



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 258 290**

⑤① Int. Cl.:
C12P 7/24 (2006.01)
C12P 7/22 (2006.01)
C12P 7/24 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)
C12P 7/24 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12P 7/22 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)
C12P 7/22 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **98110765 .9**
⑧⑥ Fecha de presentación : **12.06.1998**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0885968**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **23.12.1998**

⑤④ Título: **Proceso para la producción de vainillina.**

③⑩ Prioridad: **19.06.1997 EP 97110010**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2006

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2006

⑦③ Titular/es: **Givaudan S.A.**
Chemin de la Parfumerie, 5
1214 Vernier-Genève, CH

⑦② Inventor/es: **Muheim, Andreas;**
Müller, Bruno;
Münch, Thomas y
Wetli, Markus

⑦④ Agente: **Durán Moya, Carlos**

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para la producción de vainillina.

5 La presente invención se refiere a un proceso microbiológico para la producción de vainillina a partir de ácido ferúlico. Según este proceso, un cultivo, preferiblemente un cultivo sumergido, de cualquier bacteria del orden de los *Actinomycetales*, preferiblemente de la familia *Streptomycetaceae*, se incuba con el ácido ferúlico sustrato para producir de manera fermentativa vainillina. La vainillina producto se recupera del caldo de fermentación mediante un método de extracción diseñado que permite también la separación y recuperación de subproductos de fermentación de valor, para obtener la vainillina producto analítica y sensorialmente purificada y, en particular el subproducto guayacol.

15 En la utilización de compuestos aromatizantes, es cada vez más importante que los compuestos aromatizantes se puedan designar como "naturales". En línea con las regulaciones de Europa y EE.UU., esto significa que el compuesto se debe obtener mediante procesos físicos, enzimáticos o microbiológicos y únicamente a partir de materiales de origen vegetal o animal. De este modo, durante la última década varias actividades de investigación se han centrado en la utilización de fuentes de materias primas renovables, baratas y naturales para la producción fermentativa de vainillina. Sin embargo, hasta el momento en las publicaciones y patentes muy raramente se describen rendimientos volumétricos comercialmente atractivos.

20 El guayacol es una molécula fenólica de tipo empireumática que contribuye de forma significativa al aroma característico de los extractos de vainilla. De este modo, habitualmente se utiliza en combinación con vainillina para aromas de tipo vainillina. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la producción fermentativa de guayacol natural.

25 En los últimos diez años se han presentado varias solicitudes de patente en referencia a la producción microbiana o enzimática de vainillina. En general, un precursor adecuado se transforma en vainillina mediante un microorganismo o una enzima. Algunos precursores sugeridos son eugenol, isoeugenol, ácido ferúlico, curcumina y resinas de benjuí siam. Habitualmente, los rendimientos de transformación son extremadamente bajos. Algunos ejemplos son, por ejemplo, Haarman y Reimer (EP 0 405 197 A1) que reivindica una producción de 18 mg l^{-1} partiendo de $0,2 \text{ g l}^{-1}$ de eugenol utilizando los microorganismos *Serratia*, *Klebsiella* o *Enterobacter*. Además, esta transformación dura 13 días. Pernod-Ricard (EP 453 368 A) reivindica 46 mg l^{-1} de vainillina obtenida a partir de ácido ferúlico por fermentación con *Pycnoporus* durante 6 días. En esta línea también, Kraft General Foods (Estados Unidos 5.128.253), que reivindica 210 mg l^{-1} de vainillina a partir de ácido ferúlico en 54 días. Para obtener este título se tuvo que añadir un agente reductor, ya que de otro modo no tendría lugar la formación de vainillina y únicamente se formaría ácido vainílico. La solicitud de patente internacional WO 960 857 A describe un proceso para la obtención de ácido vainílico mediante la bioconversión de ácido ferúlico. Takasago (JP 227980/1993) preparó mutantes de cepas de *Pseudomonas* que se bloquean en la ruta de degradación de la vainillina. De este modo, a partir de 1 g l^{-1} de ácido ferúlico se pudieron obtener $0,28 \text{ g l}^{-1}$ de vainillina. Recientemente, Haarman y Reimer (EP 0 761 817 A2) han publicado hasta el momento la única solicitud que describe rendimientos volumétricos de vainillina económicamente atractivos en un proceso de fermentación. Los autores identificaron dos cepas del género *Amycolatopsis* que son capaces de acumular vainillina hasta una concentración de $11,5 \text{ g l}^{-1}$ en el caldo de fermentación tras la adición de ácido ferúlico.

35 En conclusión, se puede afirmar que en los sistemas microbianos no se forman fácilmente cantidades elevadas de vainillina. Esto se debe principalmente a la toxicidad celular de la vainillina, que a concentraciones por encima de 1 g l^{-1} evita el crecimiento de los microorganismos productores de vainillina. Habitualmente, en los sistemas microbianos, se observa el correspondiente alcohol o ácido o no la vainillina. Este efecto tóxico de la vainillina se superó mediante la utilización de enzimas (Quest, EP 0 542 348 A2). El tratamiento de isoeugenol con lipoxigenasa dio lugar a 10-15 g l^{-1} de vainillina con un rendimiento del 10-15%. Se obtuvieron concentraciones mucho más bajas cuando se utilizó eugenol ($0,3-0,5 \text{ g l}^{-1}$ con un rendimiento del 0,3-0,5%) y no se describe ningún cambio para el ácido ferúlico. Desde el punto de vista económico, el método que emplea lipoxigenasa es poco atractivo.

45 Otra medida para evitar la toxicidad de este compuesto es la producción microbiana de coniferaldehído, que forma vainillina tras un tratamiento térmico, véase BASF (Offenlegungsschrift, DE 3604874 A1). Similar es también el sistema celular inmovilizado tal como se describe en la reciente solicitud de patente de Orsan (WO 96/34971), en la que la vainillina se acumula hasta una concentración de 1 g l^{-1} . Un posible beneficio económico de la utilización de biomasa inmovilizada se proporciona mediante el reciclado del biocatalizador.

50 Muchos artículos se refieren a las rutas metabólicas respectivas a partir de eugenol, isoeugenol o ácido ferúlico: en general, se cree que la vainillina es un compuesto intermedio en la ruta de degradación de estos compuestos. Se pueden citar dos publicaciones que muestran la participación de la vainillina en la degradación del ácido ferúlico. Toms y Wood, *Biochemistry* 9 (1970) 337-43, cultivaron *Pseudomonas sp.* sobre ácido ferúlico y elucidaron la ruta de degradación. A pesar de que no se observó vainillina en el sobrenadante del cultivo, se evidenció que la vainillina es un compuesto intermedio, ya que se pudo detectar ácido vainílico. A partir del ácido ferúlico, se obtuvo vainillina en cultivos de *Streptomyces setonii* (Sutherland y otros, *Can. J. Microbiol.* 29 (1983) 1253-57). No se indicó la cantidad, excepto que sólo se observaron trazas cuando se repitió el experimento.

65 El ácido ferúlico como sustrato para biotransformaciones está disponible de forma abundante a partir de diferentes fuentes naturales. El ácido está presente normalmente en forma de glucósido en materiales vegetales, tales como madera, melaza de remolacha azucarera, salvado de maíz, arroz y varios tipos de gramíneas. Se puede aislar de los

correspondientes glicósidos en estos productos mediante métodos de hidrólisis conocidos, por ejemplo, utilizando enzimas, y se puede utilizar como material crudo o material purificado. Una fuente británica (GB 2301103 A1) describe, por ejemplo, la ruptura enzimática del ácido ferúlico que contiene un material vegetal mediante una esterasa de ácido ferúlico, para obtener el ácido libre.

5

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

El presente proceso nuevo y microbiológicamente de alto rendimiento para la producción de vainillina comprende, en primer lugar, el cultivo en un caldo de nutrientes de un microorganismo del género *Streptomyces* (orden de los *Actinomycetales*, familia *Streptomycetaceae*), preferiblemente la bacteria *Streptomyces setonii*, en el que, preferiblemente, el periodo de cultivo es de, aproximadamente, 5-40 horas y dura, hasta que la fuente de carbono de glucosa (casi) se consume, añadiendo seguidamente el ácido ferúlico sustrato en el intervalo de, aproximadamente, 5-40 g l^{-1} de caldo de fermentación, de manera continua o discontinua. Tras un periodo de incubación (biotransformación) aproximado de, aproximadamente, 5-50 horas, se completa la conversión del sustrato en vainillina y varios subproductos. El ácido ferúlico se consume y la vainillina se acumula hasta, aproximadamente, 8-16 g l^{-1} en el caldo de fermentación. Algunos subproductos habituales de la biotransformación del ácido ferúlico son alcohol vainílico, ácido vainílico, guayacol, para-vinilguayacol y 2-metoxi-4-etil-fenol.

La posterior recuperación del producto consiste en la eliminación de la biomasa, seguida convenientemente de una extracción en dos etapas con un disolvente orgánico apropiado, preferiblemente metil-terc-butiléter. Se lleva a cabo una primera extracción a un pH superior a, aproximadamente 9, preferiblemente a un pH de 10 a, aproximadamente, 11 en la fase acuosa para extraer de forma selectiva los subproductos, tales como el guayacol altamente activo sensorialmente. A continuación, el refinado acuoso se "acidifica" hasta valores de pH neutro para extraer de forma selectiva la vainillina producto. Finalmente, la purificación del extracto crudo de vainillina se puede obtener mediante la aplicación de métodos de recristalización conocidos. El guayacol se puede purificar a partir del extracto crudo mediante destilación.

El proceso microbiológico y el procedimiento de extracción descritos son útiles para la producción económicamente atractiva de vainillina natural, así como de subproductos, a partir de ácido ferúlico, según la siguiente ruta bioquímica:

30

Ruta de degradación del ácido ferúlico, por ejemplo, mediante *Streptomyces setonii*.

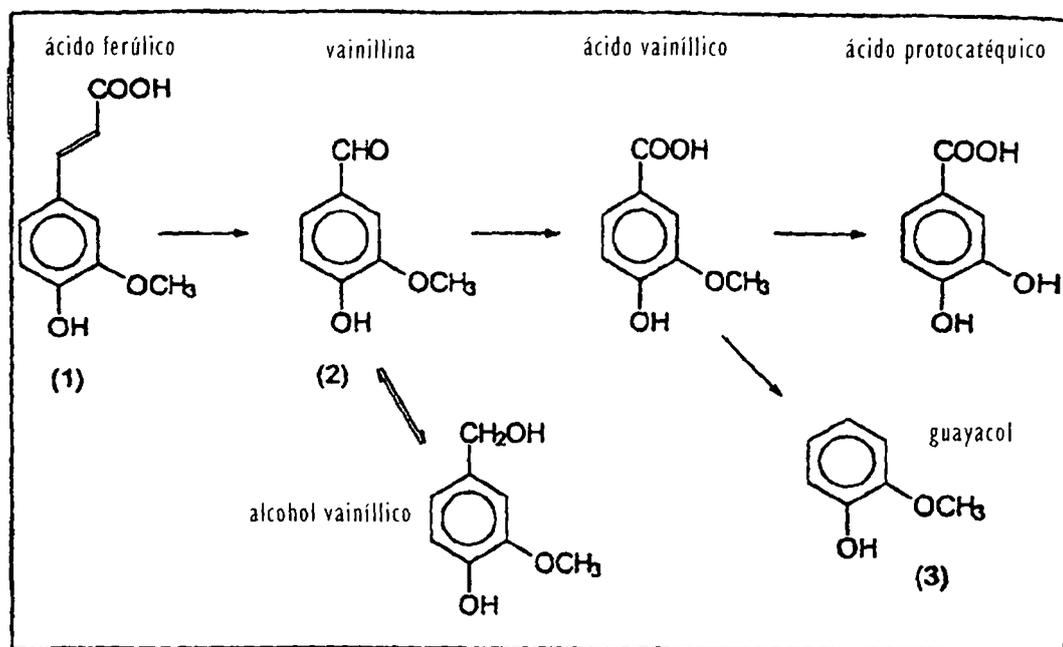
35

40

45

50

55



60

65

La vainillina resultante (compuesto 2), así como el guayacol subproducto (compuesto 3), son ambos compuestos aromatizantes y de fragancia conocidos. Su utilización y aplicación son conocidas por los técnicos en la materia. Mediante la utilización de cantidades eficaces y equilibradas de estos compuestos es posible aumentar o mejorar las propiedades organolépticas de consumibles aromatizados, tales como bebidas, productos lácteos, alimentos cocinados, helados y similares. La vainillina y el guayacol producidos de forma fermentativa son especialmente apreciados en composiciones de cualquier tipo de vainilla y frutas aromatizadas en las que se requieren ingredientes totalmente naturales.

ES 2 258 290 T3

5 Tal como se ha indicado anteriormente, actualmente se ha descubierto que la combinación de unas condiciones de fermentación exactas con un método de recuperación de producto eficaz permite una producción de elevado rendimiento de vainillina sensorial y analíticamente purificada, además de proporcionar como subproducto el compuesto aromatizante de alto impacto, guayacol. Estas condiciones se basan en el cultivo de la bacteria del género *Streptomyces* en un medio de cultivo apropiado y la adición posterior del ácido ferúlico sustrato en concentraciones en exceso, es decir, de, aproximadamente, 5 a, aproximadamente, 40 gl^{-1} , para obtener vainillina a rendimientos volumétricos elevados en el caldo de fermentación.

10 La más adecuada es, tal como se ha indicado anteriormente, la especie *Streptomyces setonii*, preferiblemente la cepa ATCC 39116 disponible comercialmente.

15 El ácido ferúlico sustrato se define mediante la fórmula (1). Según el nuevo proceso, como sustrato se utiliza un material de ácido ferúlico con un contenido de ácido ferúlico de, preferiblemente, más de un 10%. La naturaleza de los compuestos restantes depende de la fuente.

Al llevar a cabo la presente invención, el cultivo de la bacteria se realiza en un medio acuoso en presencia de sustancias nutrientes habituales. Un medio de cultivo adecuado contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno orgánica o inorgánica, sales inorgánicas y factores del crecimiento.

20 Para el medio de cultivo se utiliza, preferiblemente, glucosa como fuente de carbono, por ejemplo, a una concentración de, aproximadamente, 5-50 gl^{-1} , preferiblemente, aproximadamente, 20-35 gl^{-1} . El extracto de levadura es una fuente adecuada de nitrógeno, fosfatos, factores del crecimiento y se pueden añadir elementos traza, por ejemplo, a una concentración preferida de, aproximadamente, 2-20 gl^{-1} , más preferiblemente, aproximadamente, 5-10 gl^{-1} . Además, se pueden añadir iones magnesio, por ejemplo, sulfato magnésico, a una concentración de, aproximadamente, 0,1-5 gl^{-1} , preferiblemente a, aproximadamente, 0,5-1 gl^{-1} .

El caldo de cultivo se prepara y se esteriliza en un biorreactor y, a continuación, se inocula con una cepa de *Streptomyces* para iniciar la fase de crecimiento. Una duración adecuada de la fase de crecimiento es de, aproximadamente, 5-40 horas, preferiblemente, aproximadamente, 15-35 horas y más preferiblemente, aproximadamente, 20-30 horas.

30 Las especificaciones de las condiciones adicionales del proceso son:

intervalo de pH: de, aproximadamente, 7 a, aproximadamente, 9

35 intervalo de temperatura: de, aproximadamente, 30 a, aproximadamente, 45°C

aireación: se prefiere para este proceso aeróbico

40 agitación: se prefiere.

Tras la finalización de la fase de crecimiento, se introduce el ácido ferúlico sustrato al cultivo. Una cantidad adecuada de alimentación de sustrato es de 5-40 gl^{-1} de caldo de fermentación, preferiblemente, aproximadamente, 15-30 gl^{-1} , más preferiblemente, 20-25 gl^{-1} . El sustrato se introduce como material sólido o como solución acuosa o suspensión. La cantidad total de sustrato se introduce en una etapa, en dos o más etapas de alimentación, o de forma continua.

La fase de biotransformación comienza con el inicio de la introducción del sustrato y dura, aproximadamente, 5-50 horas, preferiblemente, 10-30 horas y, más preferiblemente, 15-25 horas, concretamente, hasta que todo el sustrato se transforma en producto y subproductos.

50 Se asume que una concentración en exceso del ácido ferúlico introducido es responsable principalmente del elevado rendimiento volumétrico de vainillina, tal como se observa tras la finalización de la conversión del sustrato. Además, también se asume que las condiciones del proceso descrito anteriormente son las responsables de la acumulación del material de valor, guayacol.

55 Tras la finalización de la fase de biotransformación, se separa la biomasa del caldo de fermentación mediante cualquier método conocido, tal como centrifugación o filtración por membrana y similares, para obtener un caldo de fermentación sin células.

60 Dado que la biotransformación convierte el ácido ferúlico sustrato hidrofílico en sustancias bastante hidrofóbicas, tales como vainillina y guayacol, la productividad volumétrica global del sistema de fermentación se puede incrementar mediante la aplicación de cualquier método de recuperación de producto *in-situ*. Para este objetivo, por ejemplo, se puede añadir una fase de extracción al caldo de cultivo utilizando, por ejemplo, un disolvente orgánico inmiscible en agua, un aceite vegetal o cualquier extractante sólido, por ejemplo, una resina, preferiblemente, una resina neutra, tal como la Amberlita XAD 4 o XAD 7 o similares. Dicho método de recuperación de producto *in-situ* puede permitir la formación continua de vainillina y guayacol también después de alcanzar las concentraciones de solubilidad en agua.

ES 2 258 290 T3

A partir de este caldo de fermentación, ahora se pueden extraer selectivamente la vainillina y los subproductos mediante dos métodos de extracción diferentes:

Son adecuados a) la extracción líquido-líquido continua o b) la extracción de manera discontinua.

- 5
- a) Basándose en una extracción dependiente del valor de pH, se puede realizar un aislamiento eficaz de vainillina y también de guayacol. En una primera etapa, se puede extraer el guayacol del caldo de fermentación acuoso. Para esta etapa se utiliza, preferiblemente, un método de extracción en contracorriente, preferiblemente en un extractor, mediante un disolvente orgánico insoluble en agua. Algunos ejemplos de disolventes son ésteres de ácidos C_{1-3} con alcoholes C_{1-4} , éteres, en particular metil tert-butiléter (MTBE). El pH se encuentra, preferiblemente, entre 10 y 11, en particular, pH 10,8-11.

10

A continuación, se extrae la vainillina del refinado acuoso de la extracción de guayacol a valores de pH de, aproximadamente, 5 a, aproximadamente, 8, preferiblemente de, aproximadamente, 6 a, aproximadamente, 7,5, más preferiblemente, entre, aproximadamente, 6,9 y, aproximadamente, 7,1.

15

Si se trabaja con concentraciones de, aproximadamente, 8 a, aproximadamente, 16 $g\ l^{-1}$, la extracción en contracorriente es la que funciona más adecuadamente en una proporción de alimentación/disolvente de, aproximadamente, 2,5-3:1, en particular, aproximadamente, 2,6:1.

- 20
- b) A concentraciones de vainillina más elevadas en la fase acuosa, por ejemplo, tras una concentración del caldo de fermentación mediante la evaporación del agua, una extracción correspondiente a dos etapas de forma discontinua a diferentes valores de pH y con los disolventes propuestos anteriormente es adecuada y preferible.

25

Las ventajas del nuevo proceso se pueden resumir tal como se indica a continuación:

- (1) Las condiciones de fermentación permiten la acumulación de vainillina en el caldo de fermentación de *Streptomyces*, por ejemplo, *S. setonii*, hasta concentraciones económicamente atractivas (aproximadamente, 8-16 $g\ l^{-1}$).
- (2) El proceso permite la producción simultánea de vainillina y guayacol, es decir, dos productos de elevado valor en la preparación de aromas naturales.
- (3) El proceso de fermentación es de baja complejidad técnica y utiliza materias primas de fuentes fácilmente accesibles.

30

Finalmente, la presente invención se refiere también al proceso novedoso para la fabricación de vainillina, pero utilizando en lugar de *Streptomyces setonii* ATCC 39116, su enzima o cualquier microorganismo recombinante, por ejemplo, levadura, que contiene el material genético de codificación para las enzimas que son relevantes o están implicadas en la biosíntesis celular de vainillina y/o guayacol y, de este modo, no el microorganismo como tal.

Ejemplo 1

45

Se prepararon matraces agitados de 250 ml que contenían 50 ml del siguiente medio: 103 $g\ l^{-1}$ de sacarosa, 4 $g\ l^{-1}$ de Na_2HPO_4 , 1 $g\ l^{-1}$ de KH_2PO_4 , 1 $g\ l^{-1}$ de extracto de levadura, 0,2 $g\ l^{-1}$ de NaCl, 0,2 $g\ l^{-1}$ de $MgSO_4$ y 0,05 $g\ l^{-1}$ de $CaCl_2$. El pH se ajustó a 7,2 utilizando NaOH. Se inoculó un matraz agitado con 2 ml del precultivo de *Streptomyces setonii* ATCC 39116 y se cultivó a 37°C y 190 rpm durante 16 horas. Al final de la fase de crecimiento se añadieron al cultivo 0,3 g de ácido ferúlico (adquirido de Aldrich, n° de catálogo 12.870-8, 99%). Para este objetivo, previamente se preparó y se filtró esterilizada una solución al 10% peso/peso del sustrato ácido en NaOH 0,5 M (el pH final de la solución fue de, aproximadamente, 7,2). El matraz se incubó de nuevo a 37°C, 190 rpm. Después de 31,5 horas de biotransformación (incubación) se alcanzó una concentración de vainillina de 3,10 $g\ l^{-1}$ (HPLC). Se calculó un rendimiento molecular del 66% molar.

55 Ejemplo 2

Se preparó e incubó un matraz agitado de 250 ml igual que en el Ejemplo 1. Después de 16 horas de fase de crecimiento se añadieron al cultivo 0,6 g de ácido ferúlico (como una solución al 10% peso/peso en NaOH 0,5 M). El matraz se incubó de nuevo a 37°C y 190 rpm. Después de 78 horas de biotransformación (incubación) se alcanzó una concentración de vainillina de 5,94 $g\ l^{-1}$ (HPLC), que correspondía a un rendimiento del 63% molar.

Ejemplo 3

65

Se preparó e incubó un matraz agitado de 250 ml igual que en el Ejemplo 1. Después de 18 horas de fase de crecimiento se añadieron al cultivo 0,3 g de ácido ferúlico (como una solución al 10% peso/peso en NaOH 0,5 M). El matraz se incubó de nuevo a 37°C y 190 rpm. Después de 28 horas se añadió una segunda alimentación de 0,3 g de ácido ferúlico. Al final de la incubación (58 horas) se alcanzó una concentración de vainillina de 6,41 $g\ l^{-1}$ (HPLC), que correspondía a un rendimiento del 68% molar.

ES 2 258 290 T3

Ejemplo 4

Se desarrolló un precultivo de *Streptomyces setonii* en un matraz agitado a pH 7,2, 37°C, 190 rpm, durante 24 horas. El medio del matraz agitado contenía 5 gl⁻¹ de glucosa, 4 gl⁻¹ de Na₂HPO₄, 1 gl⁻¹ de KH₂PO₄, 10 gl⁻¹ de extracto de levadura, y 0,2 gl⁻¹ de MgSO₄.

Se llenó un biorreactor con 10 l de un medio que contenía 32 gl⁻¹ de glucosa, 8 gl⁻¹ de extracto de levadura, 0,8 gl⁻¹ de MgSO₄ y 0,2 gl⁻¹ de agente antiespumante (Dow Corning AF 1520). Tras la esterilización térmica, el reactor se inoculó con el precultivo del matraz agitado previamente desarrollado. La cantidad de inóculo utilizada fue del 3%. Las condiciones del proceso fueron 37°C, pH 7,2, velocidad del flujo de aire 1,0 vvm, 800 rpm. Después de 24 horas de fase de crecimiento se midió una concentración de glucosa remanente de 4,6 gl⁻¹. Posteriormente, el pH se varió hasta 8,5 utilizando NaOH (30%) y 24,5 horas después de la inoculación se añadieron al caldo de cultivo 2,25 l de una solución de ácido ferúlico al 10% peso/peso en 0,5 M de NaOH. En el momento de la alimentación, la concentración de glucosa descendió hasta 4,0 gl⁻¹. Después de 3-4 horas desde la adición del precursor se observó el inicio de la biotransformación del ácido ferúlico en vainillina. Tras 17 horas desde la alimentación de precursor, se midieron concentraciones de 13,9 gl⁻¹ de vainillina y 0,4 gl⁻¹ de guayacol en el caldo de fermentación mediante GC. En ese momento, el ácido ferúlico se había convertido completamente. Se calculó un rendimiento de vainillina del 75% molar.

A continuación, se finalizó el bioproceso mediante la pasteurización a 80°C durante 15 minutos. El caldo de fermentación se microfiltró (0,2 µm).

Ejemplo 5

Un biorreactor de 450 l con un volumen de trabajo de 340 l se hizo funcionar según el procedimiento descrito en el ejemplo anterior.

Después de un periodo de crecimiento de 26,5 horas, el pH se varió hasta 8,5 y se llevó a cabo una primera alimentación de ácido ferúlico que ascendía a 4,08 kg, según el Ejemplo 4. En ese momento, se midió una concentración remanente de glucosa de 7,5 gl⁻¹. Una hora más tarde se introdujeron otros 3,57 kg de precursor. La cantidad total de adición de ácido ferúlico fue de 22,5 gl⁻¹. Después de 25,5 horas desde la primera alimentación de precursor se midió una concentración de 9,0 gl⁻¹ de vainillina. La concentración de ácido ferúlico era ahora de 1,75 gl⁻¹. Se obtuvo un rendimiento de vainillina del 51% molar.

Ejemplo 6

Extracción líquido-líquido en contracorriente de vainillina y guayacol a escala técnica

7930 kg de un caldo de fermentación sin células, filtrado por membrana, que contenía 7,1 gl⁻¹ de vainillina y 0,35 gl⁻¹ de guayacol se ajustaron a pH 11 con NaOH y se extrajeron en primer lugar con MTBE como disolvente en un extractor de cámara agitada en contracorriente para separar el guayacol. Después de la evaporación del MTBE, se recuperaron 8 kg de un extracto crudo que contenía MTBE y un 33% peso/peso de guayacol. A continuación, el pH del refinado acuoso de esta extracción alcalina se varió hasta 6,9-7,1 con ácido clorhídrico y de nuevo se extrajo con MTBE en el mismo extractor para separar la vainillina. A partir de esta segunda etapa de extracción se obtuvieron 150 kg de un extracto crudo que contenía MTBE y un 37% peso/peso de vainillina.

La figura representa:

Un diagrama habitual de una producción en lotes de vainillina a una escala de 10 l. Δ concentración de vainillina [gl⁻¹]; - V - concentración de ácido ferúlico [gl⁻¹]; x concentración de guayacol [gl⁻¹]; - o - valor de pH; - □ - valor de pO₂ [%]; - x - concentración de glucosa [gl⁻¹]. Tras una fase de crecimiento de 24 horas el pH se ajustó a 8,5 antes de la introducción de ácido ferúlico. Después de 3-4 horas desde la adición del sustrato se detectó una pequeña cantidad de vainillina. Se alcanzó una concentración de vainillina de 13,9 gl⁻¹ después de un total de 41 horas de fermentación (17 horas después de la introducción de ácido ferúlico). En ese momento se midió una concentración de guayacol de 0,38 gl⁻¹. Se calculó una velocidad de producción de 1,10 gl⁻¹h⁻¹ para la vainillina y de 0,04 gl⁻¹h⁻¹ para guayacol, respectivamente. Tras la conversión completa del ácido ferúlico se observó una disminución en las concentraciones de vainillina y guayacol. Las mediciones cuantitativas se realizaron mediante HPLC y GC.

ES 2 258 290 T3

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la fabricación de vainillina, que comprende:

- 5 a) cultivar en un medio apropiado una bacteria que pertenece al género *Streptomyces* para formar un caldo de fermentación;
- 10 b) añadir el sustrato de ácido ferúlico al caldo de fermentación para obtener una concentración de ácido ferúlico desde, aproximadamente, 5 gl^{-1} hasta, aproximadamente, 40 gl^{-1} , produciendo vainillina como producto principal de la reacción de la biotransformación de ácido ferúlico, separando la biomasa del caldo de fermentación, y
- c) extraer la vainillina, y si se desea, el subproducto guayacol del caldo de fermentación.

15 2. Proceso, según la reivindicación 1, en el que el cultivo en la etapa a) se realiza en un medio apropiado durante 5 a 40 horas para formar un caldo de fermentación; y posteriormente, el pH de dicho caldo de fermentación se varía hasta, aproximadamente, 8,5; y la biotransformación en b) dura de 5 a 50 horas.

20 3. Proceso, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que en la etapa b) se forma un caldo de fermentación que tiene una concentración de ácido ferúlico de 15 a 30 gl^{-1} .

4. Proceso, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que en la etapa b) se forma un caldo de fermentación que tiene una concentración de ácido ferúlico de 20 a 25 gl^{-1} .

25 5. Proceso, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el ácido ferúlico se añade después de la finalización de la fase de crecimiento.

30 6. Proceso, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el medio de cultivo comprende glucosa, preferiblemente a una concentración de 5-50 gl^{-1} , más preferiblemente 20-35 gl^{-1} .

7. Proceso, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el medio de cultivo comprende extracto de levadura, preferiblemente a una concentración de hasta 20 gl^{-1} , más preferiblemente de 5 a 10 gl^{-1} .

35 8. Proceso, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el medio de cultivo comprende iones magnesio, preferiblemente a una concentración de 0,1 a 5 gl^{-1} , más preferiblemente de 0,5 a 1 gl^{-1} .

9. Proceso, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la etapa a) se lleva a cabo a un pH de 7 a 9.

40 10. Proceso, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el proceso se lleva a cabo de 30 a 45°C.

11. Proceso, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el proceso se lleva a cabo con aireación.

12. Proceso, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el proceso comprende agitación.

45 13. Proceso, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la biotransformación dura de 10 a 30 horas, más preferiblemente 15-25 horas.

50 14. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa c) el guayacol se extrae en primer lugar mediante el incremento del pH del caldo de fermentación hasta por encima de 9 y mediante la utilización de un disolvente orgánico.

55 15. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que después de la biotransformación el pH del caldo de fermentación se varía posteriormente hasta un valor de, aproximadamente, 7, y la vainillina se extrae mediante un disolvente orgánico.

16. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el metil-tert-butiléter es el disolvente de extracción.

60 17. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, la bacteria pertenece a *Streptomyces setonii*.

18. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la bacteria es *Streptomyces setonii* ATCC 39116.

65

Figura

producción de vainilina y guayacol

