11.022.
- [33] A. Schunk, G. Maurer, On the influence of some strong electrolytes on the partitioning of acetic acid to aqueous/organic two-phase systems in the presence of tri-n-octylamine, *Fluid Phase Equilibria*. 267 (2008) 23–38. doi:10.1016/j.fluid.2008.02.011.
- [34] A. Schunk, A. Menert, G. Maurer, On the influence of some inorganic salts on the partitioning of citric acid between water and organic solutions of tri-n-octylamine, *Fluid Phase Equilibria*. 224 (2004) 55–72. doi:10.1016/j.fluid.2004.04.010.



- [35] A. Schunk, G. Maurer, On the Influence of Some Inorganic Salts on the Partitioning of Citric Acid between Water and Organic Solutions of Tri- *n* -octylamine. Part II: Toluene as Organic Solvent, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 44 (2005) 8837–8851. doi:10.1021/ie050735i.
- [36] I. Borodina, K.R. Kildegaard, N.B. Jensen, T.H. Blicher, J. Maury, S. Sherstyk, K. Schneider, P. Lamosa, M.J. Herrgård, I. Rosenstand, F. Öberg, J. Forster, J. Nielsen, Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via  $\beta$ -alanine, *Metabolic Engineering*. 27 (2015) 57–64. doi:10.1016/j.ymben.2014.10.003.
- [37] K.R. Kildegaard, N.B. Jensen, K. Schneider, E. Czarnotta, E. Özdemir, T. Klein, J. Maury, B.E. Ebert, H.B. Christensen, Y. Chen, I.-K. Kim, M.J. Herrgård, L.M. Blank, J. Forster, J. Nielsen, I. Borodina, Engineering and systems-level analysis of *Saccharomyces cerevisiae* for production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA reductase-dependent pathway, *Microbial Cell Factories*. 15 (2016). doi:10.1186/s12934-016-0451-5.
- [38] M.-T. Gao, T. Shimamura, N. Ishida, H. Takahashi, Application of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* to extractive lactic acid fermentation, *Biochemical Engineering Journal*. 44 (2009) 251–255. doi:10.1016/j.bej.2009.01.001.
- [39] J. Li, H. Zong, B. Zhuge, X. Lu, H. Fang, J. Sun, Immobilization of *Acetobacter* sp. CGMCC 8142 for efficient biocatalysis of 1,3-propanediol to 3-hydroxypropionic acid, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 21 (2016) 523–530. doi:10.1007/s12257-016-0022-y.
- [40] L. Zhao, J. Lin, H. Wang, J. Xie, D. Wei, Development of a two-step process for production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol using *Klebsiella pneumoniae* and *Gluconobacter oxydans*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 38 (2015) 2487–2495. doi:10.1007/s00449-015-1486-4.
- [41] M. Matsumoto, M. Shibasaki, K. Kondo, Salting-out Extraction of 3-Hydroxypropionic Acid with Reactive Extraction and Aqueous Two-phase Systems, *Solvent Extraction Research and Development*. 24 (2017) 141–147.
- [42] M. Puttemans, L. Dryon, D.L. Massart, Extraction of organic acids by ion-pair formation with tri-*n*-octylamine: Part 2. Back-extraction, *Analytica Chimica Acta*. 161 (1984) 381–386.
- [43] A. Kent Wright, M.R. Thompson, Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence, *Biophysical Journal*. 15 (1975) 137–141. doi:10.1016/S0006-3495(75)85797-3.

## 6. Principaux résultats et remarques supplémentaires

- L'augmentation de la concentration en acide a un impact négatif sur la cinétique d'extraction. Une extraction avec une concentration initiale en acide plus élevée mettra alors plus de temps à atteindre l'équilibre. Ceci est dû au fait qu'il s'agit d'une extraction réactive. En effet, si l'extraction était le résultat d'un partage physique simple, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre ne devrait pas dépendre de la concentration car sur la plage de concentrations considérée ici (0,5 – 10 g/L), le coefficient de partage de l'acide est constant (CF Chapitre I 3.4.2.). Ceci rejoint les résultats des démonstrations théoriques fournies en fin de chapitre I (partie 3.4.3.) où l'on montrait sur un cas simple que la résistance au transfert augmentait avec la concentration en acide.
- Conformément à ce qui était attendu, la hausse du pH initial induit une forte diminution de rendement d'extraction à cause de la diminution de la présence de l'acide sous forme protonnée.
- La présence de sels impacte grandement les rendements d'extraction et nous avons montré que ceci était dû à une réaction d'échange d'ions entre l'anion du sel et l'ion carboxylate du 3-HP présent dans le complexe. Le résultat est donc l'extraction de l'anion et le relargage du 3-HP sous forme dissociée dans la phase aqueuse, ce qui augmente le pH. L'avancement de cette réaction d'échange d'ions dépend de la concentration en sels et de la nature de l'anion du sel.
- A la concentration considérée (8 mg/L), la présence de protéine n'a montré aucune influence sur le rendement ou la cinétique d'extraction probablement parce que la forte résistance de la membrane cache les autres résistances potentielles à l'interface dues à l'adsorption des protéines.

Maintenant que les mécanismes d'extraction réactive et d'interactions potentielles avec les milieux biologiques complexes ont été identifiés et quantifiés, il est essentiel de pouvoir récupérer le 3-HP de la phase organique après l'avoir extrait. Cette étape, limitante à cause de la forte affinité entre l'acide et l'amine, est souvent pointée du doigt comme la principale critique à l'encontre de l'extraction réactive comme méthode de séparation. L'article suivant teste plusieurs méthodes et évalue leur efficacité sur le cas du 3-HP.

## Publication n°4

### Récupération de l'acide 3-hydroxypropionique à partir de phases organiques chargées après extraction réactive par des amines tertiaires dans un solvant de type alcool

L'extraction réactive est une méthode bien connue de récupération d'acides organiques à partir d'effluents aqueux relativement dilués. L'étape d'extraction de l'acide en phase organique est suivie par une étape de dés extraction dans une phase aqueuse. La forte affinité de ces acides pour le système d'extraction rend souvent leur dés extraction limitante dans le procédé. La dés extraction de l'acide 3-hydroxypropionique à partir d'une phase organique chargée après extraction réactive est traitée dans ce papier. La phase organique est constituée par de la tri-*n*-octylamine diluée dans le *n*-décanol. Trois méthodes de dés extraction ont été utilisées : l'addition de sels neutres ou basiques, la modulation de solvant et la modulation de température. L'utilisation de NaCl en proportions stœchiométriques a conduit à un assez fort rendement de dés extraction (80%) mais plusieurs désavantages ont été soulevés comme le fait que la phase organique se retrouve chargée en ions chlorures. NaOH a conduit à la récupération complète du 3-HP et à la régénération de l'amine en utilisant des proportions stœchiométriques mais le 3-HP est obtenu sous forme de sel de sodium. La mise en œuvre en contacteur membranaire a montré que la cinétique de dés extraction par NaOH était beaucoup plus lente que la cinétique d'extraction. La modulation de solvant a alors été testée en utilisant le *n*-hexane comme contre-solvant en le mélangeant à la phase d'extraction avant contact avec une phase aqueuse fraîche. L'influence du ratio de volumes aqueux/organique et de la fraction volumique d'hexane dans la phase organique a été étudiée. Les résultats ont montré qu'une augmentation de la teneur en hexane de 20 à 60%v/v pouvait conduire à la récupération de 70% du 3-HP pour un ratio volumique aqueux/organique de 1. Cependant, le 3-HP récupéré en phase aqueuse était dilué 3,6 fois en comparaison de sa concentration initiale dans le mélange TOA/décanol. L'influence de la température sur l'efficacité d'extraction a été testée entre 4 et 140°C. L'augmentation de la température augmente le partage physique du 3-HP entre les deux phases alors qu'elle était néfaste à l'extraction réactive. Une étude de la thermo chimie de la formation du complexe acide-amine est fournie. La réaction de complexation a été démontrée être exothermique avec une chaleur apparente de réaction de -25,3 kJ/mol. Cet effet négatif de la température peut être utilisé pour inverser la réaction de complexation et dés extraire le 3-HP en phase aqueuse. A 140°C, 78% du 3-HP a pu être récupéré avec un ratio de volume de 1 en une seule étape, ce qui est inhabituellement haut pour un alcool aliphatique comme solvant. Toutes ces méthodes et les combinaisons qui s'en suivent peuvent alors être utilisées dans un procédé de récupération efficace et des données valorisables sont fournies.

## Recovery of 3-hydroxypropionic acid from loaded organic phases after reactive extraction with tertiary amines in an alcohol-type solvent

F. Chemarin<sup>a,b</sup>, M. Moussa<sup>b\*</sup>, F. Allais<sup>b</sup>, I.C. Trelea<sup>b</sup>, V. Athès<sup>b</sup>

<sup>a</sup> AgroParisTech, Chaire Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI), Centre Européen de Biotechnologie et Bioéconomie (CEBB), 3 Rue des Rouges Terres, F-51110 Pomacle, France

<sup>b</sup> UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, F-78850, Thiverval-Grignon, France

\* Corresponding author: marwen.moussa@agroparistech.fr

### Abstract:

Reactive extraction is a well-known method for the recovery of organic acids from dilute streams. The extraction step of the acid into an organic phase is followed by its back extraction into an aqueous phase. The high affinity of these acids for the extracting systems makes their back-extraction often a limiting step. The back-extraction of 3-hydroxypropionic acid from a loaded organic phase after reactive extraction is addressed in this paper. The organic phase consisted in tri-*n*-octylamine diluted in *n*-decanol. Three back-extraction methods were used: neutral or basic salts additions, diluent swing and temperature swing. The use of NaCl in stoichiometric proportions led to a high 3-HP recovery yield (80%) but several disadvantages were raised like the loading of the organic phase with chloride ions. NaOH led to a complete 3-HP recovery and amine regeneration using stoichiometric proportions but 3-HP is obtained as its sodium salt. An implementation in a membrane contactor proved the back-extraction kinetics to be much slower than the extraction kinetics. Diluent swing were then tested using *n*-hexane as the counter-solvent in mixture with decanol introduced in the recovery water. The influence of the aqueous/organic volume ratio and the *n*-hexane volume fraction in the organic phase were studied. Results showed that increasing the *n*-hexane content between 20 to 60%v/v led to an increase of 3-HP recovery up to 70% for an aqueous/organic volume ratio of 1. However, the 3-HP recovered in the aqueous phase was 3.6 times diluted when compared to its initial concentration in the decanol/TOA mixture. The influence of temperature on the extraction efficiency was tested between 4 and 140°C. The increase of temperature increased the physical partitioning of 3-HP between the two phases while it was detrimental for the reactive extraction. A study of the thermochemistry of the acid-amine complex formation is provided. The overall complexation reaction was found to be exothermic with an apparent heat of reaction of -25.3 kJ/mol. This negative impact of temperature can be used to reverse the complexation and back-extract 3-HP in the aqueous phase. At 140°C, around 78% of 3-HP can be recovered with a volume ratio of 1 in a single step, which is unusually high for an alcohol as the solvent. All these methods and combinations thereof can be used in an efficient recovery process and valuable data are provided for further design and evaluation.

Keywords: back-extraction, pH swing, diluent swing, temperature swing, trioctylamine

## 1. Introduction

3-hydroxypropionic acid is a hydrophilic organic acid that recently raised interest for the production of bio-based acrylate derivatives and polyesters [1]. It can be produced through the bioconversion of biomass-derived compounds like glucose and glycerol [2]. However, the resulting bioconversion broth can be quite diluted in 3-HP and contains water soluble impurities. Reactive extraction is known as an efficient technique to selectively recover small organic acids from dilute aqueous phases [3]. In reactive extraction, the high selectivity and recovery yield is due to specific reactions involving a hydrophobic extractant dissolved in an organic phase and the acid present in the aqueous phase. The reactions lead to hydrophobic complexes formation that are soluble in the organic phase. In the case of 3-HP, an organic phase made of 20%v/v tri-*n*-octylamine (TOA) in *n*-decanol has been proved successful for the acid removal from dilute aqueous media (~1 g/L) [4–6]. Other extracting systems have been tested like TOA in other alcohols [4,7] or tributyl phosphate in heptane [7] but the latter was not very efficient.

The reactive mechanism of 3-HP extraction by TOA in *n*-decanol is a favorable acid-base interaction that leads to the formation of an ion pair in the organic phase where 3-HP loses its acidic proton [8] according to the following reaction:



Acid-amine complexes in organic phases are rather stable and the back-extraction of the acid into an aqueous phase can be relatively challenging. Several methods have been suggested in the literature for the back-extraction of organic acids from tertiary amines extracting systems: neutral salt addition, acid displacement and distillation, pH-swing (using basic salts or water soluble amines), temperature swing and diluent swing.

The addition of neutral salts is mostly used for the stripping and regeneration of organic phases when the extractant used is a quaternary ammonium like trioctylmethylammonium chloride [9] or Aliquat 336 [10] in an anion-exchange mode. However, it can also be used for tertiary amines. In an organic phase consisting in TOA diluted in chloroform, Puttemans et al [11] found that the back-extraction efficiency depended on the nature of the acid and on the concentration and type of anion of the sodium salts in the following order: perchlorate ( $ClO_4^-$ ) > iodide ( $I^-$ ) > bromide ( $Br^-$ ) > chloride ( $Cl^-$ ). The salt is needed in large excess for a near complete recovery [11].

An original method is the displacement of the target acid from the organic phase to the aqueous phase by the use of another acid that has a better affinity for the extracting system. In this method, an aqueous phase loaded with such an acid in over stoichiometry is used. For example, the use of hydrochloric acid in excess led to the recovery of 83% of the lactic acid present in an organic phase

made of 30% Alamine 336 in oleyl alcohol [12]. In fact, hydrochloric acid is preferably extracted when compared to lactic acid and the extraction of HCl leads to the release of lactic acid under its non-dissociated form in the aqueous phase. The yield of recovery of lactic acid depends on the concentration of HCl. This latter needs to be set at the optimal level in order to prevent the presence of residual HCl in the back extraction aqueous phase. For an important recovery, HCl has to saturate the amine and in this case a substantial quantity of HCl remains in water in mixture with lactic acid. Using less HCl can lead to its complete extraction in the organic phase with no remaining amount in water, but the recovery of lactic acid is lower in this case. The amine loaded with HCl could be regenerated by distilling off HCl. Acetic acid can also be used for this displacement method [13] and then it can be removed and recovered from the amine-containing organic phase by simple distillation [14].

A widely reported method for the recovery of organic acids from loaded organic phases is the use of basic water soluble compounds like sodium hydroxide and carbonate (strong base mineral compounds) or trimethylamine (TMA, a weak base organic compounds) [13,15–17]. In aqueous phase, these compounds impose a high pH that induces the release of the acid under its dissociated form. TMA or *n*-propylamine used in near stoichiometric amounts have been reported to be very efficient, giving a total acid recovery [13,18]. However, the process needs to be cautiously operated because such amines, if added in excess, can be extracted, at least in part, in the organic phase [13]. The recovery of the non-dissociated acid is made through the thermal decomposition of the ammonium salt thanks to the high volatility of the amine [13,18]. For instance, 99% of TMA could be removed from a mixture containing 0.25 mol/L lactic acid and TMA in water under reduced pressure (200 mbar) and heating (120°C) [19].

The temperature swing method relies on the thermal reversibility of the acid-amine complexation reaction [20]. Increasing the temperature of the organic phase in the presence of an aqueous phase can lead to the dissociation of the complex into its two components: the acid in the aqueous phase and the amine in the organic phase. Therefore, heating a loaded organic phase in contact with an aqueous phase can lead to some back-extraction. This method is very interesting since it does not need the addition of any chemicals and allows the recovery of the protonated acid [15,20–24].

The diluent swing method consists in adding a poorly solvating diluent, called here “counter solvent”, to the organic phase of extraction [20]. It is well known that reactive extraction efficiency depends on the solvating properties of the diluent with alcohols being regularly the best solvents. If the so-called counter solvent is added to a loaded organic phase, then the resulting phase will have lower extraction ability [25,26] and reject the acid in the aqueous phase, leading to a back-extraction effect [15,20].

This organic phase can then be regenerated, for example by distilling off the bad solvent (if more volatile) which is then recycled [20].

3-HP is a relatively recent subject of interest and only few studies dealt with its reactive extraction and none on its back-extraction. In our previous publications, we presented results concerning 3-HP reactive extraction and its mechanisms. This work is the first experimental study concerning 3-HP back-extraction. This paper addresses the back-extraction of 3-hydroxypropionic acid from loaded organic phases of 20%v/v TOA in *n*-decanol focusing on neutral and basic salts addition, diluent swing and temperature swing. The mechanisms involved are discussed regarding process considerations and data extrapolation. In the case of sodium hydroxide, an example is provided where the back-extraction is performed with a membrane contactor.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Chemicals

Organic phases were made of *n*-decanol (99% purity) and tri-*n*-octylamine (98% purity) from Sigma-Aldrich (USA). For some experiments, *n*-hexane (>98% purity, Fischer, USA) was added. 3-hydroxypropionic acid was purchased in 30%wt solution in water (TCI Europe, Belgium). Saline solutions consisted in sodium chloride (NaCl, 100% purity), sodium hydroxide (NaOH, >99% purity) and sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, >99% purity) from VWR (USA).

### 2.2. Experiments

All organic phases were initially made of 20%v/v TOA in decanol. Organic phases were first loaded with 3-HP by reactive liquid-liquid extractions as described previously [4], they are accordingly saturated with water. Back-extraction of such loaded organic phases was performed using salt addition, diluent swing and temperature swing.

#### *2.2.1. Back-extraction using salts additions*

**Equilibrium study using tests in tubes:** Ten mL of an aqueous phase containing the salt were mixed into a centrifuge tube with an equal volume of organic phase loaded with 3-HP (1 g/L). The centrifuge tube was then manually shaken for 3 minutes and let stand for a night at 25°C before being manually shaken again for 3 minutes and centrifuged at 15 557g for 20 minutes.

**Kinetics study using membrane contactor:** An example of back-extraction with NaOH in stoichiometric proportion using an organic phase loaded with 3-HP (8g/L) was performed using a LiquiCel 2.5x8 X50 membrane contactor and the back-extraction kinetics was compared to the extraction one. The operating conditions used in this experiment have been described in a previous publication [27].

### 2.2.2. Diluent swing back-extraction

Hexane was used as the counter solvent. It was added to organic phases loaded with 3-HP (4.4 g/L) in order to represent 20, 40 and 60% of the final volume. 10 mL of the resulting organic phases were obtained in centrifuge tubes. A diffuse white cloud immediately appeared due to a small fraction of soluble water that is now rejected from the organic phase because of the presence of hexane and ultrapure water was added into each tube. Three aqueous/organic volume ratios were used: a ratio where the water volume corresponds to the half of the organic phase without hexane (ratio 1), a ratio where the water volume was equal to the one of the organic phase without hexane (ratio 2) and a ratio where the water volume was equal to the one of the final organic phase containing hexane (ratio 3). The tubes were then manually shaken for 3 minutes and let stand for a night at 25°C. They were then manually shaken again for 3 minutes and centrifuged at 15 557g for 10 minutes.

Table IV-1: summary of volumes introduced into each tube for different hexane contents and aqueous/organic volume ratios

20% <i>n</i> -hexane	Ratio 1	Ratio 2	Ratio 3
TOA/decanol with 3-HP	8 mL	8 mL	8 mL
<i>n</i> -hexane	2 mL	2 mL	2 mL
water	4 mL	8 mL	10 mL
40%v/v <i>n</i> -hexane	Ratio 1	Ratio 2	Ratio 3
TOA/decanol with 3-HP	6 mL	6 mL	6 mL
<i>n</i> -hexane	4 mL	4 mL	4 mL
water	3 mL	6 mL	10 mL
60%v/v <i>n</i> -hexane	Ratio 1	Ratio 2	Ratio 3
TOA/decanol with 3-HP	4 mL	4 mL	4 mL
<i>n</i> -hexane	6 mL	6 mL	6 mL
water	2 mL	4 mL	10 mL

### 2.2.3. Temperature swing back-extraction

Aqueous solutions containing 3-HP at 6, 11, 16, 21 and 26 g/L were made. 3-HP extraction was performed at 4, 37, 60, 90 and 140°C. 8 mL of each aqueous phase were placed in centrifuge tubes containing 8 mL of organic phase not loaded with 3-HP. The tubes were then placed to equilibrate at 4°C in a cold-storage chamber for 30 min and then shaken and placed back for an hour at 4°C. The tubes were then centrifuged at 4°C before sampling 1 mL of the organic phase and 1 mL of the aqueous phase for analysis. After that, the tubes were shaken and placed in a laboratory oven set to 37°C for 30 min, shaken again and let to equilibrate for an hour at 37°C before centrifugation for 10 minutes at 37°C. Samples of 1 mL were then taken from the organic and aqueous phases for analysis. Similar procedures were performed for 60 and 90°C. The temperature was checked before each sampling. For the extraction at 140°C, the procedure was different. New 3-HP solutions were used (5, 10, 14 and 19



g/L) and 8 mL of each solution were placed in centrifuge tubes containing 8 mL of a fresh organic phase. The tubes were shaken and placed in a bath of heat transfer oil regulated at 140°C for 10 min, and then shaken again and placed back. After 1h, the tubes were directly quenched in melting ice and an aqueous sample were immediately taken at the bottom of the tube using a syringe.

### 2.3. Parameters definition

The recovery yield (Y) represents the proportion of acid back-extracted from the organic phase. As the phase volume ratios are observed to be constant during experiments, the recovery yield was calculated as follows:

$$Y = \frac{[AH_{aq,TOT}]^{eq}}{[AH_{org,TOT}]^{ini}}$$

Where  $[AH_{aq,TOT}]^{eq}$  is the total acid concentration under all forms in the aqueous phase at equilibrium and  $[AH_{org,TOT}]^{ini}$  is the total acid concentration under all forms in the organic phase initially.

In order to discriminate the effect of temperature between physical (i.e. without TOA) and reactive extraction, some extractions were performed using an organic phase only made of decanol. The partition coefficient (m) for each temperature is defined as the slope of the linear regression plot of the organic equilibrium concentrations against the aqueous equilibrium concentrations and ultimately is defined as follows:

$$m = \frac{[AH_{org}]^{eq}}{[AH_{aq}]^{eq}}$$

Where  $[AH_{org}]^{eq}$  is the concentration of the free protonated acid in the organic phase at equilibrium and  $[AH_{aq}]^{eq}$  the concentration of the free protonated acid in the aqueous phase at equilibrium.

The complexation equilibrium constant between TOA and 3-HP is defined by the following ratio:

$$K_{11} = \frac{[(TOAH^+, A^-)_{org}]^{eq}}{[AH_{aq}]^{eq} [TOA_{org}]^{eq}}$$

Where  $[(TOAH^+, A^-)_{org}]^{eq}$  is the acid-amine complex concentration in the organic phase at equilibrium and  $[TOA_{org}]^{eq}$  the TOA concentration in the organic phase at equilibrium.

The kinetics in membrane contactor were evaluated using the  $t_{63\%}$ , the time needed to reach 63% of the total extracted or back-extracted 3-HP. This parameter was determined graphically, referring at the curves shape, showing an empirical first order. In that case,  $t_{63\%}$  would correspond to a time constant.

## 2.4. Analytical methods

3-HP concentrations in aqueous phases were determined with high performance liquid chromatography (HPLC) using a method detailed previously. The amount of 3-HP in the organic phase was first determined by mass balance knowing the amount of 3-HP introduced in extractions dedicated to the loading of organic phases. Then, in the light of the results of section 3.1., back-extraction using NaOH solutions were used and these solutions were analyzed using HPLC. The validity of this method with back-extraction will be checked in the results section.

Experiments were mostly performed in duplicate.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Back-extraction using salts addition

#### 3.1.1. Equilibrium study

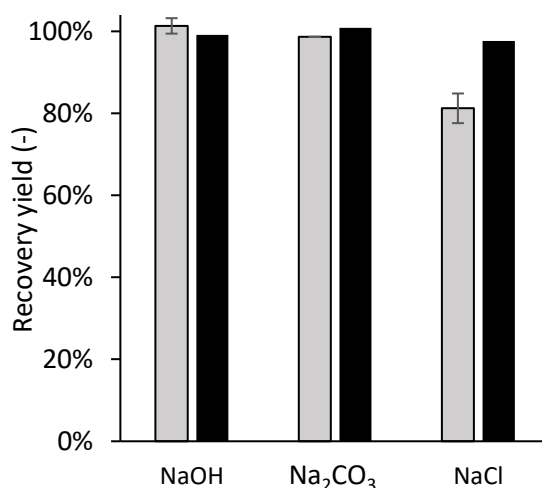
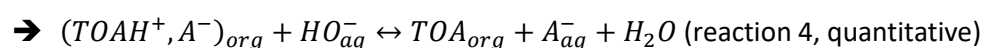
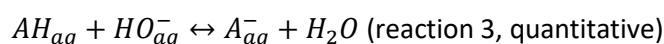
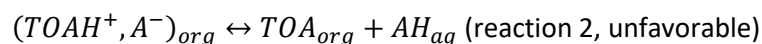


Figure IV-1: Recovery yields for back-extraction experiments using salts in stoichiometric proportions (■) or 20-fold excess of salt (■) at 25°C for 1 g/L of 3-HP initially in the organic phase

Two basic salts (NaOH and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) and one neutral salt (NaCl) were tested. Two concentration levels were tested for each salt: stoichiometric concentration according to the 3-HP amount in the organic phase and 20-fold excess. Note that for Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, the stoichiometric condition means half the amount of 3-HP because of its dibasic property ( $[Na_2CO_3] < [AH]$ ).

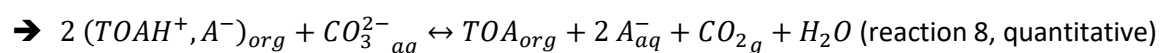
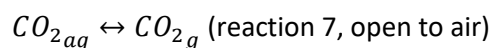
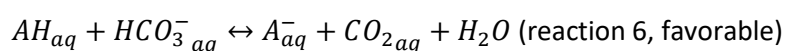
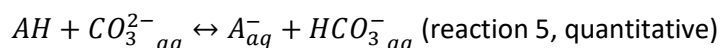
Figure IV-1 shows that for all the salts, it has been possible to recover nearly all the 3-HP present initially in the organic phase ( $\geq 98\%$ ) depending on the salt concentration. For NaOH and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, stoichiometric proportions were enough to reach this recovery yield, while for NaCl an excess stoichiometry was necessary. For the basic salts, a quantitative reaction of neutralization takes place

given the  $pK_A$  difference between 3-HP ( $pK_A^{3-HP} = 4.5$ ) and the basic salts ( $pK_A^{H_2O/HO^-} = 14$ ,  $pK_A^{CO_2, H_2O/HCO_3^-} = 6.4$ ,  $pK_A^{HCO_3^-/CO_3^{2-}} = 10.3$ ) leading to quantitative 3-HP recovery in stoichiometric proportions as the dissociated form of 3-HP is not soluble in the organic phase. The overall reactions can be written as follows in the case of NaOH:



According to this mechanism the amine extractant is regenerated and can be recycled. Since reaction 4 is quantitative with a 100% recovery, back-extraction using NaOH can be used to determine the amount of 3-HP in the organic phase, validating this method for further analyses.

In the case of  $Na_2CO_3$ , the overall reactions can be written as follows:



This mechanism is supported by the gas release observed when the lid was opened after reaching equilibrium due to  $CO_2$  degassing from water. The release of  $CO_2$  makes it possible to regenerate the amine extractant in the organic phase allowing the organic phase to be recycled, as seen for NaOH. However, the acid is recovered under its sodium salt form. Moreover, a washing of the organic phase after the back-extraction may be necessary to remove traces of the inorganic base. A simplified process diagram is proposed in Figure IV-2 for illustration purposes in the case of back-extraction using sodium hydroxide.

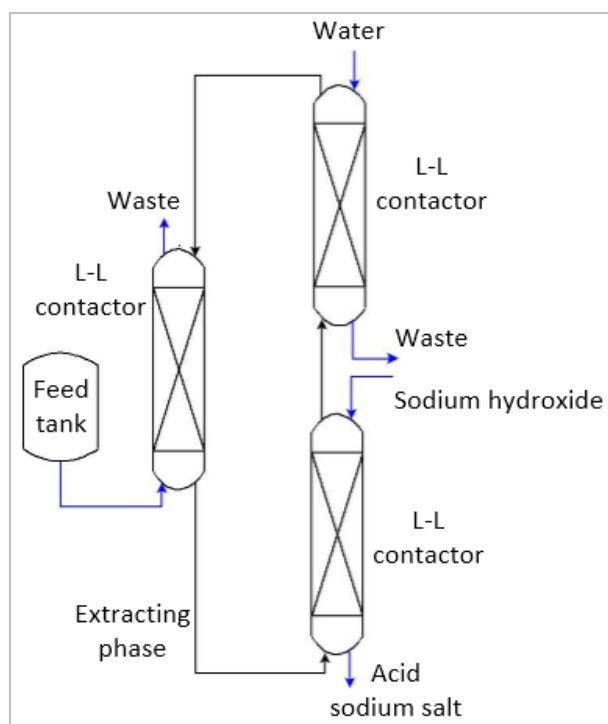
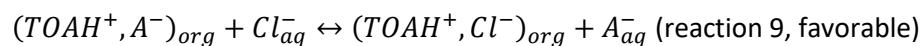


Figure IV-2: Simplified process diagram of extraction and back-extraction using sodium hydroxide

When sodium chloride is used, a quantity similar to the one of 3-HP in the organic phase is not enough to entirely back-extract the 3-HP ( $Y=80\%$ , Figure IV-1). Indeed, the mechanism involved in this case is an anion exchange reaction as demonstrated in our previous publication [27] (reaction 9).



Such reactions are governed by chemical equilibria, which means that an excess of reactant is necessary to reach a complete conversion [11]. Besides this drawback, using neutral salts does not regenerate the amine which stays protonated, i.e. unable to bind again to acids. Moreover, the acid is recovered under its deprotonated form. Then, neutral salts are not advised for further use.

### 3.1.2. Study of back-extraction kinetics in a membrane contactor using NaOH

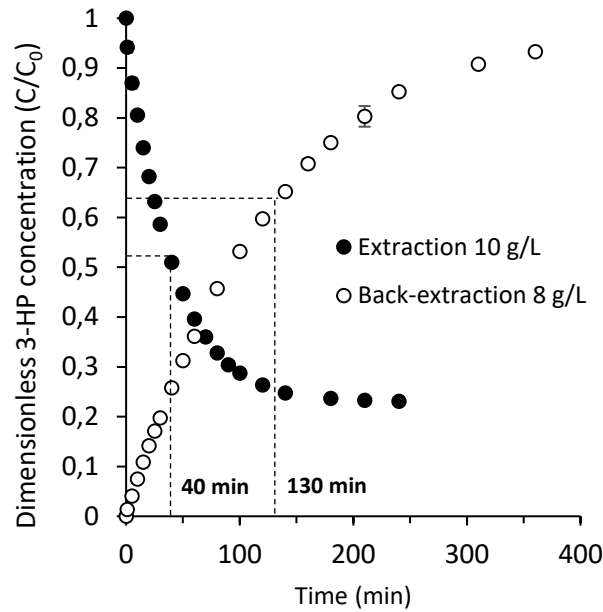


Figure IV-3: Evolution of 3-HP concentration in the aqueous phase during extraction and back-extraction (10 g/L 3-HP in the aqueous phase and 8 g/L 3-HP in the organic phase initially for extraction and back-extraction respectively)

Aqueous solution of NaOH in stoichiometric proportion was used for the membrane-based back-extraction of 3-HP from an organic phase composed of 20% TOA in decanol. The evolution of 3-HP concentration in the back-extraction aqueous phase is plotted against time in figure IV-3 (open circles). For the sake of comparison, the evolution of 3-HP concentration for the case of a forward extraction from the aqueous to the organic phase is also plotted on the same figure (filled circles). It can be seen that back-extraction tends to be complete within 6h while the forward extraction reaches equilibrium within 3-4h. Accordingly, the back-extraction kinetics is much slower than the extraction one, as shown by the time needed to reach 63% of the equilibrium value: 40 min for extraction, 130 min for back-extraction. This behavior is somehow unexpected as the back-extraction yield is total, higher than the extraction yield (77%). Indeed, it should be reminded that most of the mass transfer resistance is expected to be located in the organic phase and in particular in the membrane pores filled with the organic phase much more viscous than the aqueous phase. Here are the usual expression of the mass flux in the membrane pores expressed with a mass transfer coefficient ( $k$ ), a surface area ( $S$ ) and a driving force (concentration difference) in the case of the forward and back extraction:

$$J_{FE} = k \cdot S \cdot (C_{int}^{FE} - C_{org}^{FE}) \text{ for the forward extraction}$$

$$J_{BE} = k \cdot S \cdot (C_{org}^{BE} - C_{int}^{BE}) \text{ for the back extraction}$$

In the case of forward extraction, organic interfacial concentration of 3-HP can be high due to favorable complexation equilibrium while in the bulk the initial concentration is 0 so that the maximum driving force can be high. Conversely, for the back-extraction, the organic interfacial concentration is close to 0 as the reaction between 3-HP and hydroxide ions is total. The maximum driving force is then limited to the initial concentration of 3-HP in the organic phase and then we have  $|C_{int}^{FE} - C_{org}^{FE}| > |C_{org}^{BE} - C_{int}^{BE}|$ . This explains why back-extraction is so slow compared to the extraction. Such a behavior should be taken into consideration for an optimized design of continuous processes including integrated forward and back-extraction steps.

### 3.2. Back-extraction using diluent swing

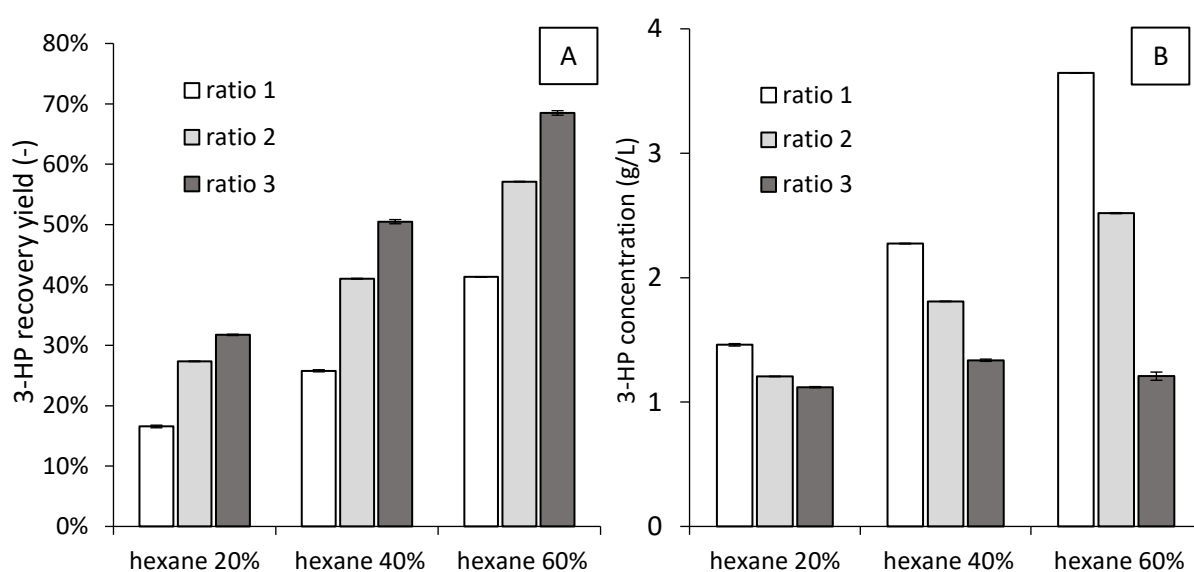


Figure IV-4: recovery yield (A) and 3-HP concentration in the recovery phase (B) after diluent swing back-extraction as a function of the volume fractions of hexane and aqueous/organic volume ratios.

Hexane was used for diluent swing as it is known to have poor extraction ability towards 3-HP with TOA [4]. Another interesting fact about hexane is its high volatility and easy regeneration by distillation. Nine experimental conditions were tested varying both the hexane content and the volume ratio between the organic and the aqueous phase of back-extraction. Results are shown in figure IV-4. For a given volume ratio, it can be seen that increasing the amount of hexane increases the back-extraction yield, as the ability of the organic phase to stabilize the 3-HP-TOA complex is compromised. Then, 3-HP is more rejected into the back-extraction aqueous phase. Concerning the volume ratio, increasing the volume of water (ratio 3 vs ratio 1) increases the recovery yield but decreases the final 3-HP concentration in the aqueous phase. For example, for 60%v/v hexane, ratio 1 (lowest aqueous/organic ratio, see section 2.2.2.) leads to a concentration in the recovery phase corresponding to 83% of that in the initial organic phase (4.4 g/L) but the recovery yield is only 41%. Conversely, the ratio 3 (highest aqueous/organic ratio) leads to a concentration in the recovery phase corresponding to 28% of that in

the initial organic phase but the recovery yield is quite high at almost 70%. In comparison, diluent swing with a TOA/decanol/hexane mixture has been reported to be much less efficient for propionic acid [15]. Addition of 50%v/v hexane using ratio 3 for back-extraction resulted in only 8-9% of propionic acid recovery. This is probably due to the much higher hydrophobicity of propionic acid compared to 3-HP due to the absence of the hydroxyl group, making it less sensitive to the solvent mixture polarity. Hexane is a volatile solvent (low boiling point and molar heat of vaporization) and accordingly can easily be distilled off from the organic phase at rather low temperature. For example, the bubble point of mixtures containing 20 to 60%v/v hexane in TOA/decanol is predicted to range roughly between 120 and 80°C, with a vapor phase made of more than 99%mol hexane (UNIFAC 1993 calculation, data not shown). A simplified flow diagram of the process is presented in Figure IV-5.

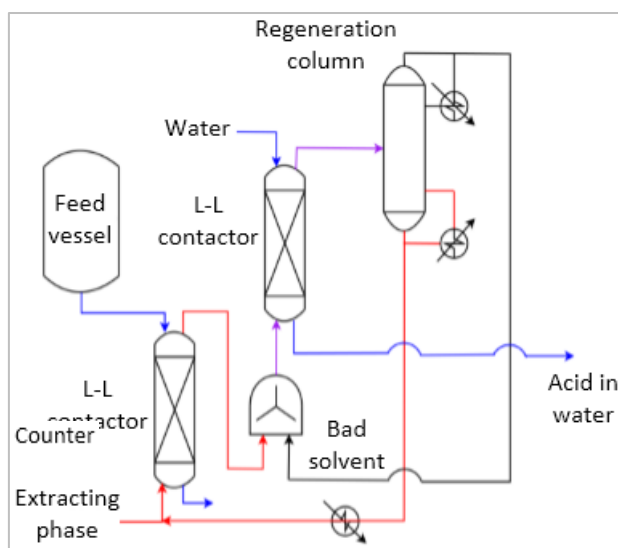


Figure IV-5: Simplified process diagram of extraction and back-extraction using diluent swing with a volatile counter solvent such as hexane.

### 3.3. Back-extraction using temperature swing

Temperature swing states that, after extraction, the acid is recovered in the aqueous phase upon heating. It is meant to take advantage of the complexation reaction reversibility upon heating. In order to evaluate the extent of this phenomenon, we first studied the influence of temperature on the extraction efficiency. Figure IV-6 shows the extraction yields as a function of the initial 3-HP concentration and extraction temperature.

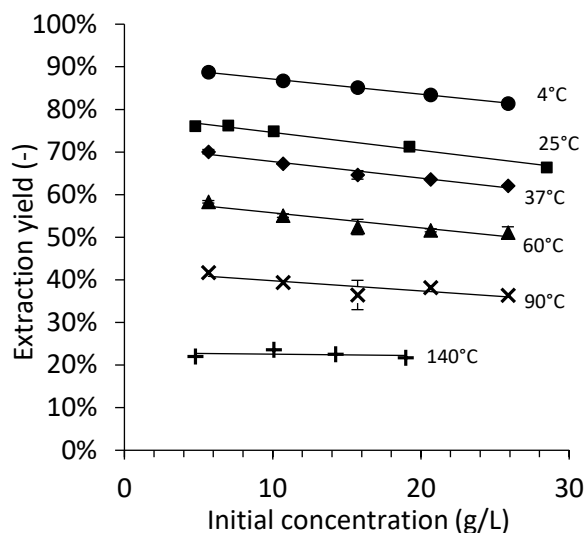


Figure IV-6: extraction yield as a function of the initial 3-HP concentration in the aqueous phase and extraction temperature (solid lines for clarity purpose only)

It can be seen from figure IV-6 that the extraction yield strongly depends on temperature. For the same acid concentrations the higher the temperature, the lower the yield. For example, for 5-6 g/L of initial acid concentration, the extraction yield drops from 89 to 22% between 4 and 140°C. At 90°C for example, the extraction yield is only about 40% meaning that the back-extraction would yield around 60%. These results are beyond what has been reported for propionic acid at 90°C (25-35%) [15] or lactic acid at 80°C (32%) [25] with TOA in decanol as the organic phase. The effect of temperature was also studied in the case of physical extraction, i.e. with only decanol in the organic phase, showing that the extraction yield increases with temperature (ranging from 2 to 6% between 25 and 90°C; data not shown).

The overall thermodynamic pathway for the global transfer reaction phenomenon can be summarized as follows [20]: (i) heating or cooling the reacting species in solution from their actual temperature at their equilibrium concentration to 25°C (standard state), (ii) eliminating interactions between those species (heat of mixing) in order to consider pure reactants (standard state), (iii) reaction of the pure species at 25°C to form pure products (heat of reaction), (iv) mixing of all the species back together in solution (heat of mixing) at their equilibrium concentrations, (v) heating or cooling the solution from 25°C to their actual temperature. Steps (ii) and (iv) represent non-idealities in composition change and steps (i) and (v) non-idealities in temperature change due to variations in physicochemical interactions, i.e. in species activity. As we do not discriminate between all these phenomena, the thermodynamic properties for the global extraction are called apparent.

Based on our previous results, we know that the complexation product, which is insoluble in the aqueous phase, is formed in the organic phase thanks to diluent solvation in particular through dipolar interactions and H-bonding [4]. When the temperature increases, the dielectric constant of *n*-alcohols



decreases as well [28,29] (from 8.1 to 6.0 between 20 and 60°C for *n*-decanol, from 14.1 to 5.8 between 0 and 100°C for *n*-heptanol [30]). This indicates a decrease in their bulk polarity and a weaker H-bonding effects. Increasing temperature increases the thermal energy and randomness, reducing dipole organizations and the stabilizing effects of H-bonds which may break more easily [28,31]. This explains why the overall reactive extraction yield decreases strongly with the increase of temperature and it can be described as it follows.

First, we have to consider that the acid exists in the organic phase under two forms and that the transfer from the aqueous to the organic phase is made through 2 main mechanisms: (1) a physical transfer due to the acid solubility in the solvent and (2) a chemical transfer due to the complexation reaction with TOA in the organic phase. To discriminate between these two mechanisms, the physical extraction is treated first. For that, a series of extractions were performed at different temperature levels to determine the temperature dependence of the physical partition of 3-HP between water and *n*-decanol.

From the Van't Hoff equation and assuming that the global apparent enthalpy and entropy changes of reaction are constant over the temperature range tested, the following linear form can be derived:

$$\ln(m) = -\frac{\Delta_r H}{RT} + \frac{\Delta_r S}{R}$$

Where  $\Delta_r H$  is the apparent molar enthalpy change of reaction (also called heat of reaction),  $\Delta_r S$  is the molar entropy change of reaction, R is the ideal gas constant and T is temperature.

The corresponding linear regression for the partition coefficient *m* is provided in the following Van't Hoff plot (figure IV-7), allowing to deduce the related thermochemical parameters.

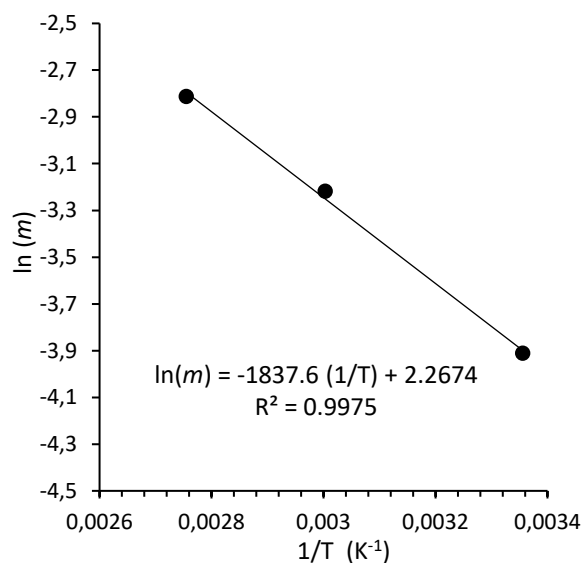


Figure IV-7: Van't Hoff plot of the physical partition coefficient (*m*) of 3-HP between water and decanol

The 3-HP transfer from water to *n*-decanol causes an apparent enthalpy change of 15.3 kJ.mol<sup>-1</sup> and an apparent entropy change of 18.9 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>. This positive enthalpy change indicates the transfer is not energetically favorable, probably due to the lesser extent of solvation of 3-HP by *n*-decanol than water. The entropy change is also positive which can be explained by the fact that 3-HP is partitioned in a greater volume with more physical states of solvation. Accordingly, the physical transfer is an entropy-driven process with less stable 3-HP in the organic phase.

As the variation of physical extraction with temperature is known, it is then possible to consider the temperature dependence of chemical extraction. . Thus, the complexation constant was determined (taking into account the variation of the physical extraction) from the results of Figure IV-6. The corresponding Van't Hoff plot is given in Figure IV-8.

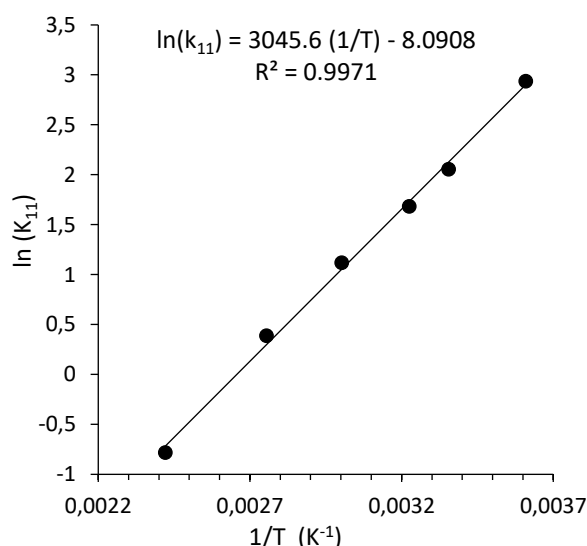


Figure IV-8: Van't Hoff plot of the complexation constant between 3-HP initially present in aqueous phase and TOA in organic phase

The global apparent enthalpy change of the complexation reaction is negative around -25.3 kJ.mol<sup>-1</sup> while the entropy change is -67.3 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>. Indeed, the ion pair formation through proton transfer and solvation is expected to be exothermic [18] due to stabilizing electrostatic interactions and specific solvation like H-bonding in solution. For example, Tamada and king [18] found that the complexation of lactic acid by Alamine 336 in chloroform, providing specific H-bonding, was two times more exothermic than in methyl isobutyl ketone. The formation of a single complex out of 2 species orders the system as well as specific H-bonds and this explains the negative entropy change of reaction. Contrary to the physical extraction, the reactive extraction is an enthalpy-driven process. This totally different thermodynamic behavior is in line with the 3-HP extraction mechanisms by physical and reactive extractions discussed in a previous work [30]. Given the converse temperature dependence of these two mechanisms, it is expected that they would annihilate each other at a given temperature level. By extrapolating our experimental data on a larger temperature range, as shown in Figure IV-9,

we found that the minimum extraction yield should be obtained at around 180°C, supposing that dilute 3-HP solutions do not decompose under such conditions. Further increasing the temperature would be useless to reverse the extraction efficiency. At 140°C, no degradation products like acrylic acid were found in the aqueous phase.

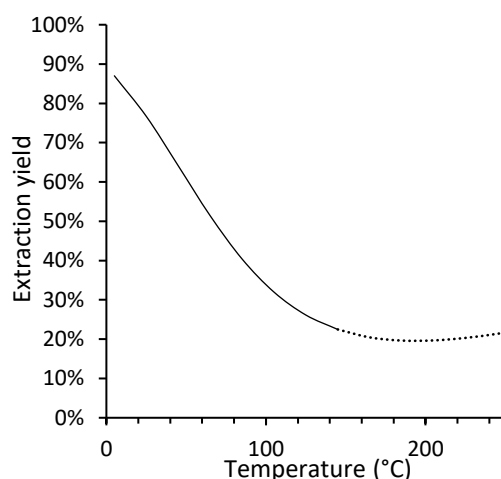


Figure IV-9: Extraction yield of a 5 g/L 3-HP solution calculated from the thermochemical parameters (extrapolated above 140°C)

These results give valuable inputs for the design of temperature swing back-extraction process. For example, the reactive extraction can be performed at room temperature, then a cold washing of the organic phase can be performed to remove the species other than the acid (coextracted mainly by partition). Finally, a back-extraction at high temperature allows the recovery of the purified acid in an aqueous phase. A simplified process diagram is given in figure IV-10.

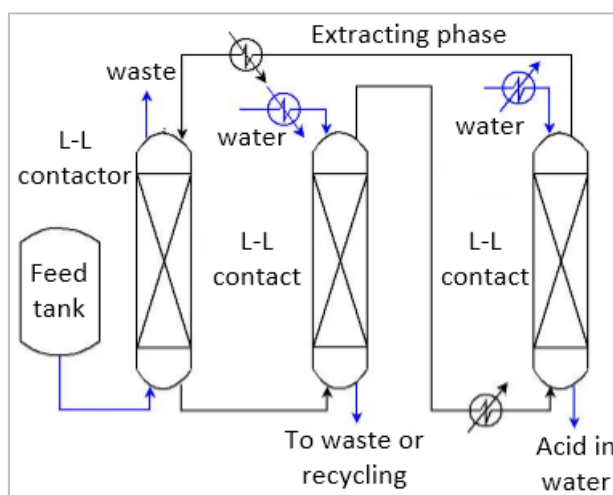


Figure IV-10: Simplified process diagram of extraction and back-extraction using temperature swing with a purification step with cold water in-between.

The combination of all the processes described herein is also possible. For example, temperature and diluent swings can be coupled by heating the streams after the addition of the bad solvent [18], which

should enhance the final 3-HP recovery yield. Another example is the combination of the temperature swing with the use of sodium hydroxide. This is the case of a process developed by Corbion Purac for the production of polymer grade lactic acid where the organic phase is back-extracted using temperature swing (including the purification step) and then totally regenerated using sodium hydroxide (including the washing step) [31].

#### 4. Conclusion

This study explored several strategies for the back-extraction of organic acids from loaded organic phases and reports pioneering experimental results for the effective recovery of 3-HP. These results are valuable, given the actual potential of 3-HP as a platform molecule for the production of commercially valuable chemicals, and the lack of data regarding its extraction and recovery. 3-HP recovery from a loaded organic phase made of trioctylamine in decanol was studied. Using a neutral salt was shown to be feasible but a total recovery needs a high excess of salt and the trioctylamine, loaded with the anion of the salt, is not regenerated. Basic salts like sodium hydroxide or carbonate are thus advised because they are able to totally back-extract 3-HP in stoichiometric proportions while totally regenerating the amine extractant. However, the acid is recovered as its sodium salt, which may necessitate further processing steps to recover the acid under its non-dissociated form. The use of sodium carbonate in stoichiometric proportions leads to the production of gaseous carbon dioxide. Diluent swing with addition of hexane was proved to be effective in the case of 3-HP. Compared to other acids from the literature (like propionic acid) when the initial solvent is an alcohol, the diluent swing was unexpectedly high probably due to the higher hydrophilic character of 3-HP. The use of 60%v/v hexane with 1:1 volume ratio between the aqueous and the final organic phase led to 3-HP recovery up to 70% but the solution was very dilute compared to the initial organic phase without hexane addition. Nonetheless, 3-HP was recovered in its non-dissociated form. Finally, temperature swing was performed over a large range of temperature (4 – 140 °C), and the higher the temperature the higher the 3-HP recovery. For example at 140°C, around 78% of the 3-HP is found in the aqueous phase. Thermochemical calculations tend to show that further increasing the temperature would be useless to recover more 3-HP and no degradation products are found. Thermal regeneration is particularly interesting as the acid is not very diluted in the back-extraction stream, there is no chemical addition required and 3-HP is recovered under its non-dissociated form. All the methods addressed here and combinations thereof can be considered for the implementation of an efficient back-extraction process, performed experiments providing useful data for further process design and evaluation.

### **Acknowledgement**

The authors would like to thank Cristian Felipe Puentes Mancipe for thermodynamic calculations concerning bubble points estimation and are grateful to Région Champagne-Ardenne, the Conseil Départemental de la Marne and Reims Métropole for financial support.

## 5. Références

- [1] T. Werpy, G. Petersen, A. Aden, J. Bozell, J. Holladay, J. White, A. Manheim, D. Elliot, L. Lasure, S. Jones, M. Gerber, K. Ibsen, L. Lumberg, S. Kelley, Top Value Added Chemicals from Biomass, Volume 1—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, TN, 2004.
- [2] V. Kumar, S. Ashok, S. Park, Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid, *Biotechnol Adv.* 31 (2013). doi:10.1016/j.biotechadv.2013.02.008.
- [3] A.S. Kertes, C.J. King, Extraction Chemistry of Fermentation Product Carboxylic Acids, *Biotechnol. Bioeng.* 28 (1986) 269–282.
- [4] F. Chemarin, M. Moussa, M. Chadni, B. Pollet, P. Lieben, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, New insights in reactive extraction mechanisms of organic acids: An experimental approach for 3-hydroxypropionic acid extraction with tri-*n*-octylamine, *Sep. Purif. Technol.* 179 (2017) 523–532. doi:10.1016/j.seppur.2017.02.018.
- [5] M. Moussa, G. Burgé, F. Chemarin, R. Bounader, C. Saulou-Bérion, F. Allais, H.-E. Spinnler, V. Athès, Reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid from model aqueous solutions and real bioconversion media. Comparison with its isomer 2-hydroxypropionic (lactic) acid, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2015) 2276–2285. doi:10.1002/jctb.4813.
- [6] G. Burgé, F. Chemarin, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, F. Allais, H.-É. Spinnler, V. Athès, Reactive extraction of bio-based 3-hydroxypropionic acid assisted by hollow-fiber membrane contactor using TOA and Aliquat 336 in *n*-decanol, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2016) 2705–2712. doi:10.1002/jctb.4878.
- [7] M. Matsumoto, M. Shibazaki, K. Kondo, Salting-out Extraction of 3-Hydroxypropionic Acid with Reactive Extraction and Aqueous Two-phase Systems, *Solvent Extr. Res. Dev.* 24 (2017) 141–147.
- [8] F. Chemarin, M. Moussa, F. Allais, V. Athès, I.C. Trelea, Mechanistic modeling and equilibrium prediction of the reactive extraction of organic acids with amines: A comparative study of two complexation-solvation models using 3-hydroxypropionic acid, *Sep. Purif. Technol.* 189 (2017) 475–487. doi:10.1016/j.seppur.2017.07.083.
- [9] Y. Tong, M. Hirata, H. Takanashi, T. Hano, Back extraction of lactic acid with microporous hollow fiber membrane, *J. Membr. Sci.* 157 (1999) 189–198.
- [10] I.M. Coelho, P. Silvestre, R.M.C. Viegas, J. Crespo, M.J.T. Carrondo, Membrane-based solvent extraction and stripping of lactate in hollow-fibre contactors, *J. Membr. Sci.* 134 (1997) 19–32.
- [11] M. Puttemans, L. Dryon, D.L. Massart, Extraction of organic acids by ion-pair formation with tri-*n*-octylamine: Part 2. Back-extraction, *Anal. Chim. Acta.* 161 (1984) 381–386.
- [12] V.M. Yabannavar, D.I.C. Wang, Extractive fermentation for lactic acid production, *Biotechnol. Bioeng.* 37 (1991) 1095–1100.
- [13] L.J. Poole, C.J. King, Novel Regenerated Solvent Extraction Processes for the Recovery of Carboxylic Acids or Ammonia from Aqueous Solutions Part I. Regeneration of Amine-Carboxylic Acid Extracts, Lawrence Berkeley Laboratory, CA (USA), United States, 1990.
- [14] N.L. Ricker, C.J. King, Solvent Extraction of Wastewaters from Acetic-Acid Manufacture, Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory (U.S. Environmental Protection Agency), Ada, OK, United States, 1980.
- [15] A. Keshav, K.L. Wasewar, Back extraction of propionic acid from loaded organic phase, *Chem. Eng. Sci.* 65 (2010) 2751–2757. doi:10.1016/j.ces.2010.01.010.
- [16] L. Ahsan, M.S. Jahan, Y. Ni, Recovery of Acetic Acid from the Prehydrolysis Liquor of Kraft Based Dissolving Pulp Production Process: Sodium Hydroxide Back Extraction from the Trioctylamine/Octanol System, *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (2013) 9270–9275. doi:10.1021/ie401285v.
- [17] T. Harington, M.M. Hossain, Extraction of lactic acid into sunflower oil and its recovery into an aqueous solution, *Desalination.* 218 (2008) 287–296. doi:10.1016/j.desal.2007.02.024.

- [18] J. Gorden, T. Zeiner, G. Sadowski, C. Brandenbusch, Recovery of *cis,cis*-muconic acid from organic phase after reactive extraction, *Sep. Purif. Technol.* 169 (2016) 1–8. doi:10.1016/j.seppur.2016.05.032.
- [19] K.L. Wasewar, A.B.M. Heesink, G.F. Versteeg, V.G. Pangarkar, Intensification of conversion of glucose to lactic acid: equilibria and kinetics for back extraction of lactic acid using trimethylamine, *Chem. Eng. Sci.* 59 (2004) 2315–2320. doi:10.1016/j.ces.2003.11.023.
- [20] J.A. Tamada, C.J. King, Extraction of Carboxylic Acids with Amine Extractants. 3. Effect of Temperature, Water Coextraction, and Process Considerations, *Ind. Eng. Chem. Res.* 29 (1990) 1333–1338.
- [21] M. Matsumoto, T. Takahashi, K. Fukushima, Synergistic extraction of lactic acid with alkylamine and tri-*n*-butylphosphate: effects of amines, diluents and temperature, *Sep. Purif. Technol.* 33 (2003) 89–93. doi:10.1016/S1383-5866(03)00002-9.
- [22] E.Z. Lee, Y. Suk Huh, Y.-S. Jun, H. Jin Won, Y.K. Hong, Effect of Operating Variables on Back-extraction Characteristics of Succinic Acid from Organic Phase, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 13 (2008) 342–346.
- [23] M.G. Sadaka, A.A. Garcia, The Effect of Temperature on Forward/Back Extraction Using an Amine Extractant for the Recovery of Cyclic Hydroxy Carboxylic Acids, *Sep. Sci. Technol.* 33 (1998) 1667–1680. doi:10.1080/01496399808545072.
- [24] D. Pal, A. Tripathi, A. Shukla, K.R. Gupta, A. Keshav, Reactive Extraction of Pyruvic Acid Using Tri-*n*-octylamine Diluted in Decanol/Kerosene: Equilibrium and Effect of Temperature, *J. Chem. Eng. Data.* 60 (2015) 860–869. doi:10.1021/je500964e.
- [25] D.H. Han, Y.K. Hong, W.H. Hong, Separation characteristics of lactic acid in reactive extraction and stripping, *Korean J. Chem. Eng.* 17 (2000) 528–533.
- [26] D. Yankov, J. Molinier, J. Albet, G. Malmay, G. Kyuchoukov, Lactic acid extraction from aqueous solutions with tri-*n*-octylamine dissolved in decanol and dodecane, *Biochem. Eng. J.* 21 (2004) 63–71. doi:10.1016/j.bej.2004.03.006.
- [27] F. Chemarin, V. Athès, M. Bedu, T. Loty, F. Allais, M. Moussa, Towards an In Situ Product Recovery of bio-based 3-hydroxypropionic acid: influence of bioconversion broth components on membrane-assisted reactive extraction, *Submitt. Separation En Purif. Technol.* (2017).
- [28] Y. Marcus, *The properties of solvents*, Wiley, Chichester ; New York, 1998.
- [29] B. Gestblom, J. Sjöblom, Dielectric Relaxation Studies of Aqueous Long-chain Alcohol Solutions, *Acta Chem. Scand. A.* 38 (1984) 47–56.
- [30] J.K. Vij, W.G. Scaife, J.H. Calderwood, The pressure and temperature dependence of the static permittivity and density of heptanol isomers, *J. Phys. Appl. Phys.* 11 (1978) 545.
- [31] B. Gestblom, A. El-Samahy, J. Sjöblom, Dielectric relaxation studies of monoalcohol solutions with 1, 2-diols, *J. Solut. Chem.* 14 (1985) 375–392.
- [32] F. Chemarin, M. Moussa, F. Allais, V. Athès, I.C. Trelea, Mechanistic modelling and equilibrium prediction of organic acids reactive extraction with amines: comparative study of 2 complexation-solvation models in the case of 3-hydroxypropionic acid, *Sep. Purif. Technol.* (2017).
- [33] B.I. Veldhuis-Stribos, J. Van Breugel, W.J. Groot, B.M. Dierdorp, Continuous process for preparing lactic acid, WO 01/27064 A1, 2001.

## 6. Résultats principaux et remarques supplémentaires

- Les sels basiques (hydroxyde et carbonate) ont montré une récupération totale du 3-HP dans des proportions stœchiométriques tandis que le sel neutre de chlorure, bien qu'efficace, nécessite d'être en excès pour récupérer la totalité du 3-HP présent en phase organique
- L'ajout d'un contre-solvant comme l'hexane a montré de bonnes propriétés pour rejeter le 3-HP d'une phase organique chargée en présence d'une phase aqueuse. Ceci est certainement dû à son très fort caractère hydrophile qui le rend plus sensible aux contre-solvants que d'autres acides organiques avec des alcools comme diluant de l'amine.
- La réaction de formation du complexe acide-amine est exothermique et donc réversible avec la température. Une élévation de la température aura tendance à dissocier le complexe. A l'inverse le partage physique du 3-HP dans le décanol augmente avec la température. Il existe donc une température où l'extraction est minimale (dés-extraction maximale) et elle se situe autour de 180°C. Toutefois au-dessus de 140°C la variation de rendement d'extraction/dés-extraction est minimale.

Lors d'une extraction, la concentration en acide dans la phase organique est directement liée à celle dans la phase aqueuse. Ainsi, comme l'extraction du 3-HP est un processus équilibré, un ajout d'acide dans le système signifiera à la fois une accumulation dans la phase organique et dans la phase aqueuse. Pendant une bioconversion extractive, si l'on veut vraiment limiter la concentration en acide dans le bioréacteur, il convient de retirer au fur et à mesure l'acide s'accumulant en phase organique, c.-à-d. régénérer la phase organique en la dés-extrayant simultanément.

Nous venons de voir qu'il y a plusieurs méthodes pour dés-extraire la phase organique. Toutefois, pour que la concentration dans le bioréacteur reste faible il faut que la concentration dans la phase organique soit faible également. Cela implique que le procédé de dés-extraction en simultané opère en permanence sur une phase organique à faible concentration. Evidemment, conduire un procédé de séparation en continu sur de faible concentration n'est pas favorable. Par exemple, pour une modulation de température, cela impliquerait de devoir chauffer la phase organique tout le temps de la bioconversion pour maintenir des concentrations assez faibles. Ceci implique une consommation d'énergie par quantité d'acide récupéré beaucoup plus importante que celle d'un même procédé avec une phase organique directement très chargée, par exemple issue de l'extraction d'un milieu de fermentation concentré après la fin d'un batch fermentaire.



Ce problème ne se rencontre pas en utilisant les solutions aqueuses à pH basique dont l'efficacité de désextraction est totale, il est alors possible de concentrer l'acide dans la phase de récupération. Cependant, le problème est qu'on obtient un sel d'acide moins valorisable qu'il faut alors encore transformer pour retrouver la forme non-dissociée de l'acide. Une idée originale présentée en introduction de cette publication est l'utilisation de bases volatiles qui permettent de retrouver la forme non-dissociée de l'acide par simple craquage thermique du sel formé avec régénération concomitante de la base volatile. C'est la solution la plus envisagée pour les procédés ISPR intégrant extraction et désextraction.

Dans la suite, nous utiliserons des solutions d'hydroxyde de sodium comme composé basique modèle pour la désextraction. En effet, son rendement d'extraction est total et sa mise en place en contacteur s'est révélée aisée et il peut représenter le comportement des bases volatiles dont l'efficacité de désextraction est également totale mais dont la mise en œuvre est plus compliquée.

Maintenant que la méthode de désextraction pour le procédé ISPR est choisie, la modélisation dynamique des transferts de matière dans un système intégré d'extraction et désextraction et le couplage de ce système à une unité mimant une bioconversion seront mis en œuvre.



## Publication n°5

### **Extraction réactive en contacteurs membranaires pour la récupération *in situ* de l'acide 3-hydroxypropionique : modélisation prédictive et mise en œuvre expérimentale en mimant des bioconversions**

L'extraction réactive en contacteur membranaire comme procédé de récupération *in-situ* est une technique prometteuse. En effet, l'extraction réactive permet d'extraire sélectivement un acide d'un milieu de bioconversion tandis que la membrane maintient les microorganismes dans le bioréacteur tout en créant une grande surface de contact liquide-liquide. Nous nous intéressons à l'extraction de l'acide 3-hydroxypropionique par un système extractant constitué de trioctylamine diluée dans le décanol. Afin d'éviter une forte accumulation du 3-HP dans la phase organique et donc dans la phase aqueuse, il est nécessaire de régénérer la phase organique en continu en récupérant l'acide dans une deuxième phase aqueuse de désextraction. Cette régénération s'effectue à l'aide d'un deuxième contacteur à membrane afin d'étudier les transferts dans ce type d'appareillage. Un modèle prédictif a été développé pour prédire la dynamique des transferts de matières. Il est fondé sur un modèle de couches limites et prend en compte les équilibres chimiques et physiques de complexation/dissociation et de partage et la diffusion des espèces dans les pores de la membrane. Toutefois, une modification a été apportée pour prendre en compte les variations de viscosité de la phase organique. En effet, nous avons montré que la viscosité de la phase organique dépendait grandement de la concentration en 3-HP. La concentration en 3-HP dans la phase organique variant dans le temps, la viscosité aussi varie dans le temps et *a fortiori* les coefficients de transfert de matière qui en dépendent. Ainsi, sans ajustement particulier (à part un ajustement initial basé sur une seule expérience et permettant de prendre en compte la géométrie du module), il a été possible de prédire les résultats expérimentaux d'expériences variées avec à chaque fois un  $R^2 > 0.995$ . Le modèle permet de prédire le comportement d'extractions avec des concentrations initiales fixées en 3-HP ou encore d'extractions couplées avec désextraction, en parallèle de l'apport d'acide en continu (mimant une bioconversion) que ce soit en régime stationnaire ou transitoire. Il est alors envisageable de coupler cette technique à une bioconversion. Nous présentons plusieurs résultats expérimentaux représentant des conditions mimant une bioconversion : addition de 3-HP à une vitesse correspondant à une productivité microbienne avec présence de substrat, de source d'azote, de sels et de microorganismes modèles. Les résultats montrent que la sélectivité envers le 3-HP est très élevée vis-à-vis du substrat qui est complètement retenu dans le bioréacteur et des composés azotés du milieu dont plus de 99% sont maintenus dans le bioréacteur au bout de 4 jours de contacts. A contrario, aucune sélectivité pour

les anions des sels testés n'a été observée. Les variations de pH ainsi que le pouvoir tampon des différentes phases aqueuses utilisées sont également discutés.

## Reactive extraction in membrane contactors for *in situ* product recovery of 3-hydroxypropionic acid: predictive modeling and bioconversion-like experimental implementation

F. Chemarin<sup>a,b</sup>, V. Athès<sup>b</sup>, W. Buquet<sup>a</sup>, M. Bedu<sup>c</sup>, F. Allais<sup>a</sup>, A. F. Teixeira<sup>a</sup>, M. Moussa<sup>b\*</sup>, I.C. Trelea<sup>b</sup>

<sup>a</sup> AgroParisTech, Chaire Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI), Centre Européen de Biotechnologie et Bioéconomie (CEBB), 3 Rue des Rouges Terres, F-51110 Pomacle, France

<sup>b</sup> UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, F-78850, Thiverval-Grignon, France

<sup>c</sup> UMR GENIAL, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, F-91300, Massy, France

\* Corresponding author: marwen.moussa@agroparistech.fr

### Abstract

Membrane-based reactive extraction as an *in situ* product recovery technique is a promising strategy towards process intensification. Reactive extraction allows selectivity towards targeted acids and the membrane keeps microorganisms in the broth while implementing a large liquid-liquid surface area. This paper deals with 3-hydroxypropionic acid extraction using trioctylamine in decanol. In order to maintain an effective driving force for the transfer of 3-HP from the bioconversion medium into the organic phase, this latter was continuously regenerated by recovering the acid in a back-extraction aqueous phase. This regeneration step is set up with a second membrane contactor in order to study transfers in such devices. A predictive model was developed to predict mass transfer dynamics. It is based on the boundary layers model and takes into account chemical and physical equilibria of complexation/dissociation and partitioning and species diffusion in the membrane pores. However a modification was made to take into account the viscosity variations in the organic phase. Indeed, it is shown that the organic phase viscosity highly depends on acid concentration (+50% when 3-HP concentration reaches 28 g/L) and accordingly mass transfer coefficients should vary with time and concentration. Thus, without particular fitting procedure (except one using only one separate experiment to take the membrane and module geometry into account), it was possible to predict different experimental results with  $R^2 \geq 0.995$ , totally neglecting chemical kinetics and interfacial resistance for both extraction and back-extraction steps. The model allows the prediction of extraction behaviors using fixed initial concentration and extraction coupled with back-extraction with gradual 3-HP feed (mimicking a bioconversion) in transient and steady states. It is then conceivable to couple such a process to a bioreactor. Several experiments are presented representing bioconversion conditions: gradual 3-HP feeding corresponding to microbial productivities with substrate, nitrogen source, salts and microorganism addition. Results proved a high 3-HP selectivity towards the substrate which is totally retained in the bioreactor and nitrogen compounds which are maintained in the broth

at more than 99% after 4 days of contact between phases. Conversely, no selectivity was observed towards salts anions that are also extracted. pH variations and buffering powers of the aqueous phases used are described and discussed.

Keywords : solvent extraction; mass transfer modeling; extractive fermentation; tri-*n*-octylamine

### Abbreviations:

3-HP: 3-hydroxypropionic acid

AH: non-dissociated acid

$C_{org}$ : total concentration of 3-HP under all forms in the organic phase

CPX: acid-amine complex

d: diameter of the fibers

D: diffusion coefficient

J: flux of mass (mol/s)

k: mass transfer coefficient

$K_{11}$ : complexation constant

$K_A$ : dissociation constant of an organic acid

$K_w$ : dissociation constant of water

L: length of the fiber

m: partition coefficient

M: molecular weight

P: 3-HP influx

Q: volumetric flowrate

r: reaction rate

R: rate constant

$R_3N$ : tertiary amine

S: surface of transfer

T: temperature

$v$ : molar volume

V: volume

$x_{ROH}^{ini}$ : molar fraction of decanol in the decanol-trioctylamine mixture

$\mu$ : dynamic viscosity

### Subscripts and superscripts:

aq: concerning the aqueous phase

BE: concerning the back-extraction side of the pilote

E: concerning the extraction side of the pilote

lm: logarithmic mean

org: concerning the organic phase

## 1. Introduction

Reactive liquid-liquid extraction is an efficient way to recover acids from dilute aqueous phases [1]. In such a process, an extractant diluted in the organic phase is able to bind selectively to the acid in order to form a hydrophobic complex soluble in the organic phase. The extractant can be a hydrophobic amine or a phosphorous-bonded oxygen donor. This process raised a lot of interest in the industrial sector for the purification of bio-based organic acids from fermentation broth, particularly for citric and lactic acids [2–4].

The use of reactive extraction as an *in situ* product recovery process has been widely studied to remove inhibition due to organic acids accumulation in fermentation broths. For example, in the case of lactic acid, higher yields, concentrations and productivities could be reached by continuously removing the acid from the broth during fermentation when compared to a fermentation with acid accumulation [5–8]. The main issues in order to operate an extractive fermentation in the case of organic acids are the solvent toxicity and the non-compatibility between most optimal fermentation and extraction pH. The direct contact between the microorganisms and the organic phase of extraction can be noxious and even lead to the cell inactivation. To overcome solvent toxicity, the implementation of membrane-based reactive extraction as an *in-situ* product recovery process has been successfully implemented using immobilized cells [9–11] or free cells [12–14]. In this kind of device, a phase (1) showing affinity for the membrane material can wet and fill the pores of the membrane. The other phase (2), showing less affinity towards the membrane material, is then maintained at the surface of the membrane without entering the pores thanks to a controlled overpressure ( $P_2 > P_1$ ). The contact between both phases is then made and the interface is stabilized at the mouth of the pores where the complexation reaction can take place. Accordingly, membranes with high porosities can lead to high specific surface area. It is a dispersion free process so that it hinders emulsion formation. The small size of the pores can limit the contact between microorganisms and the organic phase potentially enhancing the biocompatibility of the process and maintaining biocatalysts in the bioreactor for suspended cells [12]. Some historical organic acids like citric and itaconic acids are produced at low pH (~2-3) using fungi but bacterial products like lactic acid needed higher pH for cell maintenance. However, nowadays most large scale bio-based organic acids, like lactic acid [15], are industrially produced at low pH (~3) using modified yeasts. This makes fermentation and optimal extraction pH compatible. Recently, industrial patents also reported the production of 3-hydroxypropionic acid (3-HP) at low pH using yeasts [16]. Nevertheless, despite the pH regulation set to 4, 3-HP accumulation in the broth has been reported to inhibit cell growth and productivity [17]. In this context, the *in situ* reactive extraction of 3-HP using membrane contactors seems promising, particularly in hollow-fiber membrane contactors as they are known for their high packing densities [18]. Deep understanding of dynamic behavior and accurate



modeling are needed to predict process efficiency and acid accumulation during reactive extraction in membrane contactors.

The most used models are based on boundary layers. They usually rely on the use of several local mass transfer coefficients: at the aqueous side, in the membrane pores and at the organic side to calculate the mass transfer from the aqueous to the organic bulk. Even if some authors have used distribution coefficients, in reactive extraction equilibrium is determined using complexation constants. Some authors [19,20] could reasonably model extractions without taking the interfacial reaction kinetics into account and some others found it necessary to predict results accurately. For example, Juang et Chen [21] modeled the membrane extraction of citric and lactic acids using trioctylamine in xylene with two kinetic rate constants and concluded that chemical kinetic resistance could account up to 50 and 40% of the global extraction resistance for citric and lactic acids respectively. Huang et al [22] needed to fit 3 kinetic rate constants to predict lactic acid concentration profiles in a system coupling extraction with Alamine 336 in 2-octanol and back-extraction with sodium hydroxide using two membrane contactors. They concluded that chemical kinetics could account for more than 71% and 94% of the global mass transfer resistance for extraction and back-extraction respectively. However, 94% of the resistance for a strong base neutralizing a weak acid seems oddly high and reactions between acids and tertiary amines have often been found to be fast and occurring in thin diffusion films when no contactors were used [23,24].

In this paper, we aim at developing a predictive model for a hollow-fiber membrane-based reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid by tri-*n*-octylamine in *n*-decanol with or without coupling a back-extraction step that simultaneously regenerates the extracting phase. We developed a model where interfacial reactions kinetics are neglected but where viscosity variations due to complex accumulation in the organic phase are taken into account. Further experiments will be performed mimicking at best a bioconversion in order to evaluate the performance of such a system in bioconversion-like conditions.

## 2. Material and methods

### 2.1 Modelling

#### *2.1.1. Assumption of constant concentrations along the fibers*

If the residence times of the phases in the fibers or in the shell side of the modules are much shorter than the characteristic times of extraction, species concentrations can be considered homogeneous all along the fibers. This assumption will be checked in the results section. If this assumption is not verified in other applications, concentrations variation along the module can be considered by discretizing the

module space. Average residence times in the module for the aqueous (in the fibers) and the organic (shell side) phases are calculated as:

$$\tau_{fib} = \frac{V_{intfib}}{Q_{aq}} = \frac{9800 \times \pi \left(\frac{d_{int}}{2}\right)^2 L}{Q_{aq}} \sim 6 \text{ s.} \quad (1)$$

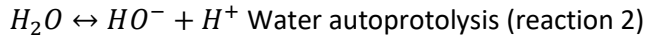
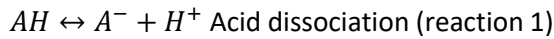
$$\tau_{shell} = \frac{V_{shell} - V_{fib}}{Q_{org}} = \frac{\pi \left(\frac{D}{2}\right)^2 L - 9800\pi \left(\frac{d_{out}}{2}\right)^2 L}{Q_{org}} \sim 36 \text{ s.} \quad (2)$$

With such figures, we demonstrate average residence times are much lower than characteristic times of extraction ranging around 2 000 and 7 000 seconds according to extraction conditions (CF section 3.2. Model calibration).

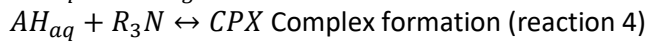
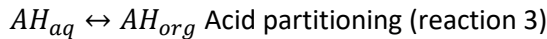
### 2.1.2. Chemical reactions considered in the model

The considered chemical reactions are the following (taken from [25]):

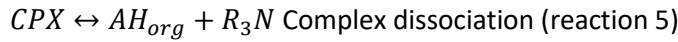
- Homogeneous reactions in the aqueous phase:



- Interfacial reactions at the liquid-liquid interface:



- Homogeneous reactions in the organic phase:



The interface is supposed to be at chemical equilibrium, meaning that interfacial chemical reactions are much faster than species transfers. Equations related to chemical reactions are in Table V-1.

Table V-1: Equations implemented in the model concerning chemical equilibria and kinetics

Equilibrium at the interface	
Reaction 1	$[A^-]_{int}[H_3O^+]_{int} - K_A[AH_{aq}]_{int} = 0 \quad (3)$
Reaction 2	$[H_3O^+]_{int}[HO^-]_{int} - K_w = 0 \quad (4)$
Reaction 3	$[AH_{org}]_{int} - m[AH_{aq}]_{int} = 0 \quad (5)$
Reaction 4	$[CPX]_{int} - K_{11}[AH]_{int}[TOA]_{int} = 0 \quad (6)$
Reaction kinetics in the aqueous phase	
Rate of reaction 1	$r_1 = R_{-1}(K_A[AH_{aq}] - [A^-][H_3O^+]) \quad (7)$
Rate of reaction 2	$r_2 = R_{-2}(K_w - [H_3O^+][HO^-]) \quad (8)$
Reaction kinetics in the organic phase	
Rate of reaction 5	$r_5 = R_{-5} \left( \frac{m}{K_{11}} [CPX] - [AH_{org}][R_3N] \right) \quad (9)$

Where partial reaction orders are supposed to be 1, and  $R_{-1}$ ,  $R_{-2}$  and  $R_{-5}$  are the backward rate constants of reactions 1, 2 and 5 respectively.

### 2.1.3. Mass fluxes

Most of the membrane extraction modeling relies on the boundary layer model. In an extraction step, the transport is separated into 5 zones: (i) the aqueous bulk phase, (ii) the aqueous boundary layer, (iii) the membrane pores, (iv) the organic boundary layer and (v) the organic bulk phase. A conceptual view of the boundary layer model is presented in figure V-1.

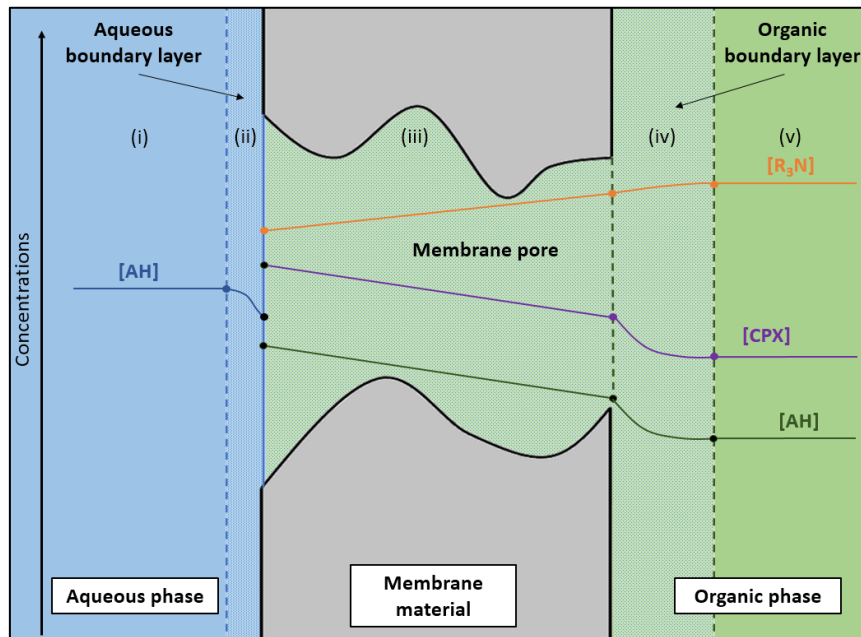


Figure V-1: Conceptual view of the boundary layer model with concentration profiles

Concentrations are considered homogeneous in bulks and vary in thin films close to the membrane wall and inside the membrane pores. In boundary layers and in the membrane pores, the mass fluxes can be described thanks to mass transfer coefficients and driving forces. In the present study, we merged zones (iii) the membrane pores and (iv) the organic boundary layer for the sake of simplification, with zone (iii) supposed to have the major impact on the global transfer resistance due to applied flowrates. If no significant accumulation of species occurs in zones (ii) to (iv) due to their comparatively small volumes, then pseudo steady-state regime can be assumed and fluxes can be expressed as:

$$J_X = k_X S_X ([X]_{int} - [X]) \quad (10)$$

Where:

- $J$  is the flux of the species  $X$  across the layer of the corresponding phase
- $k$  is the mass transfer coefficient of species  $X$
- $S$  is the surface open to the transfer of species  $X$
- $[X]_{int}$  is the concentration of the species  $X$  at the interface

- [X] is the concentration of the species X in the corresponding bulk
- X is the transferred species, it can be  $AH_{aq}$ ,  $A^-$ ,  $H_3O^+$  and  $HO^-$  in the aqueous phase and  $AH_{org}$ , CPX and TOA in the organic phase

Globally, the mass transfer path considered in the model is the following:

- Transfer of the aqueous reactants from the aqueous bulk to the liquid-liquid interface through the aqueous boundary layer
- Transfer of the organic reactants from the organic bulk to the liquid-liquid interface through the membrane pores and the organic boundary layer
- Instantaneous reactions 3 and 4 of the species at the interface (chemical equilibria as the interface continuity conditions)
- Transport of the products from the interface to the bulks
- Concentrations are assumed homogeneous in the stirred bulks with homogeneous reactions 1 and 2 in the aqueous phase and 5 in the organic phase

#### 2.1.4. Mass balance equations

After chemical reactions and flux definitions, another condition is needed in order to solve the system: mass conservation. If we assume that the only accumulation of species in the system takes place in the bulk phases, mass conservation allows us to relate interfacial fluxes between them in one hand, and bulk concentration variations with fluxes, chemical reactions and acid influx in the other hand. The mass balances used are quoted in Table V-2.

Table V-2: Equations implemented in the model concerning mass balance and flux conservation

Mass balance equations in the aqueous phase	
Protonated acid in the aqueous phase	$\frac{d[AH_{aq}]}{dt} = -\frac{J_{AH,aq}}{V_{aq}} - r_1 + P \quad (11)$
Dissociated acid	$\frac{d[A^-]}{dt} = -\frac{J_{A^-}}{V_{aq}} + r_1 \quad (12)$
Hydronium ion	$\frac{d[H_3O^+]}{dt} = -\frac{J_{H_3O^+}}{V_{aq}} + r_1 + r_2 \quad (13)$
Hydroxide ion	$\frac{d[HO^-]}{dt} = -\frac{J_{HO^-}}{V_{aq}} + r_2 \quad (14)$
Interfacial fluxes conservation	
Total acid conservation	$J_{AH,aq} + J_{AH,org} + J_{CPX} + J_{A^-} = 0 \quad (15)$
Charge conservation	$J_{A^-} + J_{HO^-} - J_{H_3O^+} = 0 \quad (16)$
Total amine conservation	$J_{TOA} + J_{CPX} = 0 \quad (17)$
Mass balance equation in the organic phase	
Complex	$\frac{d[CPX]}{dt} = -\frac{J_{CPX}}{V_{org}} - r_5 \quad (18)$
Amine	$\frac{d[TOA]}{dt} = -\frac{J_{TOA}}{V_{org}} + r_5 \quad (19)$
Protonated acid in the organic phase	$\frac{d[AH_{org}]}{dt} = -\frac{J_{AH,org}}{V_{org}} + r_5 \quad (20)$

### 2.1.5. Definition of the parameters

#### 2.1.5.1 Chemical equilibrium constants

Chemical equilibrium constants are known from the literature and our previous works [25,26].

At 25°C, the dissociation constants of 3-HP and water are  $K_A = 10^{-4.51}$  and  $K_w = 10^{-14}$  respectively.

At 25°C, the complexation constant can be estimated thanks to the composition of the organic phase [25]:

$$\ln(K_{11}) = -6.84 + 19.7x_{ROH}^{ini} - 19.4(x_{ROH}^{ini})^2 + 9.5(x_{ROH}^{ini})^3 \quad (21)$$

At 20%v/v TOA, the complexation constant can also be estimated thanks to the working temperature (in K) [26]:

$$\ln(K_{11}) = \frac{3046}{T} - 8.091 \quad (22)$$

At 25°C and for 20%v/v TOA, both leads to  $K_{11}=8.3$ .

The decanol/water partition coefficient  $m$  of 3-HP can be estimated thanks to the working temperature (in K) [26]:

$$\ln(m) = -\frac{1838}{T} + 2.267 \quad (23)$$

At 25°C, it leads to  $m=0.02$ .

#### 2.1.5.2. Reaction rate constants

We assume that bulk chemical reactions are not limiting in this process which is assumed to be driven by diffusion in boundary layers and especially in membrane pores. Accordingly, the backward reaction rate constants  $R_{-1}$ ,  $R_{-2}$  and  $R_{-5}$  have been set high enough not to influence the transfer rate. They were arbitrarily set to  $10^6$  L/mol/s in the computation.

#### 2.1.5.3. Mass transfer coefficients

The mass transfer coefficient in the aqueous boundary layer was estimated using a relation known as L ev eque's solution correlating Sherwood number with Reynolds and Schmidt numbers. The part of boundary layers in the global mass transfer resistance is not expected to be very important and accordingly we assume correlations to be enough for this estimation. For the aqueous phase in the fibers, L ev eque relation leads to:

$$k_{A,aq} = 1.62 \times \left( \frac{v_{aq} D_{A,aq}^2}{L d_{in}} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (24)$$

The diffusion coefficient is estimated using the Wilke-Chang correlation applied to water as solvent:

$$D_{A,aq} = 7.4 \cdot 10^{-8} \times \frac{(2.6 M_{H_2O})^{\frac{1}{2}} T}{\mu_{aq} v_A^{0.6}} \quad (25)$$

With  $M_{H_2O}$  the molecular weight of water (g/mol),  $T$  the temperature (K),  $\mu_{aq}$  the viscosity of the

aqueous phase (mPa.s) and  $v_A$  the molar volume of the considered solute (cm<sup>3</sup>/mol).

In the membrane pores, the organic phase is stagnant (no convection) and transport phenomena are supposed to be driven by one-dimensional diffusion in pores, whose length is much higher than the average diameter (approximately 3000 times) without mass accumulation. We assume this to be the limiting step of the transfer given the high flowrates used. In such conditions, the mass transfer coefficient should be proportional to the diffusion coefficient of the species. However, as the tortuosity, the porosity of the membrane and the diffusion coefficients are not precisely measured values, the products mass transfer coefficients (m/s) x available surface (m<sup>2</sup>) are determined by comparing model predictions with the results of a preliminary separate extraction experiment. For the sake of clarity, the product (mass transfer coefficient x available surface) is called “volumetric mass transfer coefficient” (m<sup>3</sup>/s). Actually, only the volumetric mass transfer coefficient of the complex is determined in that way, the other ones being derived from it using the following relationship based on the Wilke-Chang correlation and the assumption that the organic volumetric mass transfer coefficients are proportional to the corresponding diffusion coefficients (calculation in appendix):

$$k_i S_{org} = k_{CPX} S_{org} \times \left( \frac{v_{CPX}}{v_i} \right)^{0.6} \quad (26)$$

We visually observed in our former experiments that organic phases highly concentrated in complex became much more viscous. Kohler et al [27] studied the thermodynamics of the acetic acid/triethylamine mixture. They found that, when adding triethylamine (0.36 mPa.s, 25°C) in acetic acid (1.1 mPa.s, 25°C), the viscosity had a bell-shape profile, increasing sharply at the beginning and reaching a maximum value 15 times higher (16.7 mPa.s, 25°C) than the original acetic acid viscosity for a specific mixture composition. Juang et Chen [21] found significant deviations between their dynamic model of membrane extraction and their experimental results for lactic acid concentrations above 4 g/L and attributed this observation to potential viscosity effects.

As the concentration may vary significantly with time, we decided to take this phenomenon into account. If we assume that the solvent remains the same and that the temperature remains constant, we can consider the product  $\mu D$  as invariant based on Wilke-Chang relation derived from Stokes-Einstein equation. This is written like:

$$D_{A,org}(C_{org}) \mu_{org}(C_{org}) = D_{A,org}^0 \times \mu_{org}^0 \quad (27)$$

Where  $D_{A,org}^0$  and  $\mu_{org}^0$  are reference values known for a given acid concentration, for example  $C_{org} = 0$ .

The concentration gradient along the membrane pores induces a viscosity gradient which leads to a variation of volumetric mass transfer coefficient along the pores. However, assuming that volumetric mass transfer coefficients are proportional to the diffusion coefficient and that the variation of the viscosity depends linearly on the acid concentration (see section 3.1.), it is possible to find a relation for an average volumetric mass transfer coefficient on the organic side (see appendix):

$$\overline{k_{m,A}}(t)S_{org} = k_{m,A}^0 S_{org} \times \frac{\mu_{org}^0}{\mu_{org,lm}(t)} \quad (28)$$

Where  $\mu_{org,lm}$  is the logarithmic mean of the viscosity between the inlet and the outlet of the pores

$$\mu_{org,lm} = \frac{\mu_{org} - \mu_{int}}{\ln\left(\frac{\mu_{org}}{\mu_{int}}\right)} \quad (29)$$

The linear variation of viscosity with acid concentration will be checked in the results section.

#### 2.1.5.4. Extraction coupled to back-extraction

The modeling of the unit made of extraction coupled to back-extraction is similar to the extraction. The chemical reactions in the back-extraction side are the same as the extraction side but initial concentrations are different. Only the mass balance equations in the organic phase are changed to take into account species fluxes on both sides of the same vessel, i.e. extraction and back-extraction. Osmosis phenomena, like water transfer from the extracted phase to the back-extraction phase due to chemical potential difference, are neglected. Water co-extracted with the formation of the 3-HP complex (0.4 g of water for each gram of extracted 3-HP) [28] should normally be released in the back-extraction phase with the dissociation of the complex as this water is present at levels above the saturation point of the organic phase. This water transport is not taken into account as it is negligible compared to water already present in aqueous phases and does not influence the concentrations in the investigated range.

#### 2.1.6. Initial concentration of species in each phase

Before the beginning of the kinetics modeling, it is necessary to find the exact composition of each phase.

In aqueous phases, the determination of the equilibrium composition of a weak acid solution in combination with sodium hydroxide leads to the resolution of a cubic equation derived from the acid and water dissociations (reactions 1 and 2), the total acid conservation and the electroneutrality principle. For example, with the dissociated acid as the unknown:

$$[A^-]^3 + \left(K_A - [Na]_0 - [AH_{aq}]_0 - \frac{K_w}{K_A}\right)[A^-]^2 + \left([Na]_0[AH_{aq}]_0 - 2K_A[AH_{aq}]_0\right)[A^-] + K_A\left([AH_{aq}]_0\right)^2 = 0 \quad (30)$$

Where  $[Na]_0$  is the initial introduced concentration of sodium hydroxide. The physical solution for  $[A^-]$  is the one between 0 and  $[AH]_0$ . All other compounds concentrations can easily be deduced from  $[A^-]$ . In our experiments, at the extraction side  $[Na]_0 = 0$ .

For the organic phase, the determination of the equilibrium composition leads to a quadratic equation derived from the equilibrium between the free and the complexed form of the acid (reaction 5) and

the total acid conservation. For example, with the free form of the acid as the unknown:

$$[AH_{org}]^2 + \left( \frac{m}{K_{11}} + [TOA]_0 - [AH_{org}]_0 \right) [AH_{org}] - \frac{m}{K_{11}[AH_{org}]_0} = 0 \quad (31)$$

### 2.1.7. Numerical solution of model equations

Model equations were solved numerically using Matlab® software (MathWorks, Natick, MA). Since chemical reactions in the bulk phases were assumed very fast compared to mass transfer dynamics by setting reaction rate constants  $R_1$ ,  $R_2$  and  $R_5$  to very high values, the resulting system of differential equations was numerically “stiff”, i.e. contained a combination of slow and fast dynamics. A stiff solver (ode15s in the Matlab ODE suite) was used for the solution of differential equations in Table V-2.

## 2.2. Experimental strategy

First, a reactive extraction of 1 g/L 3-HP in water (500 mL) by a 20%v/v TOA in n-decanol (500 mL) is performed using a membrane contactor in a device described previously in order to calibrate the only unknown parameter of the model, i.e. the volumetric mass transfer coefficient of the complex in the organic phase. To test the validity of the found value, it will be implemented in the present model in order to predict the extraction behavior of the same species using other volumes and/or concentrations and in another device containing the same module. The predictions will be confronted to the experimental results and the validity of the volumetric mass transfer coefficient and the extraction model will be checked.

To get closer to real fermentation conditions, 3-HP will be brought to the aqueous phase at the best rate reported in the literature for 3-HP fermentation from glucose, i.e. 2.5 g/L/h. To enhance transfers, the organic phase will be continuously regenerated using a back-extraction system identical to the extraction system except that the aqueous phase is loaded with sodium hydroxide. The global device is described in figure V-2. The experimental results will be confronted to the model predictions for validation.

If 3-HP is added at the specified rate long enough, a steady state is reached in the extraction aqueous phase and in the organic phase, while 3-HP accumulates in the back-extraction phase. The model was used to predict this steady state and an experiment was performed to check the accuracy of the prediction.

Further experiments were made in order to mimic at best a bioproduction and the media were made more and more complex (see section 3.5.). First, the substrate, a nitrogen source and salts as described in [16] were added to observe their influence on the extraction in comparison to pure acid. The yield and selectivity are commented. The influence of the presence of microorganisms were also checked.



They were added in the medium at usual bioconversion concentrations. Finally, a broth containing non-producing yeasts, glucose, urea and salts were used in the extraction/back-extraction device and 3-HP were added at a rate of 2.5 g/L/h. Results concerning pH autoregulation, selectivity and extraction rates will be commented.

### 2.3. Chemicals and microorganisms

The organic phase consisted in 20%v/v tri-*n*-octylamine (TOA) (98% purity, Sigma-Aldrich, USA) diluted in *n*-decanol (>99% purity, Sigma-Aldrich, USA) saturated with water. Before use, TOA was purified using the protocol described in [28]. The aqueous phases consisted in 3-hydroxypropionic acid (30%wt in water, TCI Europe, Belgium) with possible addition of glucose (Fisher, UK), urea (>99% purity, Fisher, UK), monopotassium phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, >99% purity, Amresco, USA) magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>, >98% purity, VWR, USA) and microorganisms to mimic a real bioconversion medium.

The microorganism used is the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The yeast growth medium was prepared as 3L YEPD medium, by dissolving 5 g/L Yeast Extract (Fisher, UK), Peptone (Fisher, UK) 10 g/L, Glucose (Fisher, UK) 10 g/L in distilled water. The growth medium was then sterilized 20 min at 121°C and cooled down before inoculation with 1 g dry *Saccharomyces cerevisiae* (Sainte Lucie, France). Yeast cultivation was performed overnight in two Erlenmeyer flasks (3L with 1L cultivation broth and 5L with 2L cultivation broth), at 25°C on an orbital shaker (VWR, USA) under vigorous agitation (200 rpm). After cultivation, the medium was centrifuged at 5000 g and 4°C for 10 minutes. The sediment was resuspended in deionized water, centrifuged again and resuspended in deionized water in order to remove the impurities from the cultivation broth and the dry cell content was measured using a moisture balance (MB-35, Ohaus).

### 2.4. Experimental devices

The first extraction device is described in [29] and is used in the same experimental conditions: 25°C, aqueous and organic flowrates of 8.6 mL/s and 8.1 mL/s respectively, 0.4 bar of pressure differential between the aqueous and the organic phase, 500 mL of each phase.

The second extraction device is a pilot built by Seprosys®. It is fully automated with flowrate control and regulation and pH, pressure and temperature inline measurements and acquisition (0.5 Hz). Pressures are measured upstream and downstream from the modules in each phase in order to evaluate the pressure drops across the module and then pressures are set manually with needle valves to get a stable interface. The pressure difference between the aqueous and the organic phase is set to 0.4 bar at the bottom of the module leading to a difference of 0.6 bar at the top due to the counter-current configuration. As it can be seen in figure V-2, the set-up is similar in principle to the first one. However, the Seprosys unit contains a second extraction set-up that can be used as a back-extraction

loop that continuously regenerates the organic phase when coupled to the extraction as in figure V-2. All flowrates are set to 15.3 mL/s. The extracted aqueous phase and organic phase volumes are set to 1 and 1.5L respectively. The volume of the back-extraction phase is set to 650 mL, unless otherwise specified, in order to concentrate 3-HP. Depending on the experiment, the whole quantity of 3-HP can be directly placed initially in the extracted vessel or gradually introduced at a specific rate using a peristaltic pump, mostly around 2.5 g/h, to mimic a microbial production. The temperature is kept constant to 25°C using jacketed vessels.

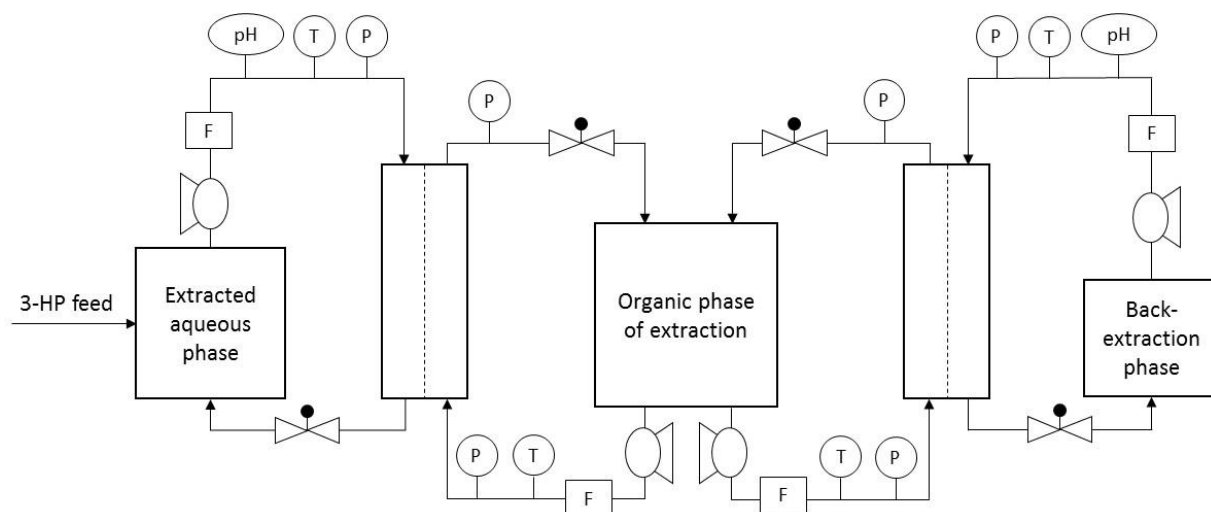


Figure V-2: Process and instrumentation diagram of the plant used for extraction and back-extraction. The membrane contactor modules used are Liqui-Cel's 2.5x8 containing the hollow-fiber membrane X50 in polypropylene. The module characteristics are detailed in Table V-3.

Table V-3: Characteristics of Liqui-Cel commercial modules used

Module 2.5x8		Fibers X50	
Material	Polypropylene	Material	polypropylene
Internal diameter	58.4 mm	Internal diameter	220 $\mu\text{m}$
Internal length	20.3 mm	External diameter	300 $\mu\text{m}$
Number of fibers	~ 9800	Effective length	146 mm
		Wall thickness	40 $\mu\text{m}$
		Porosity	40%
		Average pore diameter	0.03 $\mu\text{m}$

## 2.5. Analytical methods

The viscosity of some organic phases loaded with different amounts of 3-HP were determined using a cone and plate rheometer (Rheostress 600, Thermo Scientific). A linear shear rate ramp was performed from 0 to 100  $\text{s}^{-1}$  at 25°C. All samples displayed a perfectly Newtonian behavior and the viscosity was determined as being the slope of the measured shear stress vs. imposed shear rate curve.

Samples were taken over time in each vessel for concentration determination using HPLC as detailed in [28] except that glucose concentration is determined using a refractive index detector. Except when using microorganisms, aqueous samples were directly analyzed. When the phase contained microorganisms, the samples were filtered using syringes equipped with 0.2  $\mu\text{m}$  filters. 860  $\mu\text{L}$  of each filtrate are treated with 140  $\mu\text{L}$  of 90% trichloroacetic acid and left for an hour at 4°C. They were then centrifuged at 13 000 g for 10 minutes and the supernatants were analyzed. The organic samples are first back-extracted using the same volume of a solution of sodium hydroxide in excess and the resulting aqueous phases are then analyzed.

The overall recovery yield of 3-HP in the back-extraction phase is calculated according to:

$$Y = \frac{[AH]_{BE} V_{aq}^{BE}}{[AH]_E V_{aq}^E + [AH]_{org} V_{org} + [AH]_{BE} V_{aq}^{BE}} \quad (32)$$

With BE meaning back-extraction phase and E extraction phase.

When using microorganisms, the nitrogen content of the final extracted aqueous phase and back-extraction phase were determined using the commercial photometric method Nitrogen (total) Cell test 114537 from Merck Millipore with the Spectroquant® Multy spectrometer (Merck Millipore).

Anions concentrations were determined using capillary electrophoresis with Capillary Ion Analyzer containing a silica capillary (75  $\mu\text{m}$  x 60cm) from Waters. The hydrostatic injection lasted 30 seconds for a 6 minutes run applying a tension of 20 kV. The electrolyte solution is made of 4.6 mM of chromate ions, 0.5 mM of OFM-OH and 40 g/L of boric acid for a pH equal to 8. The detection is made using indirect UV absorption at 254 nm.

Tests were made to ensure that the yeasts were not able to consume 3-HP within the experimental conditions. 4 g/L of yeast were introduced in flasks containing 3-HP (4g/L), glucose (50 g/L), urea (1.7 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.5 g/L) and  $\text{MgSO}_4$  (0.12 g/L). The flasks remained magnetically stirred at 25°C for 24h and samples were taken. They revealed that 3-HP were not consumed and that the yeasts were completely inactivated as they did not consume glucose neither. Preliminary flow cytometry tests (not detailed here) as described in [30] revealed that 3-HP was extremely noxious for the cells used and that most of the microorganisms had no enzymatic activity. This is useful to know for analytics and mass balance verification.

Most of the experiments have been performed in duplicate unless specified otherwise.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Viscosity measurements

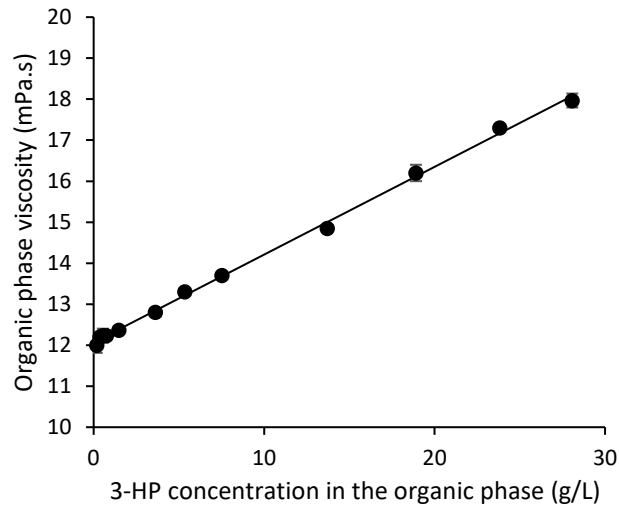


Figure V-3: Organic phase viscosity as a function of 3-HP concentration (25°C)

In the range tested, a linear correlation was found between the variation of the viscosity and the 3-HP concentration in the organic phase, validating the assumption made in section 2.1.5.3. :

$$\mu_{org} = 0.214C_{org} + 12.1 \quad (R^2 = 0.998) \quad (33)$$

Where  $\mu_{org}$  is the viscosity in mPa.s and  $C_{org}$  the 3-HP concentration in the organic phase in g/L. The viscosity increases by 50% when the acid concentration varies from 0 to 28g/L. The knowledge of this correlation allows us to replace  $\mu_{org}$  and  $\mu_{int}$  in equation 27 to obtain volumetric mass transfer coefficients depending in a known way on concentrations (equation 28). The system can then be numerically solved according to concentrations using the procedure described in section 2.1.7.

#### 3.2. Model calibration

First, when we observe the 3-HP concentration decrease in the extracted phase against time for every condition tested (figure V-4), it is found that the time of extraction ranges in the orders of magnitude  $10^3$  and  $10^4$  s while the order of magnitude of the residence times of the phases in the module were  $10^1$  s for both phases. The assumption about the unvarying concentrations along the fibers (section 2.1.1.) is thus validated.

As previously mentioned, the model needs the value of the volumetric mass transfer coefficient of the complex in the organic phase  $k_{CPX_{S_{org}}}$ . The required parameter values (porosity, tortuosity ...) to estimate this coefficient with theoretical and empirical relations being very uncertain,  $k_{CPX_{S_{org}}}$  was estimated based on data from a single experiment. The corresponding experiment is an extraction performed in the first extraction device: 1 g/L 3-HP initially in the aqueous phase and 500 mL of each phase.  $k_{CPX_{S_{org}}}$  was found to be around  $5.4 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3/\text{s}$ .

Two other extraction experiments have been performed in the Seprosys device using 1L of each phase with 1 g/L and 10 g/L 3-HP respectively in the aqueous phase initially. The results of these experiments are provided in figure V-4. The value of  $k_{CPX}S_{org}$  was left unchanged and model predictions are also plotted in figure V-4.

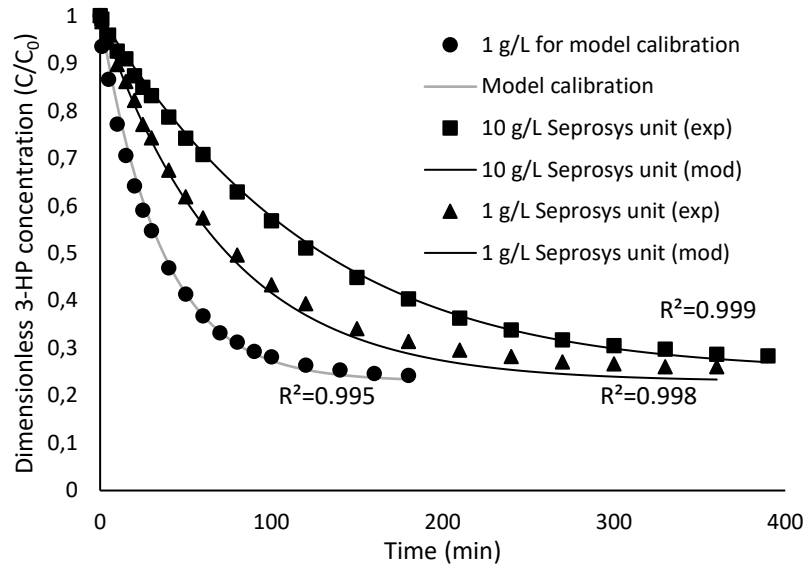


Figure V-4: Experimental and model results of 3-HP extraction for different initial concentrations and experimental devices

We can see that the predictions follow the experimental results very well ( $R^2 > 0.995$ ). Considering that the velocity of each phase has practically been doubled compared to the calibration experiment while changing the extraction unit, it is a strong indication that the transfer is mainly limited by the diffusion in the pores of the membrane. Moreover, it is noticeable that the extractions in the Seprosys unit are much slower than the calibration extraction. This is due to the fact that the volume of the extracted phase is doubled while the surface area of the membrane module remained the same.

### 3.3. Gradual addition of 3-HP

In order to simulate a fermentation, 3-HP has been added to the extracted vessel at a rate of 2.5 g/h. To avoid 3-HP accumulation in the extracted phase or in the organic phase, the latter was continuously regenerated with a 20 g/L sodium hydroxide solution using a second contactor module as in figure V-2. The initial volumes of the extracted, the organic and the back-extraction phases were 1L, 1.5L and 0.65L respectively. The organic phase volume had to be increased in order to fill both the extraction and the back-extraction loops. The experimental concentrations of the 3 phases are plotted against time in figure V-5 with the corresponding model predictions.

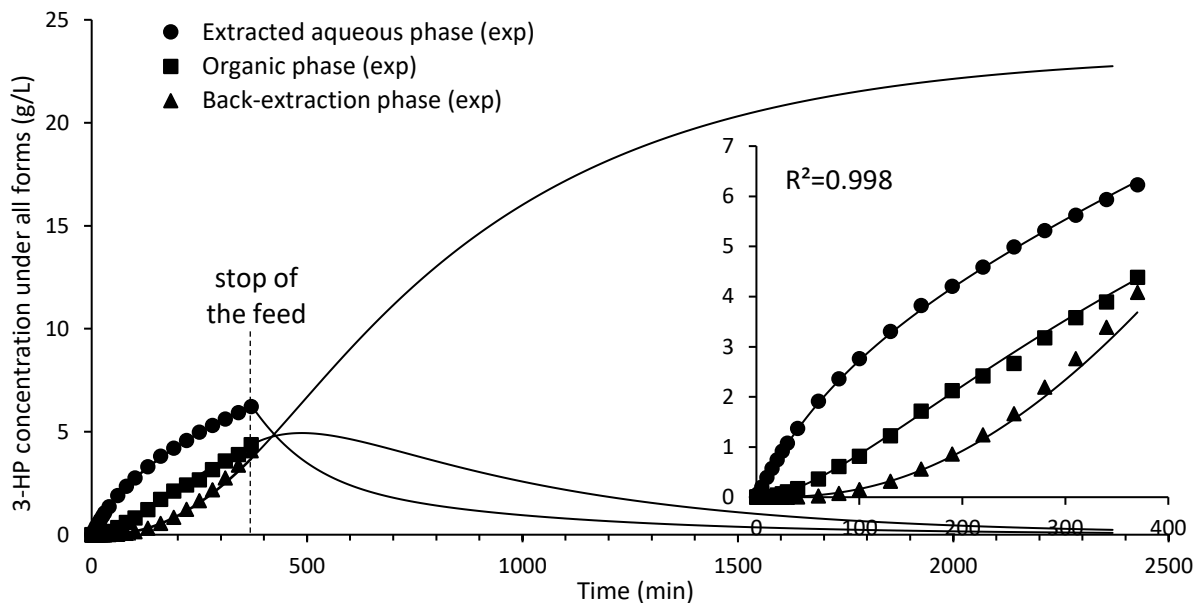


Figure 5: Experimental and predicted concentration evolution in the three phases with gradual 3-HP addition in the extracted phase during the first 370 minutes at 2.5 g/L/h

Here again, it is obvious that the model predicts correctly ( $R^2=0.998$ ) the experimental evolution of 3-HP concentration in each phase which is a good validation of the model in 3-HP feeding conditions.

However, we can see that the acid is accumulating in the 3 phases. Indeed, the extraction is not fast enough to compensate the addition of 3-HP for this feed rate and 3-HP concentration in the extracted phase reached 6.2 g/L at 370 min. 15.2 g of 3-HP were added to the system in the same time which means the extraction unit was able to divide by 2.5 the concentration in the extracted phase compared to a system without extraction. This accumulation in a totally non-buffered medium led to an important decrease in pH which was correctly predicted by the model (see figure V-6A) using the formula:

$$pH = -\log([H_3O^+]) \quad (30)$$

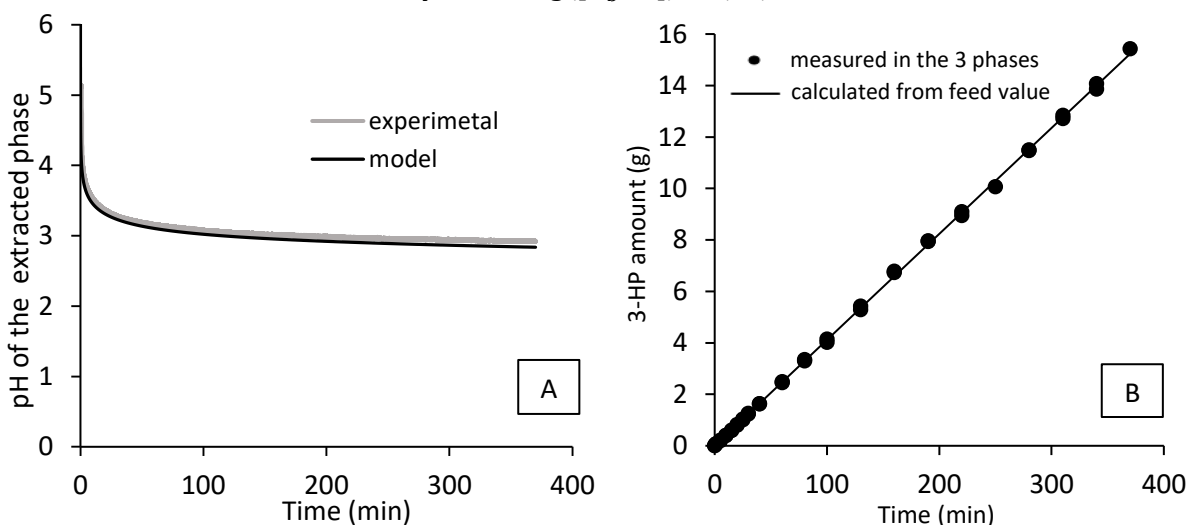


Figure V-6: Predicted and experimental pH evolution in the extracted phase with gradual 3-HP addition at 2.5 g/L/h (A) and calculated and measured amount of 3-HP in the system against time (B)

After 370 min, the feed was stopped and the system was allowed to reach equilibrium during 4 days. The model predicts a total depletion of the extracted and the organic phases while the concentration in the back-extraction phase increases. Experimentally, after the 4 days, only few 3-HP could be detected in the extracted phase around 0.1 g/L while the back-extraction phase reached a concentration of 23.9 g/L with all remaining 3-HP. This concentration is 1.57 times higher than what should have been found in the extracted phase if it were not extracted and it corresponds to a volume ratio of 1.54 between the extracted phase and the back-extraction phase. As the near totality of the product is recovered in the back-extraction step, the volume ratio determines the concentration factor. This is quite interesting if one wants to concentrate the product. In the considered configuration, the concentration of the 3-HP in the back-extraction phase is mainly limited by the NaOH concentration, as the back-extraction reaction is total. The overall recovery yield of 3-HP in the back-extraction phase is of more than 99%.

If we have a look at the experimental mass balance (figure V-6B), in average, the total amount of 3-HP measured in the system is  $100 \pm 2\%$  the theoretical amount brought by the feed. This is very accurate and we can consider that all the 3-HP in the system is quantified. Therefore, most of the time in the next experiments, only the concentrations in the extracted and the back-extracted phases will be determined and the concentration in the organic phase will be deduced from the mass balance and the feed applied.

#### 3.4. Steady state experiment

In order to check the possibility of a steady state in the extracted vessel using our experimental system, we decided to change the initial conditions in this experiment in order to get a steady state directly from the beginning of the experiment. We used the predictive model in order to find such conditions.

One possibility is the following:

- 3-HP feed rate: 0.5 g/h
- initial 3-HP concentration in the extracted phase: 1.6 g/L
- initial 3-HP concentration in the organic phase: 2.6 g/L

Such conditions were applied (volumes were the same as for the previous experiment except for the back-extraction set to 850 mL), and the evolution of 3-HP concentration in both aqueous phases were measured over time.

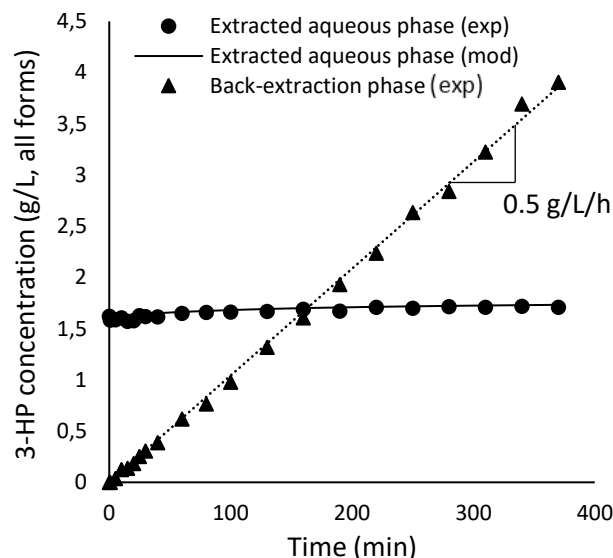


Figure V-7: Concentration evolution in the extracted and the back-extraction phases in the steady-state experiment conditions (dotted line: linear regression to calculate the slope)

We can see in figure V-7 that the prediction of the model was correct with 3-HP concentration remaining constant over time in the extracted phase. Accordingly, the concentration in the back-extraction phase increased linearly, becoming higher than the concentration in the extracted phase. The slope of the linear regression led to the 3-HP accumulation rate in the back-extraction phase of 0.5 g/h. This is the same value as the feed rate indicating that all the added 3-HP accumulated in the back-extraction phase. This demonstrates the ability of the system to keep a constant concentration in the extracted vessel while concentrating the product in another phase when 3-HP is produced. In the conditions of section 3.3. with a 3-HP feed of 2.5 g/L/h, according to our model, a steady 3-HP concentration in the extracted phase of 29 g/L is reached in 12 days if the back-extraction phase is continuously renewed.

### 3.5. Fermentation-like experiments

In this section, we focus on the experimental results with more complex media containing other molecules and salts and/or microorganisms together with 3-HP. The volumes of the phases are kept equal to 1, 1.5 and 0.65 L for the extracted, organic and back-extraction phases respectively and the 3-HP feed is set to 2.5 g/h for all the experiments. The feed is stopped at  $t=370$  min and the experiment is continued for 4 days with.

#### *3.5.1. Complex medium*

First, the components of the fermentation broth were added without microorganisms. The initial composition of the extracted phase was the following:



- glucose (50 g/L)
- urea (1.7 g/L)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.5 g/L)
- $\text{MgSO}_4$  (0.12 g/L)

The results of the experiment can be seen in figure V-8 in comparison with experimental results of section 3.3. with only gradual addition of 3-HP. Both sets of results are similar but it can be noticed that with the complex medium 3-HP accumulates slightly more in the extracted phase and accordingly less in the back-extraction phase. At the end of 3-HP addition, the extracted phase contains 9% more 3-HP than the same phase in section 3.3. As demonstrated in our previous work [29], we suspected an interaction with the salts. We already know that chloride and biphosphate anions are able to compete with deprotonated 3-HP for the trioctylammonium cation of the complex in the organic phase [29]. The result of this interaction is the release of the 3-HP anion in the aqueous phase while the other anion is extracted in the organic phase. After the 4 days, contrary to what was found in the experiment of section 3.3., about 0.6 g/L of 3-HP were left in the extracted phase and this is consistent with the release of 3-HP anion that cannot be extracted. This means that the biphosphate and sulfate anions are extracted and will eventually be found in the back-extraction phase, which can be problematic concerning the end-product purity and the nutrients needed by microorganisms. Nonetheless, the recovery yield of 3-HP in the back extracted phase is about 96%.

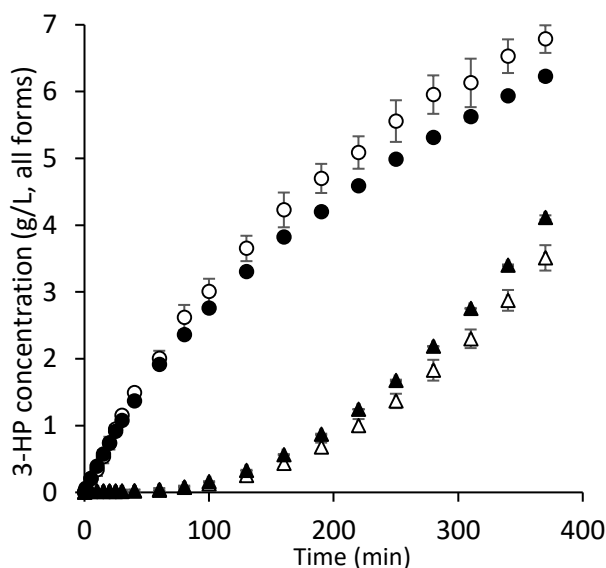


Figure V-8: Concentration evolution with 3-HP gradual addition at 2.5 g/L/h in the extracted (circles) and back-extraction (triangles) phases using a complex medium containing glucose, urea and salts (open symbols) compared to pure water (closed symbols)

Figure V-9A compares the amount of salts introduced initially in the extracted phase with the amount of salts found at the end in the back-extraction phase. It is obvious that most of the salts are extracted

and recovered with 3-HP in the back-extraction phase. This extraction system shows no selectivity towards the sulfate and the biphosphate anions even if the biphosphates seem less extracted than the sulfates. It is probably due to the poor anion exchange performance between 3-HP and biphosphates towards the trioctylammonium cation. Indeed, looking at the kinetics of anions release in the back-extraction phase, it can be seen that sulfate extraction is much faster than phosphate extraction (figure V-9B).

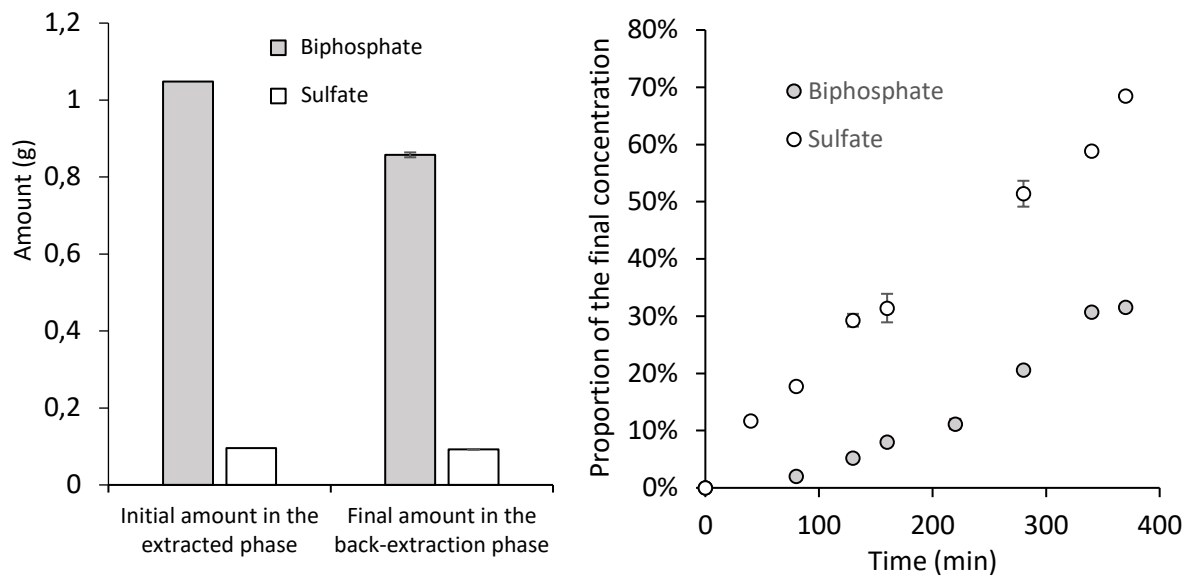


Figure V-9: Comparison of the amount of salts introduced in the complex medium and recovered in the back-extraction phase at the end of the experiment (A) and kinetics of salts release in the back-extraction phase

### 3.5.2. Presence of yeast

Next, the presence of yeasts in the extracted system was tested. The initial compositions of the extracted phase was the following:

- 2.2 g/L yeast (1 assay)
- 7.8 g/L yeast (1 assay)

The suspensions are opaque and cream white.

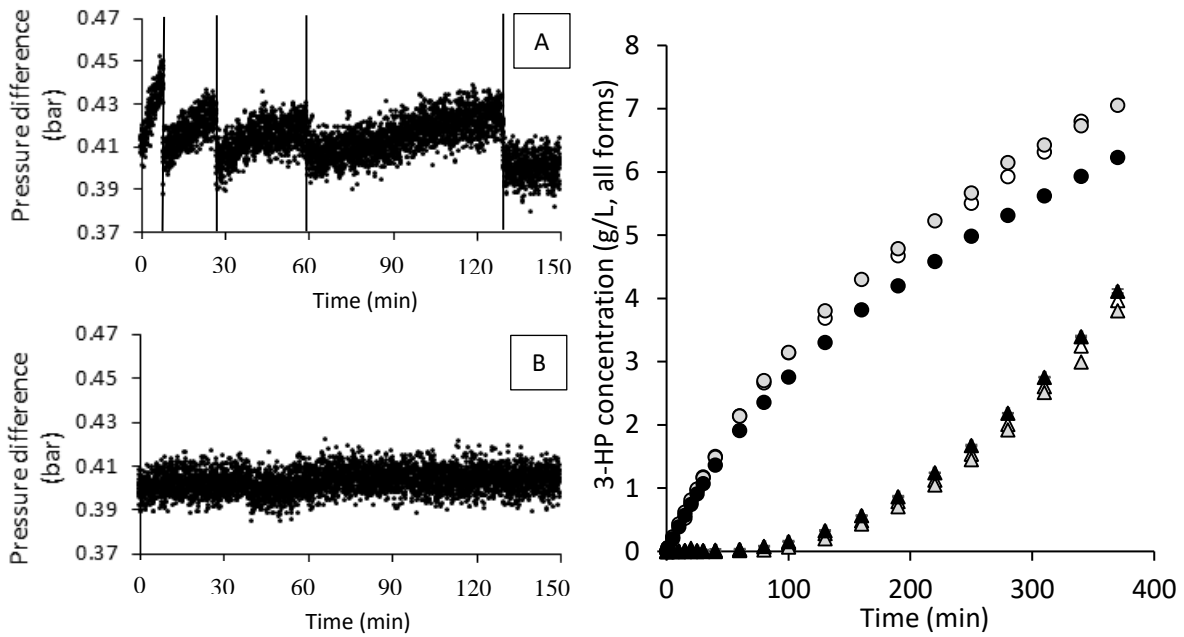


Figure V-10: Pressure difference between both phases along time at the extraction side (A) and at the back-extraction side (B) when using 7.8 g/L yeasts and concentration evolution with 3-HP gradual addition at 2.5 g/L/h in the extracted (circles) and back-extraction (triangles) phases using an aqueous phase containing yeasts (grey 2.2 g/L, white 7.8 g/L) compared to pure water (black symbols) (C)

First it was noticed at the beginning of the experiments that the pressure of the phase containing the microorganisms increased and took time to stabilize. The pressure measurements for the first hours of the experiment with 7.8 g/L of yeasts is shown as an example in figure V-10A. Indeed, when launching the experiment, the pressure difference was set to 0.4 bar between the outlet and the inlet of the extracted and the organic phases of the module respectively. However, when the aqueous phase contained microorganisms, the increase of pressure of the aqueous phase induced an increase of the pressure difference which is problematic for interface stability. During the first 2 hours, it was necessary to regularly use the needle valves in order to decrease the pressure and keep the difference around 0.4 bar. After 2 hours, the pressure was quite stable till the end of the experiment (4 days) at 0.4 bar. This behavior were only found where microorganisms were used and the pressure difference in the back-extraction loop of the same experiment for example was very stable (see figure V-10B). The increase of pressure could denote a gradual fouling of some parts of the wetted section area of the aqueous phase in the module, either by adsorption of the cells on the membrane wall or physical blockage of the fibers by the yeasts, until reaching a hydrodynamic equilibrium. All along the experiment, the extracted phase kept its cream white color while the organic and back-extraction phases stayed perfectly clear indicating that the cells were well retained by the membrane as expected. Concentration profiles are plotted in figure V-10C in comparison with results of section 3.3. without microorganisms. Here again, for both yeast concentrations used, the accumulation of 3-HP in the extracted phase is faster, meaning that it is less readily extracted. This time, at the end of 3-HP addition,

there were 13% more 3-HP in the extracted phase than in the pure water experiment in section 3.3. We suggest two possible explanations for this observation: (i) the reduction of the available interfacial area due to interactions of cells with the membrane module, (ii) the reduction of available protonated 3-HP due to the pH buffering power of the cells suspension, as further discussed in section 3.5.4. below. After the end of the experiment and 4 days of extraction, the 3-HP concentration left in the extracted phase was about 0.1 g/L as in section 3.3.. No trace was detected in the organic phase and the remaining amount was totally found in the back-extraction phase which makes a recovery yield of more than 99%.

### 3.5.3. Whole fermentation broth

The aim of this experiment is to evaluate the impact of a whole fermentation broth. For this, the initial composition of the extracted phase was:

- yeasts (4.0 g/L)
- glucose (50 g/L)
- urea (1.7 g/L)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.5 g/L)
- $\text{MgSO}_4$  (0.12 g/L)

Resulting concentration profiles are plotted in figure V-11 in comparison with the results of section 3.3.

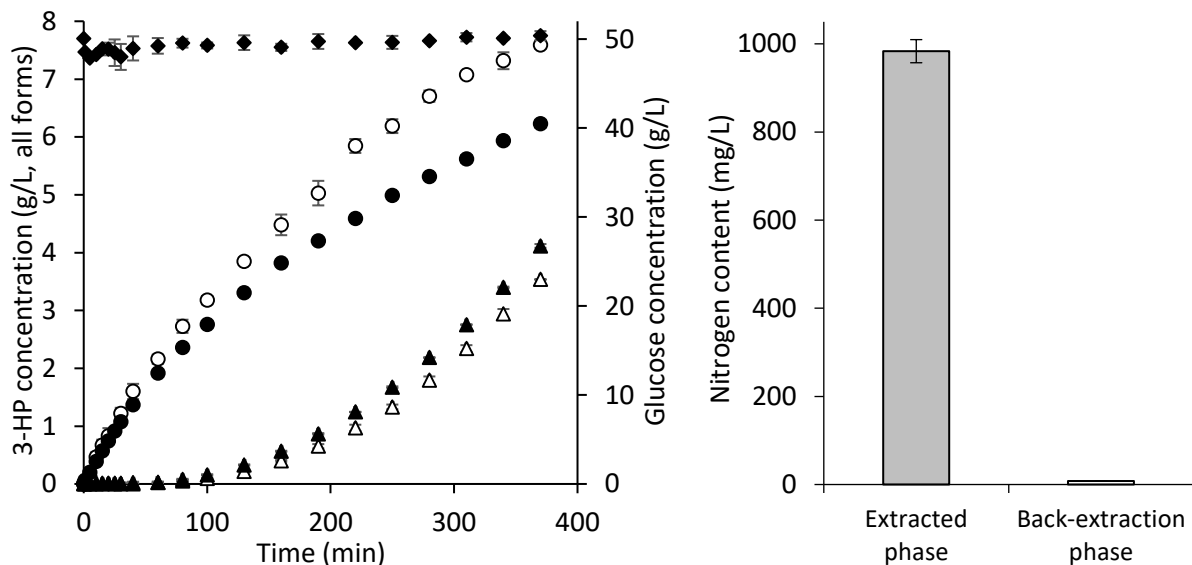


Figure V-11: 3-HP concentrations evolution with 3-HP gradual addition at 2.5 g/L/h in the extracted (circles) and back-extraction (triangles) phases and glucose concentration in the extracted phase (closed diamonds) using a whole fermentation broth (open symbols) compared to pure water (closed symbols) (A) and nitrogen concentration in the extracted and the back-extraction phases at the end of the experiment (4 days) (B)

The profiles are similar to the previous experiments except that 3-HP accumulates even more in the extracted phase as could be expected because of the cumulating effects of both the yeasts and the chemicals dissolved in the broth. At the end of 3-HP addition, there were 22% more 3-HP in the extracted phase than in the experiment of section 3.3. The same mechanisms mentioned in sections 3.5.1. and 3.5.2 are expected to explain this accumulation. At the end of the experiment (4 days), 0.4 g/L of 3-HP remain in the extracted phase out of the 15 g of 3-HP added which makes a final recovery yield of more than 97% in the back-extraction phase.

An interesting point in this experiment is the selectivity of the extraction with respect to the fermentation substrate and nitrogen compounds. It can be seen in figure V-11A that glucose concentration remains constant in the broth, demonstrating that it is not extracted by the organic phase used. The nitrogen amount has also been checked at the end of the experiment. Nitrogen originates from nitrogen compounds initially introduced in the medium (in this study urea) and from biological molecules like proteins or amino acids. It was found that the nitrogen content in the back-extraction phase (<10 mg/L) was 128 times lower than in the final extracted phase (figure V-11B). It means that nitrogen compounds were retained in the extracted phase. The really high selectivity of 3-HP against glucose and nitrogen compounds is very interesting for its purification in a bio-based process and for the purpose of an in-situ product recovery where substrates and nitrogen sources have to remain in the bioreactor.

#### 3.5.4. pH evolution

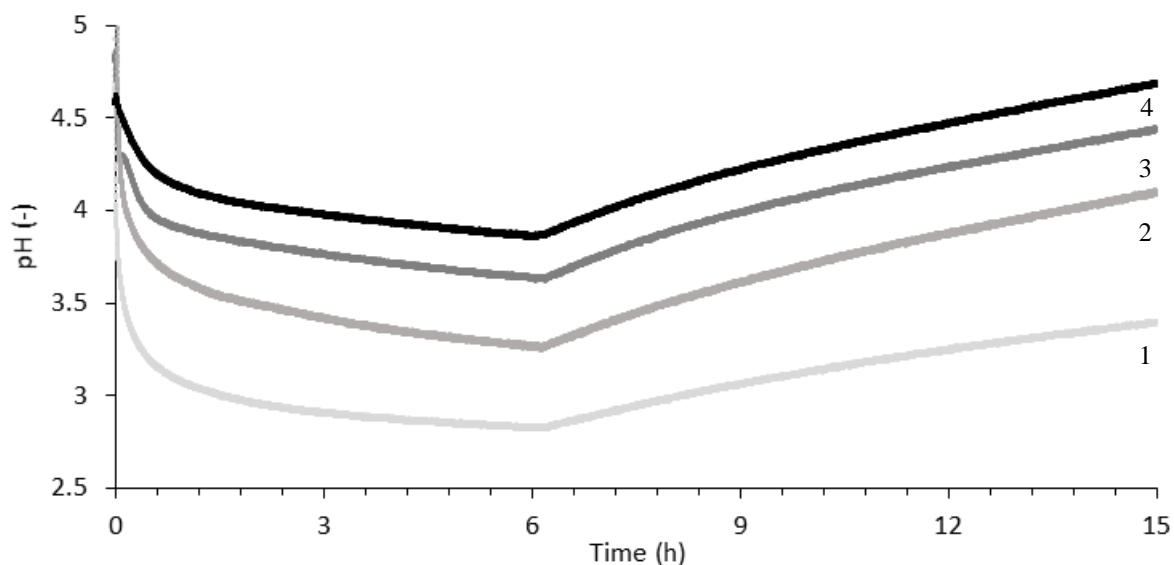


Figure V-12: pH evolution in the extracted phases of the experiments performed with gradual 3-HP addition at 2.5 g/L/h (1 pure water; 2 pure water with yeast 7.8 g/L; 3 complex medium; 4 complex medium + yeasts 4 g/L)

The pH have been measured over time in all the extraction-back-extraction experiments and the evolution is plotted in figure V-12. All the curves have the same trend: first the pH decreases during the accumulation of the acid and, when 3-HP addition is stopped, the removal of the acid in the extracted phase induces the increase of the pH progressively to the initial value. From the upper curve till the last one, pH is higher but 3-HP concentration is also higher (see corresponding experiments in sections 3.3, 3.5.1, 3.5.2. and 3.5.3). It means that the pH values depend on other parameters than 3-HP concentration. Curve 2 represents the experiment using yeasts (7.8 g/L) in the extracted phase. The higher pH values compared to curve 1 are due to the buffering capacity of the cells. However, this buffering capacity is not enough to maintain a high pH and it falls around 3.3 which means 0.5 point higher than experiment of section 3.3 with pure water. In curve 3, it can be observed that the initial slope of the curve is weaker than in curves 1 and 2. It is due to the presence of salts in the extracted media. Indeed, we have shown previously that the anion of the salts were extracted in the aqueous phase and substituted by the carboxylate form of 3-HP. The release of the carboxylates compensates the 3-HP accumulation at the beginning of the extraction and the pH decrease is slower. pH depending on the ratio between the protonated and the deprotonated forms of 3-HP, a higher concentration in carboxylates leads to higher pH during the whole time of the experiment. At the end of 3-HP feeding, the pH values are accordingly 0.8 point higher than the values in curve 1. Curve 4 combines both effects observed in curves 2 and 3 and in this case pH values are even higher. At the end of the 3-HP feeding, pH values remain around 3.9 which is very close to the set-point value in the reference fermentation [16] i.e. pH=4.0. However, this high value comes from 3-HP neutralization due to salts extraction which is not desired. Nevertheless, at the end of the 3-HP addition, a pH of 4.0 without 3-HP extraction would lead to a protonated 3-HP concentration of 11.8 g/L while in the results with the yeasts (7.8 g/L, section 3.5.2.) even at pH=3.3 it leads to a protonated 3-HP concentration of 6.6 g/L, i.e. almost twice lower.

#### 4. Conclusion

We developed a dynamic model to predict 3-hydroxypropionic acid reactive extraction using trioctylamine in decanol in membrane contactors. This model mainly relies on instantaneous species complexation at the aqueous-organic phases interface and diffusion in the membrane pores filled with organic phase. For the sake of modeling accuracy, the increase in viscosity as a function of the acid concentration in the organic phase (up to 50% at 28 g/L) had to be taken into account. Hence, the model includes an average organic mass transfer coefficient taking into account acid concentration variation with time and along the pore. The model was proved to be predictive and accurate ( $R^2 > 0.995$ ) in the case of forward reactive extraction and was extended to include simultaneous extraction and back-extraction using sodium hydroxide with an additional membrane contactor to regenerate the

organic phase. Except the extension of mass balances, no further modifications were needed and the model accurately predicted the coupling of extraction and back-extraction systems in transient or steady state regimes ( $R^2 > 0.995$  for all the experiments). No need were found to take specific chemical kinetics and interfacial resistance into account. Experiments were then undertaken to evaluate process performances in bioconversion-like conditions. Aqueous media with gradual complexity were prepared by adding substrate, a nitrogen source, salts and microorganisms and used and 3-HP was fed at the rate of an industrial fermentation process i.e. 2.5 g/L/h. However, after the stop of the feed, near complete recovery of 3-HP in the back-extraction phase was achieved. Almost total selectivity towards the substrate (100% retained in the bioconversion broth) and nitrogen compounds (>99% retained) was demonstrated but unfortunately this was not the case for the salts whose anions were extraction along with 3-HP. Some evidence of the module fouling by the microbial cells for the first 2h of experiment was found but then the process remained stable for the rest of the time (4 days). Nevertheless, even if in such a configuration and conditions 3-HP still accumulated in the broth, its concentration remained more than 2.5 times lower than what would have been reached without extraction. Moreover, the development of the model will be very useful to formulate new extraction systems for example to further enhance the selectivity or reduce toxicity while maintaining good extraction performances.

### Appendix 1: determination of the species mass transfer coefficient from the complex mass transfer coefficient

If we assume that, concerning the solutes, the coefficient is only proportional to the diffusion coefficient, then it can be written:

$$\frac{k_i}{D_i} = \frac{k_{CPX}}{D_{CPX}} \quad \text{or} \quad k_i = \frac{D_i}{D_{CPX}} k_{CPX}$$

The Wilke-Chang correlation states that the diffusion coefficient is inversely proportional to the molar volume of the solute power 0.6 (equation 25). In the ratio of diffusion coefficients, the coefficient of proportionality is simplified and it leads to:

$$k_i = \left( \frac{v_{CPX}}{v_i} \right)^{0.6} k_{CPX}$$

### Appendix 2: average mass transfer coefficient in the membrane pores

As we know the variation of viscosity with the acid concentration (equation 33), it leads to:

$$D_{A,org}(C_{org}) = D_{A,org}^0 \times \frac{\mu_{org}^0}{\mu_{org}(C_{org})}$$

Where  $D_{A,org}^0$  and  $\mu_{org}^0$  are reference values known for a given acid concentration, for example  $C_{org} = 0$ .

The variation of the membrane mass transfer coefficient with concentration is then similarly given by:

$$k_{m,A}(C_{org}) = k_{m,A}^0 \times \frac{\mu_{org}^0}{\mu_{org}(C_{org})}$$

The concentration gradient along the membrane pores induces a diffusion coefficient gradient which leads to a variation of mass transfer coefficient along the pores. It is thus possible to find a relation for an average mass transfer coefficient along the pores:

$$\overline{k_{m,A}} = \frac{1}{C_{org} - C_{int}} \int_{C_{int}}^{C_{org}} k_{m,A}(C) dC = \frac{k_{m,A}^0 \mu_{org}^0}{C_{org} - C_{int}} \int_{C_{int}}^{C_{org}} \frac{dC}{\mu_{org}(C)}$$

As the viscosity is an affine function of the concentration, this leads to:

$$\overline{k_{m,A}}(t) = k_{m,A}^0 \times \frac{\mu_{org}^0}{\mu_{org,lm}(t)}$$

With  $\mu_{org,lm}$  is the logarithmic mean of the viscosity between the inlet and the outlet of the pores



## 5. Références

- [1] A.S. Kertes, C.J. King, Extraction Chemistry of Fermentation Product Carboxylic Acids, *Biotechnology and Bioengineering*. 28 (1986) 269–282.
- [2] National Research Council, Separation and Purification: Critical Needs and Opportunities, The National Academies Press, Washington, DC, 1987. doi:10.17226/19188.
- [3] A.M. Baniel, A.M. Eyal, J. Mizrahi, B. Hazan, R.R. Fisher, J.J. Kolstad, B.F. Stewart, Lactic acid production, separation and/or recovery process, US 5,510,526, 1996.
- [4] B.I. Veldhuis-Stribos, J. Van Breugel, W.J. Groot, B.M. Dierdorp, Continuous process for preparing lactic acid, WO 01/27064 A1, 2001.
- [5] K. Ye, S. Jin, K. Shimizu, Performance improvement of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation, *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 81 (1996) 240–246.
- [6] V.M. Yabannavar, D.I.C. Wang, Extractive fermentation for lactic acid production, *Biotechnology and Bioengineering*. 37 (1991) 1095–1100.
- [7] M.-T. Gao, T. Shimamura, N. Ishida, E. Nagamori, H. Takahashi, S. Umemoto, T. Omasa, H. Ohtake, Extractive lactic acid fermentation with tri-n-decylamine as the extractant, *Enzyme and Microbial Technology*. 44 (2009) 350–354. doi:10.1016/j.enzmictec.2008.12.001.
- [8] M. Matsumoto, M. Nishimura, Extractive Fermentation of Lactic Acid with *Hiochi* Bacteria in a Two-Liquid Phase System, *Fermentation Technology*. 5 (2016). doi:10.4172/2167-7972.1000129.
- [9] V.P. Lewis, S.T. Yang, A novel extractive fermentation process for propionic acid production from whey lactose, *Biotechnology Progress*. 8 (1992) 104–110.
- [10] Z. Wu, S.-T. Yang, Extractive fermentation for butyric acid production from glucose by *Clostridium tyrobutyricum*, *Biotechnology and Bioengineering*. 82 (2003) 93–102. doi:10.1002/bit.10542.
- [11] Z. Gu, D.A. Rickert, B.A. Glatz, C.E. Glatz, Feasibility of propionic acid production by extractive fermentation, *Le Lait*. 79 (1999) 137–148.
- [12] M.S. Solichien, D. O'Brien, E.G. Hammonf, C.E. Glatz, Membrane-based extractive fermentation to produce propionic and acetic acids: Toxicity and mass transfer considerations, *Enzyme and Microbial Technology*. 17 (1995) 23–31.
- [13] Z. Jin, S.-T. Yang, Extractive fermentation for enhanced propionic acid production from lactose by *Propionibacterium acidipropionici*, *Biotechnology Progress*. 14 (1998) 457–465.
- [14] R. Nelson, D. Peterson, E. Karp, G. Beckham, D. Salvachúa, Mixed Carboxylic Acid Production by *Megasphaera elsdenii* from Glucose and Lignocellulosic Hydrolysate, *Fermentation*. 3 (2017) 10. doi:10.3390/fermentation3010010.
- [15] C. Miller, A. Fosmer, B. Rush, T. McMullin, D. Beacom, P. Suominen, Industrial Production of lactic acid, in: *Comprehensive Biotechnology*, 2nd ed., Elsevier, 2011: pp. 179–188.
- [16] T.W. Abraham, E. Allen, J.J. Hahn, P. Tsobanakis, E.C. Bohnert, C.L. Frank, Recovery of 3-hydroxypropionic acid, US 2016/0060204 A1, 2016. <http://www.google.com/patents/US20160060204> (accessed September 7, 2017).
- [17] H.J. Jessen, B. Rush, J. Huryta, B. Mastel, A. Berry, D. Yaver, M. Catlett, M. Barnhart, Composition and methods for 3-hydroxypropionic acid production, US 2012/0135481 A1, 2012.
- [18] J.G. Crespo, I.M. Coelho, R.M.C. Viegas, Membrane contactors: Membrane separations, in: *Encyclopedia of Separation Science*, 2000: pp. 3303–3311.
- [19] R. Basu, K.K. Sirkar, CITRIC ACID EXTRACTION WITH MICROPOROUS HOLLOW FIBERS, *Solvent Extraction and Ion Exchange*. 10 (1992) 119–143. doi:10.1080/07366299208918095.
- [20] R. Basu, K.K. Sirkar, Hollow fiber contained liquid membrane separation of citric acid, *AIChE Journal*. 37 (1991) 383–393.
- [21] R.-S. Juang, J.-D. Chen, Mass transfer modeling of citric and lactic acids in a microporous membrane extractor, *Journal of Membrane Science*. 164 (2000) 67–77.
- [22] H. Huang, S.-T. Yang, D.E. Ramey, A hollow-fiber membrane extraction process for recovery and separation of lactic acid from aqueous solution, in: *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003*, in Breckenridge, CO, Springer,

- 2004: pp. 671–688. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-837-3\\_54](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-837-3_54) (accessed October 6, 2017).
- [23] K.L. Wasewar, A.B.M. Heesink, G.F. Versteeg, V.G. Pangarkar, Equilibria and kinetics for reactive extraction of lactic acid using Alamine 336 in decanol, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 77 (2002) 1068–1075. doi:10.1002/jctb.680.
- [24] M.E. Marti, T. Gurkan, L.K. Doraiswamy, Equilibrium and Kinetic Studies on Reactive Extraction of Pyruvic Acid with Trioctylamine in 1-Octanol, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 50 (2011) 13518–13525. doi:10.1021/ie200625q.
- [25] F. Chemarin, M. Moussa, F. Allais, V. Athès, I.C. Trelea, Mechanistic modelling and equilibrium prediction of organic acids reactive extraction with amines: comparative study of 2 complexation-solvation models in the case of 3-hydroxypropionic acid, *Separation and Purification Technology*. (2017).
- [26] F. Chemarin, M. Moussa, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, Recovery of 3-hydroxypropionic acid from loaded organic phases after reactive extraction with tertiary amines in an alcohol-type solvent, To Be Submitted. (2017).
- [27] F. Kohler, E. Liebermann, G. Miksch, C. Kainz, Thermodynamics of the acetic acid-triethylamine system, *The Journal of Physical Chemistry*. 76 (1972) 2764–2768.
- [28] F. Chemarin, M. Moussa, M. Chadni, B. Pollet, P. Lieben, F. Allais, I.C. Trelea, V. Athès, New insights in reactive extraction mechanisms of organic acids: An experimental approach for 3-hydroxypropionic acid extraction with tri-n-octylamine, *Separation and Purification Technology*. 179 (2017) 523–532. doi:10.1016/j.seppur.2017.02.018.
- [29] F. Chemarin, V. Athès, M. Bedu, T. Loty, F. Allais, M. Moussa, Towards an In Situ Product Recovery of bio-based 3-hydroxypropionic acid: influence of bioconversion broth components on membrane-assisted reactive extraction, Submitted to *Separation and Purification Technology*. (2017).
- [30] G. Burgé, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, F. Chemarin, M. Kniest, F. Allais, H.-E. Spinnler, V. Athès, Towards an extractive bioconversion of 3-hydroxypropionic acid: study of inhibition phenomena: Evaluation of bacterial cell inhibition during 3-HP extractive bioconversion, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. (2017). doi:10.1002/jctb.5253.

## 6. Résultats principaux et remarques supplémentaires

- La viscosité de la phase organique augmente linéairement avec la concentration en acide en phase organique au moins jusqu'à 28 g/L
- Un modèle de transfert dynamique en contacteur membranaire est proposé et se base sur l'observation expérimentale de la variation de la viscosité et sur les mécanismes physicochimiques de complexation et de partage de l'acide entre les deux phases. Il suppose un équilibre instantané à l'interface liquide-liquide et néglige totalement les cinétiques chimiques. Le modèle s'est avéré extrêmement prédictif sans ajustement spécifique aux expériences avec un  $R^2 > 0,995$  pour toutes les expériences que ce soit l'extraction seule ou avec la dés extraction, avec une concentration en acide stationnaire ou transitoire.
- La mise en œuvre du procédé d'extraction-dés extraction a montré sa capacité à extraire la totalité du 3-HP présent dans la phase aqueuse.
- La présence d'un milieu complexe pour la fermentation montre que le transfert est très sélectif pour le 3-HP par rapport au substrat et aux composé azotés mais pas du tout par rapport aux anions des sels du milieu qui sont extraits.
- La présence de microorganismes tend à diminuer la cinétique de transfert probablement par la réduction de la surface disponible par quelque phénomène de blocage et par effet tampon sur le pH mais la totalité du 3-HP a pu finalement être extraite.

La nouvelle modélisation présentée dans cette publication nous a permis de prendre en compte les effets de la concentration en acide sur la viscosité de la phase organique et donc sur les flux de matière. Pour évaluer l'importance de ce phénomène, nous présentons dans le graphique en figure V-13 les prédictions du modèle pour différentes concentrations initiales en acide en phase aqueuse avec et sans prise en compte des effets viscosité.

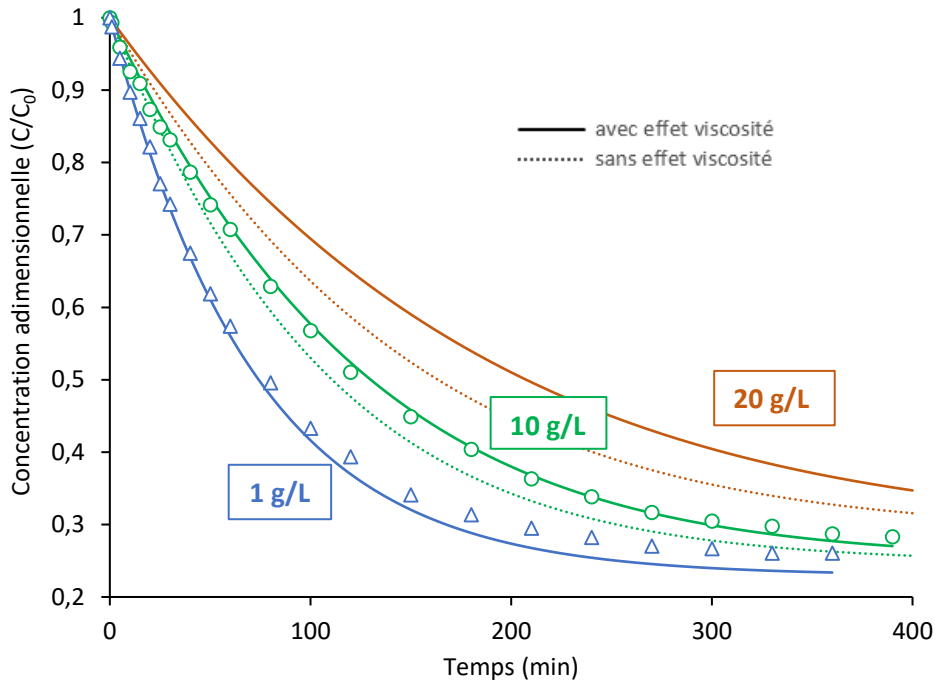


Figure V-13 : Evolution de la concentration en 3-HP dans la phase aqueuse pour différentes concentrations initiales en mode extraction simple (symboles : points expérimentaux, lignes : modèles)

On peut voir que pour les faibles concentrations le fait d'inclure les effets de viscosité dans le modèle ne fait que ralentir légèrement l'extraction par rapport à un modèle où la viscosité de la phase organique reste constante. Ceci est dû à une concentration en acide qui reste relativement faible en phase organique et qui ne change pas grandement la viscosité ni donc le coefficient de transfert. Les deux modèles se chevauchent pour 1 g/L. Toutefois pour 10 g/L, la déviation est déjà notable et le modèle avec variation de viscosité se rapproche plus des points expérimentaux. En augmentant encore la concentration en 3-HP à 20 g/L dans la modélisation, on peut voir que l'écart entre les prédictions se creuse encore plus. On peut penser qu'augmenter encore la concentration devrait ralentir encore plus la cinétique mais on sortirait de la gamme de validation de la corrélation liant la viscosité et la concentration en 3-HP en phase organique en ce qu'il s'agit des concentrations interfaciales.

Regardons plus précisément ce qu'il se passe à l'interface lors d'une extraction pour les trois espèces principales mises en jeu : l'acide sous forme non-dissociée en phase aqueuse, la TOA et le complexe en phase organique (figure V-14). On réalise une extraction d'une solution de 3-HP à 10 g/L. Au départ, les concentrations en 3-HP et en TOA sont celles fixées par les conditions initiales et la concentration en complexe en phase organique est nulle. Cependant, à l'interface, il en est autrement. La TOA est consommée pour former le complexe à l'interface, sa concentration interfaciale est donc inférieure à celle du bulk. Quant au 3-HP en phase aqueuse, il est consommé à l'interface et donc sa concentration interfaciale est aussi plus faible que celle du bulk mais la résistance au transfert dans la phase aqueuse est tellement faible que la différence est minime. Pour le complexe, c'est l'inverse. Il est formé à

l'interface et donc sa concentration interfaciale est supérieure à celle du bulk. Au court du temps, les concentrations interfaciales et dans les bulks se rapprochent et l'équilibre est atteint quand celles-ci sont égales.

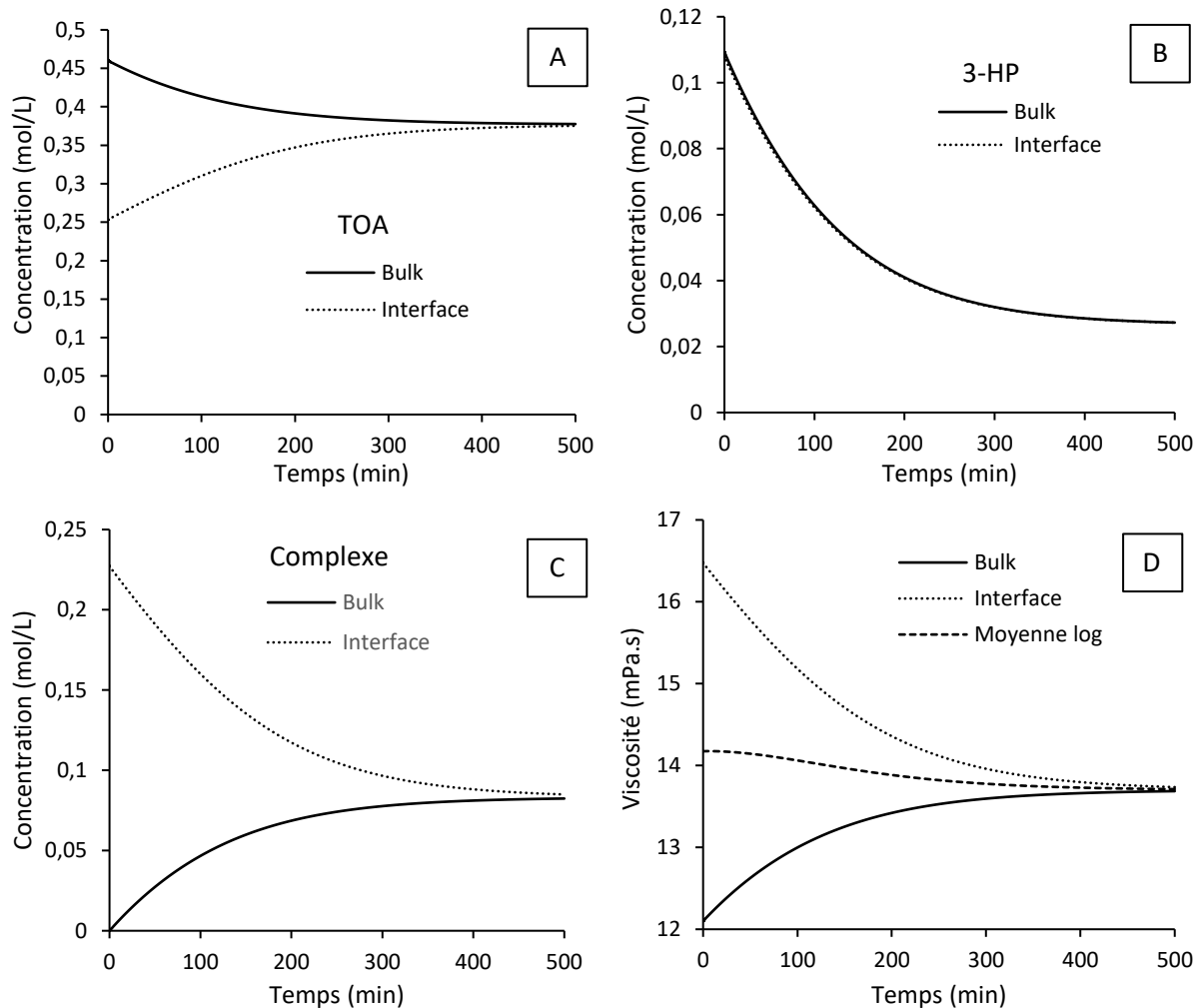


Figure V-14 : variation de la concentration en TOA (A) et en complexe (C) en phase organique et de la concentration en 3-HP non-dissocié (B) en phase aqueuse à proximité de l'interface liquide-liquide et dans le bulk correspondant au cours du temps (modèle) et variation de la viscosité (D) de la phase organique à proximité de l'interface et dans le bulk au cours du temps avec la moyenne logarithmique des deux (modèle)

La forte concentration en complexe à l'interface induit une viscosité élevée à proximité de l'interface en comparaison du bulk au début de l'extraction. Toutefois, comme la viscosité près de l'interface diminue alors que celle du bulk augmente avec le temps, la moyenne logarithmique ne varie que peu et donc le coefficient de transfert du complexe dans la membrane devrait être essentiellement constant au cours du temps. Cependant, il est tout de même autour de 15% plus faible qu'en absence de 3-HP. La figure V-15 montre les coefficients de transfert au cours du temps pour différentes concentrations initiales en 3-HP par rapport au coefficient de transfert dans un système ne contenant pas de 3-HP ou ignorant les variations de viscosité ( $k_0$ ). On voit clairement qu'une augmentation de la

concentration conduit à une diminution du coefficient de transfert du complexe. Comme vu précédemment, les coefficients de transfert ne varient que légèrement en fonction du temps. Cependant, de façon plus étonnante, selon les concentrations initiales, les variations peuvent ne pas être du même signe ni même monotones en fonction du temps.

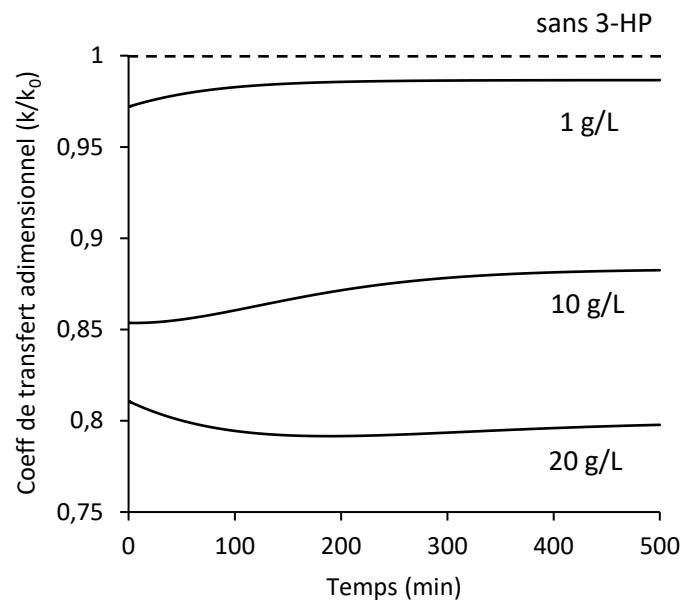


Figure V-15 : variation du coefficient de transfert au cours du temps lors d'une extraction simple pour différentes concentrations initiales en 3-HP dans la phase aqueuse (modèle)

Un autre exemple de la nécessité de la prise en compte de la variation de viscosité se trouve dans la figure V-16. Elle représente les résultats pour une expérience avec ajout graduel de 3-HP correspondant à une productivité de 2,5 g/L/h couplée à la désextraction comme dans le cas de la section 3.3. de la publication n°5. Les points expérimentaux ainsi que les résultats des modèles avec et sans variation de viscosité sont présentés. Encore une fois, il est flagrant que la prise en compte de la variation de viscosité impact le transfert et doit être prise en compte dans le modèle afin de prédire correctement les variations de concentrations. Le coefficient de transfert en phase organique diminue fortement avec le temps et au bout de 8h la diminution atteint 17% par rapport au coefficient initial

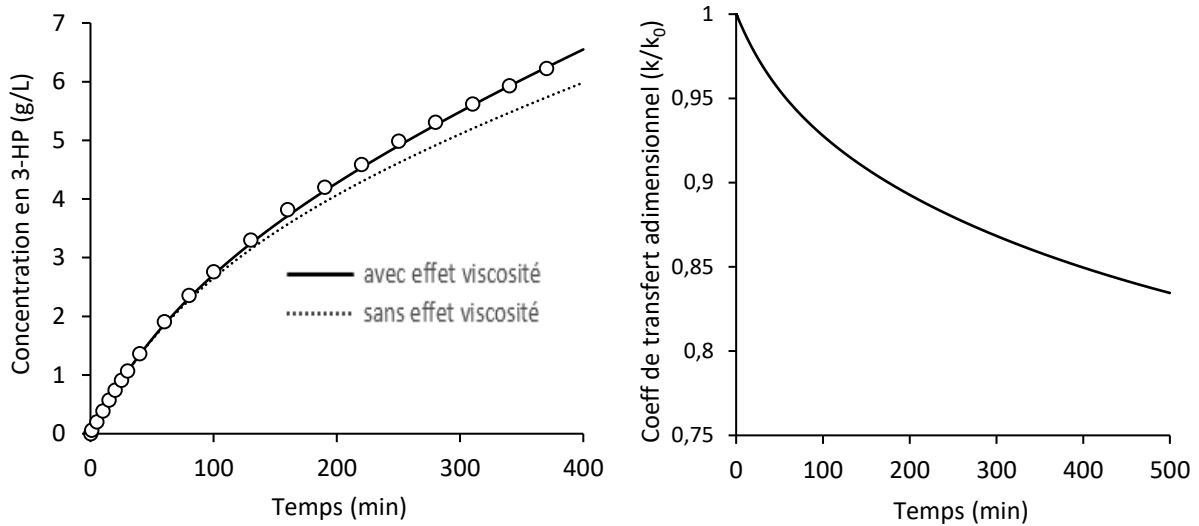


Figure V-16 : Evolution de la concentration en 3-HP dans la phase aqueuse au cours du temps lors d'un ajout graduel de 2,5 g/L/h avec extraction et désorption dans le cas de la section 3.3. de la publication n°5 (symboles : points expérimentaux, lignes : modèles) (A) et évolution du coefficient de transfert pendant la même expérience (modèle) (B)

Le modèle présenté ici dépend seulement d'un couple de paramètres inconnus à déterminer expérimentalement : la constante d'équilibre de complexation ( $K_{11}$ ) et la viscosité de la phase organique ( $\mu$ ). Il est alors possible d'extrapoler les résultats du modèle pour d'autres couples ( $K_{11}$  ;  $\mu$ ) et ainsi de sélectionner un système d'extraction par rapport à une contrainte imposée. Par exemple, on peut se fixer la concentration stationnaire maximum voulue en acide dans la phase aqueuse pour des conditions expérimentales données. Dans la suite, le partage physique ne sera pas pris en compte car spécifique à un solvant donné et donc non-extrapolable. Cependant, les solvants devant être relativement apolaires pour ne pas être solubles dans l'eau, il est quasi certain que le partage physique du 3-HP puisse être négligé dans ces méthodes de calcul d'estimations.

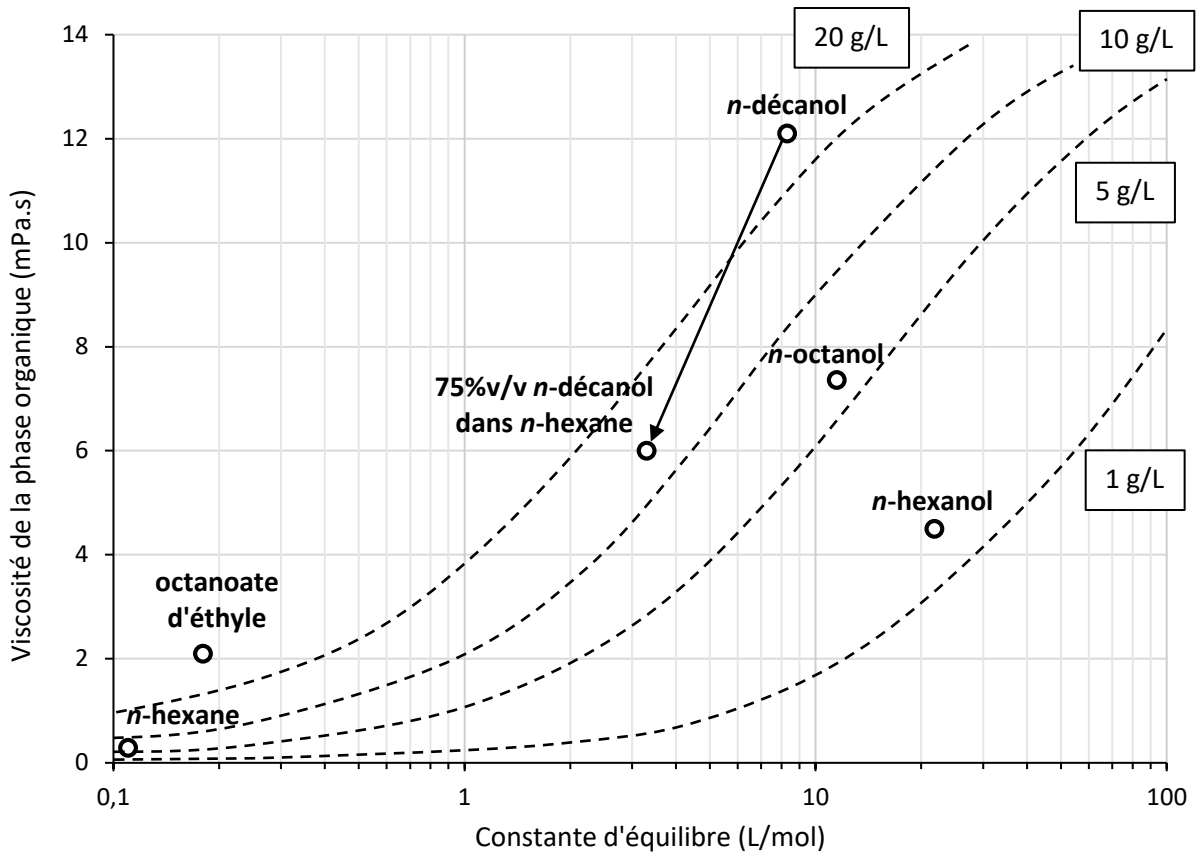


Figure V-17 : Abaque réalisé à l'aide du modèle permettant d'estimer la concentration stationnaire en 3-HP pour une alimentation de 2,5 g/L/h en 3-HP en fonction de la constante d'équilibre de complexation dans un solvant et la viscosité de ce solvant (symboles : positions de différents solvants dans cet espace)

Les courbes sur le graphe de la figure V-17 sont des courbes d'isoconcentrations stationnaires et représentent les ensembles de couples ( $K_{11}$  ;  $\mu$ ) pour des concentrations stationnaires à ne pas dépasser dans la phase aqueuse dans les conditions expérimentales de la section 3.3 de la publication n°5. Les symboles représentant les solvants sont placés selon les estimations des coordonnées de chaque solvant dans l'espace à deux dimensions des constantes d'équilibres et des viscosités. Si un symbole est en dessous d'une courbe d'isoconcentration, cela signifie que la concentration stationnaire sera inférieure à celle de la courbe correspondante. Ces coordonnées, à l'exception du décanol, sont estimées car calculées à partir des résultats d'une seule extraction, résultats présentés en publication n°1. La valeur pour le mélange d'hexane et de décanol est estimée à partir des résultats de la référence suivante :

Rana Bounader, *Extraction réactive in situ de l'acide 3-hydroxypropionique assistée par contacteur membranaire*, AgroParisTech, rapport de stage de master 2, 2013.

Ce genre d'abaque peut être utile à la formulation d'une phase organique lorsque les conditions d'expériences sont préalablement connues. Jusqu'à présent, le principal facteur envisagé dans le choix des solvants était le rendement d'extraction (ce qui correspond à une constante d'équilibre). Le



système d'extraction était alors choisi comme étant celui avec le plus fort rendement. Mais le graphe montre que, pour une même concentration stationnaire, l'on peut très bien rogner sur la constante d'équilibre si le système d'extraction montre une viscosité plus faible. Par exemple, l'ajout d'hexane dans le décanol diminue la viscosité plus rapidement que la constante d'équilibre par rapport aux courbes d'isoconcentrations stationnaires. Ceci signifie que rajouter de l'hexane au décanol aura tendance à diminuer l'accumulation finale en 3-HP dans la phase aqueuse.



# **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

L'acide 3-hydroxypropionique (3-HP) est un composé biosourcé d'intérêt industriel principalement pour la production d'acide acrylique et dérivés et de polyesters. Sa production est surtout envisagée par voie biotechnologique à partir de glycérol et de glucose. Traditionnellement, les acides carboxyliques comme l'acide lactique sont plutôt produits par des bactéries. Cependant, la production du métabolite conduit à une acidification du milieu qui est délétère pour les bactéries qui nécessitent en général un pH assez proche de la neutralité pour maintenir une activité biologique conséquente. L'acide produit doit alors être neutralisé au fur et à mesure par l'ajout d'une base. Cette neutralisation n'est pas souhaitable car elle entraîne la consommation de réactif et induit des complications dans les procédés downstream de séparation et purification. Un procédé classique de séparation et purification des acides neutralisés implique l'utilisation de sels basiques de calcium et d'acide sulfurique et conduit à la formation de gypse (sulfate de calcium). Pour l'acide lactique traditionnel par exemple, cette masse de gypse produite est à peu près la même que la masse totale d'acide lactique produite et représente un déchet peu valorisable. Les récents progrès en génie génétique pour la production d'acides carboxyliques ont permis la mise au point de fermentations industrielles en milieux relativement acides ( $\text{pH} < \text{pK}_A$  de l'acide considéré) principalement par l'utilisation de levures génétiquement modifiées. La tolérance des levures aux pH acides permet la production de l'acide sous forme non dissociée dans le milieu de fermentation. Toutefois le pH doit tout de même être régulé un minimum, souvent autour de 3, afin de ne pas induire une inhibition trop importante sur les microorganismes due à l'accumulation de l'acide.

L'extraction réactive d'acides carboxyliques présents dans des phases aqueuses par des amines tertiaires en phase organique est un procédé connu depuis les années 70. Il est très efficace pour la récupération sélective d'acides dilués dans l'eau et se trouve donc être un procédé de choix pour la séparation d'acides produits par fermentation. Le principe est qu'une amine hydrophobe se lie avec l'acide pour former un complexe soluble en phase organique. Ce procédé est actuellement mis en place industriellement pour la purification d'acide lactique produit par fermentation pour l'obtention d'un produit de qualité polymère. Le couplage d'un tel procédé de séparation à un bioréacteur accueillant la production d'un acide organique paraît alors très intéressant car il permettrait de retirer l'acide du milieu en même temps qu'il est produit ce qui fait espérer une levée de son inhibition sur le microorganisme. Cependant, l'extraction réactive par des amines tertiaires fonctionne sur la fraction non-dissociée de l'acide, c'est-à-dire à des pH inférieurs à son  $\text{pK}_A$  tandis que les bioconversions étaient plutôt menées à des pH supérieurs au  $\text{pK}_A$ , ce qui diminue grandement l'intérêt d'un procédé couplé. Cette incompatibilité est résolue par l'emploi de microorganismes tolérants aux pH faibles grâce aux développements relativement récents en fermentation pour la production d'acides organiques et permet de réenvisager le procédé couplé.

Le 3-HP a fait l'objet de tels développements et sa production a été démontrée en fortes concentrations (80 – 100 g/L) et à de bonnes productivités à des pH relativement faibles de l'ordre de 3,9-4,0 à l'échelle industrielle. Cependant, l'accumulation de l'acide dans le milieu de fermentation induit une nette inhibition qui s'observe par la chute de la croissance cellulaire et la diminution de la consommation du substrat. Un couplage de la fermentation avec une technique séparative comme l'extraction réactive par des amines tertiaires semble donc a priori très prometteur pour augmenter la productivité et les rendements. Pour la mise en œuvre d'un tel couplage, l'utilisation de contacteurs liquide-liquide à membrane peut s'avérer fructueuse notamment grâce à sa capacité à compartimenter la phase aqueuse et la phase organique à l'aide de la membrane réduisant potentiellement la toxicité des solvants sur les microorganismes producteurs et, de par son contact non dispersif, prévient la formation d'émulsions facilitées par la présence d'un milieu biologique et la présence d'espèces tensioactives. En effet, des expériences préliminaires, non détaillées dans ce manuscrit, ont montré que le produit d'interaction entre l'amine et l'acide aurait des propriétés tensioactives.

Ce travail traite donc de l'étude des mécanismes de l'extraction réactive de l'acide 3-hydroxypropionique au regard d'un procédé intégré couplant bioconversion et extraction à l'aide d'un contacteur liquide-liquide à membrane et se présente sous la forme de cinq publications.

Dans un premier temps, nous avons voulu sélectionner un système d'extraction réactive efficace pour le 3-HP par un petit criblage de solvants en combinaison avec la tri-*n*-octylamine (TOA) et en examinant les rendements d'extraction. 11 solvants ont été testés : 5 alcools, 2 esters, 3 alcanes et une huile végétale. Les résultats ont montré que parmi les solvants testés seuls les alcools présentaient des rendements d'extraction supérieurs à 10%. Les alcanes et l'huile végétale utilisée sont des solvants apolaires, et les mauvais résultats s'expliquent par leur caractère inerte vis-à-vis de l'acide en phase organique qu'ils ne peuvent solvater correctement. Même en utilisant des esters de polarité similaire à certains alcools en termes de moment dipolaire et de constante diélectrique, on constate qu'ils ne sont pas capables non plus d'extraire le 3-HP en présence d'amine et on en conclut alors que c'est leur qualité de solvant protique qui rend les alcools si efficaces avec une forte capacité à réaliser des liaisons H stabilisantes et à se charger en eau, qualités nécessaires pour l'extraction d'un composé aussi hydrophile que le 3-HP. Aussi la concentration en amine dans la phase organique a-t-elle un effet important car contrairement aux alcools et bien qu'elle puisse se lier aux acides en formant des complexes, il s'agit d'un très mauvais solvant qui ne stabilise pas les complexes formés en phase organique. Une concentration optimale de 20%v/v en TOA a été trouvée pour le décanol et l'alcool oléique, au-delà le rendement diminue et devient même nul pour 100%v/v TOA. Il a également été montré que la TOA commerciale contient des impuretés issues de sa synthèse, notamment

l'octylamine et la dioctylamine, qui sont assez solubles dans l'eau à pH acide. La présence de ces impuretés diminue ainsi le rendement d'extraction lorsque le 3-HP en phase aqueuse est initialement présent à moins de 10 g/L. Dans le cas d'un couplage avec un procédé fermentaire, il est impératif que ces impuretés soient éliminées car elles pourraient s'avérer très toxiques envers les microorganismes. Pour l'extraction, de simples lavages acido-basiques de la TOA commerciale sont suffisants pour supprimer les effets des impuretés sur le rendement. A la vue des résultats, le décanol est choisi comme solvant de la TOA pour tout le reste de l'étude.

Une fois le système d'extraction choisi et les impuretés identifiées, nous avons voulu connaître les mécanismes de l'extraction réactive du 3-HP par la TOA. Nous avons alors réalisé une étude au spectromètre infrarouge afin de déterminer les liaisons formées. L'étude a révélé que contrairement au simple partage physique entre l'eau et le décanol où le 3-HP est extrait sous forme non-dissociée, en présence d'amine il est extrait en phase organique sous forme dissociée. On a alors formation d'une paire d'ions et le complexe acide-amine formé est en fait le 3-hydroxypropionate de trioctylammonium. Toutefois, quand la concentration en 3-HP dans la phase organique se rapproche de celle de l'amine, on observe également la présence du 3-HP sous forme non dissociée qui ne peut pas être due au partage physique. On déduit alors qu'en cas de fortes concentrations, il peut également y avoir formation de complexes oligomériques avec plusieurs molécules de 3-HP fixées sur la même amine. Cependant, la gamme de concentration nécessaire en phase organique pour obtenir ce genre de complexe en proportions significatives n'est pas celle correspondante à notre étude de procédé couplé. La formation d'un complexe équimolaire (une molécule de 3-HP pour une molécule d'amine) a été confirmée par des calculs basés sur des bilans matière et des lois d'action de masse dont les constantes d'équilibre ont été déterminées. La forte influence de la concentration en TOA en phase organique sur les rendements d'extraction a été prise en compte dans deux modèles simples de complexation-solvatation. Un modèle considérant que la variation de la teneur en décanol du mélange TOA-décanol influe sur la valeur de la constante d'équilibre de complexation donne de très bons résultats avec une erreur absolue moyenne sur les prédictions de rendement de 1,7%. Nous garderons donc ce modèle pour la suite.

Une fois les mécanismes d'extraction connus et les équilibres modélisés afin de pouvoir prédire les rendements, nous avons voulu évaluer l'impact d'un milieu de bioconversion sur l'extraction réactive du 3-HP en contacteur membranaire pour une phase organique constituée de 20%v/v TOA dans le décanol. Pour cela nous comparons empiriquement, les rendements et les cinétiques d'extraction. Pour représenter les variations dues à une bioconversion, nous avons varié la concentration initiale en acide, le pH initial de la phase aqueuse, la concentration en différents sels dans la phase aqueuse ainsi qu'évaluer la présence de protéine dans le milieu. Les résultats principaux ont montré qu'augmenter

la concentration en acide ralentissait la cinétique d'extraction ce qui peut s'expliquer par le caractère réactif de cette extraction, phénomène non prévu par l'extraction physique dans des conditions similaires. L'augmentation du pH augmente la fraction dissociée du 3-HP dans le milieu qui n'est pas extraite et donc le rendement diminue en conséquence. Les variations de cinétique dues au pH semblent être dues aux variations correspondantes de la concentration de l'acide sous forme protonnée comme précédemment. L'ajout de sels dans le milieu a un effet dramatique sur l'extraction, le rendement est très impacté. Plus on ajoute de sel, moins l'acide est extrait et pourtant plus le pH final de la phase aqueuse est élevé. L'explication commence par le mécanisme de complexation du 3-HP, il y a formation d'une paire d'ions carboxylate-ammonium. Nous avons alors pu montrer que les anions des sels peuvent interagir avec la paire d'ions dans des réactions d'échange d'anions. Cette réaction d'échange d'anions mène au relargage de l'ion carboxylate en phase aqueuse et au chargement de la phase organique avec l'anion du sel. L'anion carboxylate étant la base conjuguée de l'acide, ce phénomène fait augmenter le pH. L'avancement de l'échange d'ions dépend de la nature de l'anion du sel et ainsi l'échange est plus favorable pour les ions chlorures que pour les ions dihydrogénophosphates. Pour donner un exemple, un mélange équimolaire initiale de 3-HP et de chlorure conduit à une diminution du rendement de 76% par rapport à une solution de 3-HP sans chlorure. Ce phénomène s'oppose encore à ce qu'on peut supposer de l'extraction physique où l'ajout de sels neutres n'a que peu d'impact voir augmente le rendement d'extraction si la concentration en sels est assez élevée pour créer un phénomène de relargage (salting-out). Ces réactions d'échange d'ions pourraient être rajoutées au modèle d'équilibre de l'extraction réactive en déterminant les constantes d'échange d'ions afin d'élargir ses capacités prédictives dans des milieux de bioconversion, cependant ceci n'a pas été entrepris dans cette thèse. Quant à l'impact de la présence de protéine, il ne s'est pas montré significatif dans notre cas, probablement à cause de la grande résistance de la membrane qui rend négligeable les autres résistances au transfert.

L'efficacité d'extraction a été modélisée chimiquement et déterminée dans plusieurs conditions d'extraction. Avant la mise en place en conditions de bioconversion, il reste encore à évaluer une manière de récupérer l'acide dans une phase aqueuse à partir de la phase organique après avoir été extrait. C'est la dés-extraction. Trois techniques ont été évaluées : l'ajout de sels neutre ou basiques dans la phase aqueuse, la modulation de solvant et la modulation de température. Les sels basiques (carbonate et hydroxyde) se sont montrés très efficaces en dés-extrayant la totalité du 3-HP en quantités stoechiométriques. Cette technique a alors été testée en contacteur membranaire et il a été trouvé que, comparativement, la dés-extraction du 3-HP d'une phase organique à la soude, bien que totale, était beaucoup plus lente que l'extraction du 3-HP de la phase aqueuse vers la phase organique. Ceci peut s'expliquer en termes de forces motrices au transfert. Au final, cette technique conduit à la

récupération du 3-HP sous sa forme dissociée de sel sodique. La modulation de solvant a alors été employée, elle consiste en l'addition d'un contre-solvant dans la phase organique qui aura tendance à rejeter le 3-HP, typiquement un solvant apolaire de type hydrocarbure et dans notre cas l'hexane. De bonnes capacités de dés-extraction ont été obtenues, en comparaison d'autres acides, en ajoutant 60%v/v d'hexane à la phase organique et en présentant un volume aqueux égal à celui de la totalité de la phase organique. Dans ce cas, 70% de l'acide a pu être récupéré mais la solution obtenue était très diluée en comparaison de la phase organique initiale chargée en 3-HP et sans hexane. De plus, cette technique nécessite de retirer le contre-solvant de la phase organique par une étape supplémentaire de distillation pour la régénérer ce qui complexifie l'installation. La modulation de température, elle, tire parti de la réversibilité thermique de la complexation entre l'acide et l'amine. En effet, nous avons montré que la réaction de complexation était exothermique avec une chaleur de réaction apparente de -25,3 kJ/mol (sur une plage de température allant de 4 à 140°C). Ainsi, en une seule étape et des volumes égaux de phase organique et d'eau pure à 140°C, il est possible de récupérer 78% de l'acide en phase aqueuse. Là encore, l'efficacité de dés-extraction par modulation de température s'est montrée plus importante pour le 3-HP que pour d'autres acides ce qui la laisse envisager comme une très bonne technique de récupération. De plus, le 3-HP est récupéré sous forme non-dissociée. C'est ainsi la méthode utilisée industriellement pour récupérer l'acide lactique et l'acide citrique par exemple. Les méthodes présentées ici peuvent être employées seules ou en combinaison. Une technique non testée dans le cadre de cette thèse mais très intéressante est l'utilisation de bases volatiles comme agent de dés-extraction. Il serait pertinent d'obtenir quelques résultats dans le cas du 3-HP mais nul doute n'est émis sur le fait que cela serait très efficace conduisant à une dés-extraction totale en comparant avec les autres acides. L'intérêt de cette technique réside dans le fait que comme la dés-extraction est totale, l'acide peut être concentré en phase aqueuse et comme la base est volatile, le craquage thermique du sel obtenu conduit à la libération de la base qui peut être recyclée et à la régénération de l'acide sous forme non-dissociée. La dés-extraction peut s'effectuer simultanément à l'extraction pour maintenir une force motrice de transfert élevée. Dans ce cas, l'utilisation de solutions de bases volatiles est la technique la plus envisagée en couplage avec une fermentation. Dans notre cas, nous utiliserons la soude car plus simple d'utilisation.

Ceci nous a donc amené à l'implémentation des étapes d'extraction et de dés-extraction couplées en utilisant deux contacteurs membranaires en parallèle. Une attention forte a tout d'abord été dédiée à la modélisation des transferts en extraction réactive par contacteur membranaire. De précédentes observations expérimentales sur l'aspect extrêmement visqueux de phases très concentrées en complexes nous ont amenés à émettre une hypothèse sur la viscosité de la phase organique lors d'une extraction réactive : celle-ci n'est pas constante et devient plus forte quand la concentration en



complexe est élevée. Des mesures ont alors été réalisées et dans la plage considérée de 0 à 28 g/L en 3-HP dans la phase organique, la viscosité augmente de façon linéaire avec la concentration. Pour une concentration de 28 g/L, l'augmentation est de 50% par rapport à une solution sans 3-HP. Ce phénomène de variation de la viscosité avec la concentration n'est donc pas négligeable, surtout que pour les contacteurs membranaires la cinétique dépend énormément de la viscosité de la phase remplissant le pore, et nous avons pu l'intégrer dans le modèle d'extraction. Notre modèle considère la réaction de complexation comme étant instantanée à l'interface et néglige l'impact de toute cinétique chimique sur le transfert. Malgré tout, sans ajustement particulier, il s'avère extrêmement prédictif dans les conditions testées comme des extractions simples avec une concentration initiale fixe ou couplées avec la dés extraction avec des apports progressifs en 3-HP mimant des bioconversions en présentant un  $R^2 > 0,995$  pour toutes les expériences réalisées. On s'assure ainsi des hypothèses sur les étapes limitantes du transfert. On peut alors s'intéresser au fonctionnement de l'extraction-dés extraction dans des systèmes plus complexes mimant une bioconversion industrielle, avec un milieu de bioconversion contenant un substrat, des sels, une source d'azote et des microorganismes. On a pu démontrer que la sélectivité était totale vis-à-vis du glucose et quasi totale vis-à-vis des composés azotés (retenus à plus de 99% dans le bioréacteur). Par contre, les anions ont été complètement extraits également. La présence de microorganismes diminue un peu la cinétique d'extraction et les observations tendent à montrer que les microorganismes interagissent avec le module membranaire au lancement de l'expérience ce qui peut indiquer une réduction de la surface offerte au transfert et qu'ils ont un pouvoir tampon qui élève un peu le pH de la solution à traiter. Toutefois, la présence de microorganismes n'empêche ni le fonctionnement stable du procédé sur 4 jours sans interruption ni la récupération dans la phase de dés extraction de la totalité du 3-HP fourni au système. Ceci montre l'intérêt d'une telle mise en œuvre.

Tous ces résultats répondent bien au sujet traité en révélant les mécanismes physicochimiques de l'extraction extractive et de sa mise en œuvre en contacteur à membrane et fournit des modèles prédictifs pour l'étude de ce genre de procédé. La présence d'un milieu biologique a été prise en compte et ses interactions avec le procédé d'extraction ont été déterminées. L'étape souvent limitante de la dés extraction a également été traitée et des données de procédés intéressantes ont pu être obtenues. Toutefois, la mise en œuvre d'un véritable procédé fermentaire n'a pas pu être réalisée car nous ne disposons pas encore au laboratoire d'une technique de production viable de l'acide 3-hydroxypropionique pour un procédé couplé.

Néanmoins de nombreuses pistes restent ouvertes pour améliorer le procédé de fermentation extractive envisagé. La formulation de nouvelles phases extractantes peu toxiques pour les microorganismes mais néanmoins efficaces pour l'extraction reste encore à améliorer. L'utilisation du

modèle produit dans cette thèse peut s'avérer très utile dans cette recherche en permettant de prédire les comportements d'extraction sans besoin de réaliser une expérience souvent longue. De plus, le problème de l'extraction des anions des sels du milieu de bioconversion reste à résoudre car il s'agit de sources de nutriments pour les microorganismes notamment en soufre et en phosphore. L'utilisation de phases moins polaires, défavorisant l'ionisation du complexe ou l'utilisation d'autres extractants, comme des extractants phosphorés, peu sensibles aux sels pourrait s'avérer avantageuse.

De plus, comme nous l'avons montré dans notre cas, c'est le transfert des espèces dans la membrane, avec la viscosité de la phase organique, qui est très limitant dans le processus de transfert. L'utilisation d'autres types de contacteurs comme des contacteurs hydrophiles devraient permettre de traiter ce problème. En effet, dans les contacteurs hydrophiles, c'est la phase aqueuse qui remplit les pores de la membrane. En plus des problématiques de transfert, il pourrait s'agir d'un moyen intéressant pour diminuer la toxicité de la phase extractante en maintenant les microorganismes au plus loin de la phase organique.

Concernant les microorganismes, des recherches concernant des meilleures résistances aux solvants pourraient s'avérer avantageuses. Par exemple, on peut imaginer de cribler des souches particulièrement résistantes aux solvants ou d'induire, par des méthodes de génie microbiologique comme l'évolution dirigée ou de génie génétique, une résistance aux solvants chez des microorganismes d'intérêt.

Enfin, le modèle présenté ici peut clairement être encore amélioré pour lui donner une dimension plus générale par exemple en incluant des réactions de compétition avec d'autres composés (comme les anions mentionnés précédemment), le pouvoir tampon des microorganismes sur le pH ou encore des modèles biologiques prenant en compte la consommation et la transformation des substrats avec les différents effets inhibiteurs comme celui de l'accumulation du produit que l'on cherche à extraire.

**Titre :** Compréhension et maîtrise des mécanismes de l'extraction réactive de l'acide 3-hydroxypropionique au regard d'un procédé intégré couplant bioconversion et extraction

**Mots clés :** Génie des bioprocédés ; Extraction réactive ; Contacteur à membrane ; Modélisation ; Acides organiques

**Résumé :** L'acide 3-hydroxypropionique (3-HP) est une molécule plate-forme, particulièrement visée pour ses dérivés acrylés et les polyesters. Sa production par voie biotechnologique fait l'objet de nombreuses études, afin de les obtenir de manière biosourcée. Cependant, dans ces procédés, le 3-HP est dilué dans des milieux de fermentation contenant de nombreuses impuretés. De plus, l'accumulation de l'acide dans les milieux crée une forte inhibition sur les microorganismes producteurs. Nous proposons alors un procédé visant à extraire sélectivement le 3-HP du milieu de fermentation en même temps qu'il est produit afin de limiter son accumulation et de le purifier en continu. Les propriétés du 3-HP ainsi que les meilleures conditions de fermentation actuelles ont permis

d'identifier l'extraction liquide-liquide réactive en contacteur membranaire comme une technique de choix. Nous avons tout d'abord élucidé le mécanisme réactionnel impliqué dans le système puis modélisé les équilibres associés afin de pouvoir prédire les rendements d'extraction en fonction de paramètres opératoires. Plusieurs méthodes de dés extraction ont été testées, ce qui a permis de coupler les étapes d'extraction et de dés extraction dans un procédé semi-continu mimant une production fermentaire. La modélisation dynamique de ce mode de fonctionnement a permis de prédire précisément les résultats expérimentaux. Les milieux ont alors été complexifiés afin de mieux représenter la réalité d'un milieu biologique en identifiant l'impact de chaque constituant.

**Title :** Understanding and controlling the mechanisms of reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid towards the implementation of an integrated process of extractive bioconversion

**Keywords :** Bioprocess engineering ; Reactive extraction ; Membrane contactor ; Modeling ; Organic acids

**Abstract :** 3-hydroxypropionic acid (3-HP) is a platform molecule targeted for its acrylated derivatives and polyesters. Its production through biological pathways is widely studied in order to make them bio-based. However, in such processes, 3-HP is diluted in fermentation broths containing many impurities. Moreover, the accumulation of the acid in the broths generates a strong inhibition towards the producing microorganisms. We suggest here a process aiming at extracting 3-HP selectively as soon as it is produced in order to reduce its accumulation and have it purified continuously. 3-HP properties as well as the current best fermentation conditions made us identify reactive liquid-liquid extraction in membrane contactors as promising technique. First, we

elucidated the reaction mechanism of extraction in our system and then modeled the associated thermodynamic equilibria as a function of operating parameters. Several back-extraction methods were tested and it allowed the coupling of the extraction and back-extraction steps in a semi-continuous process mimicking a biological production. The dynamic modeling of this operating mode made possible the accurate prediction of experimental results. The aqueous phase were then made more and more complex in order to better describe an actual fermentation broth and identify the influence of each component on the process efficiency in terms of yield, kinetics and selectivity.