



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 293**

51 Int. Cl.:  
**C12P 7/58** (2006.01)  
**C12N 9/04** (2006.01)  
**C12N 9/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02765689 .1**  
96 Fecha de presentación : **07.10.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1434869**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.2004**

54 Título: **Método de preparación de gluconato de calcio.**

30 Prioridad: **08.10.2001 EP 01203793**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.04.2011**

73 Titular/es: **PURAC BIOCHEM N.V.**  
**Arkelsedijk 46**  
**4206 AC Gorinchem, NL**

72 Inventor/es: **Vorage, Marcus, Johannes, Anthonius,**  
**Wilhelmus;**  
**Kremer, Diderik, Reinder;**  
**Sloots, Boelem y**  
**Meiberg, Johannes, Bernardus, Maria**

74 Agente: **Molinero Zofío, Félix**

ES 2 357 293 T3

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

## DESCRIPCION

Método de preparación de gluconato de calcio.

[0001] La presente invención se refiere a la preparación de gluconato de calcio mediante un proceso enzimático.

5 [0002] Los micronutrientes (vitaminas y minerales) no están siempre presentes o disponibles en cantidades suficientes en los alimentos. Esto puede, *inter alia*, deberse a déficit específicos en el suelo en el cual se cosechan los cultivos, a una baja biodisponibilidad del micronutriente, a dietas mal balanceadas o a parásitos intestinales. Las Ingestiones Recomendadas de Nutrientes (RNIs) o Asimilaciones Diarias Recomendadas (RDA) están dirigidas a informar al público con respecto a niveles saludables de insumo de micronutrientes.

10 [0003] Se ha reconocido que el insumo de algunos nutrientes a niveles superiores a los actuales RNIs puede brindar beneficios adicionales a la salud. Los niveles de insumo de calcio superiores a los RNIs están, por ejemplo, asociados con masa ósea incrementada en la vida adulta joven y en una reducción del riesgo de osteoporosis en años posteriores.

15 [0004] El insumo adecuado de calcio puede ser beneficioso no solo en la prevención y tratamiento de osteoporosis, sino también en la reducción de riesgo ante diversas enfermedades, incluyendo hipertensión, cáncer colorectal y cálculos oxálicos renales. Los adolescentes y los ancianos son particularmente vulnerables a los efectos adversos de insumo inadecuado de calcio. Estudios recientes y recomendaciones dietéticas enfatizan la importancia de una nutrición adecuada respecto al calcio en mujeres embarazadas y en niños, especialmente aquellos sujetos a un rápido crecimiento y mineralización ósea asociada con el desarrollo en la  
20 pubertad. El insumo dietético actual de calcio por parte de niños y adolescentes en muchas partes del mundo puede estar por debajo de los niveles óptimos recomendados.

[0005] Aunque usualmente hay una cantidad adecuada de calcio en el suministro alimenticio para cumplir los niveles RNI, datos de encuestas indican que muchas personas no están consumiendo las cantidades recomendadas de calcio. Por ejemplo, muchos individuos no consumen productos lácteos por una diversidad  
25 de razones de salud, culturales o personales y por tanto tienen bajo insumo de calcio.

[0006] Para aliviar las deficiencias de micronutrientes, la fortificación alimenticia se ha convertido en elemento esencial en las estrategias de nutrición. Un programa efectivo de fortificación alimenticia mejora la calidad nutricional de un suministro alimenticio aportando fuentes de nutrientes esenciales y corrigiendo ingestiones inadecuadas de éstos.

30 [0007] La fortificación o enriquecimiento se define como la adición de una o más vitaminas o minerales a un producto alimenticio independientemente de si ese alimento ya contiene esa sustancia y concierne a las vitaminas A, B1, B2, B6, B12, C, D, E, K, niacina, folato, ácido pantoténico y biotina y los minerales sodio, potasio, calcio, fósforo, magnesio, hierro, zinc, yoduro, cloruro, cobre, flúor, manganeso, cromo, selenio, cobalto, molibdeno, estaño, vanadio, silicio y níquel.

35 [0008] La fortificación alimenticia es regulada mediante programas oficiales gubernamentales y se utiliza como una herramienta para intervenciones de salud pública (adición de yodo a la sal), para restaurar nutrientes perdidos durante el procesamiento de alimentos (adición de vitamina A a leche de bajo contenido graso o leche desnatada) para asegurar la equivalencia nutricional de alimentos sustitutos (adición de vitamina A a  
40 margarina) o para asegurar la composición apropiada de nutrientes de alimentos especiales dietéticos tales como reemplazo de comidas, suplementos nutricionales, alimentos bajos en sodio, alimentos libres de gluten, dietas de fórmula líquida y alimentos no azucarados. Las regulaciones determinan cuales fortificantes son permisibles.

[0009] La presencia de minerales como sodio, potasio, calcio y magnesio en la dieta humana es de gran importancia. Los documentos oficiales establecen que se estiman como niveles seguros y adecuados de  
45 insumos diarios para adultos, 1,1 a 3,3 gramos/día de sodio y 1,9 a 5,6 gramos/día de potasio. Para el calcio y magnesio, la asimilación diaria recomendada (RDA) es de 0,8 a 1,2 gramos/día y 0,3 a 0,4 gramos/día respectivamente. El sodio está presente generalmente en niveles suficientes y puede suplementarse fácilmente en forma de sal de mesa. La situación para el calcio es especialmente más compleja.

50 [0010] En el cuerpo humano el calcio está presente fundamentalmente en los huesos y dientes (99%), y juega un papel importante en muchas reacciones enzimáticas en los fluidos intra y extra celulares, coagulación de la sangre, contracción muscular, transmisión nerviosa y en el mantenimiento de una pulsación cardíaca y presión sanguínea estable. El calcio es el mineral más abundante en el cuerpo y está presente de manera predominante en la forma de fosfato de calcio. El hueso actúa como un gran reservorio y búfer para el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ . Los niveles de plasma de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  se mantienen dentro de límites estrechos mediante un péptido paratiroideo denominado hormona paratiroidea (PTH) que incrementa la movilización de calcio en el hueso y la absorción intestinal y disminuye la excreción renal de calcio, y un segundo péptido de origen tiroideo, calcitonina, el cual tiene una acción opuesta disminuyendo la liberación de calcio del hueso y aumentando la  
55

excreción de calcio y fósforo mediante el riñón. La vitamina A también está involucrada, principalmente en la absorción intestinal de calcio.

5 [0011] Las pérdidas diarias de calcio deben ser reemplazadas a través del insumo dietético. Como fuentes reconocidas de calcio están las fuentes alimenticias (que ocurren de manera natural y/o como fortificantes alimenticios), los suplementos minerales y fuentes misceláneas tales como antiácidos (para el tratamiento de úlceras gástricas y reflujo ácido). La mayor fuente de calcio dietético para la mayoría de las personas es la leche (1,2 a 1,4 gramos de calcio/litro) y otros productos lácteos. Otras fuentes de calcio son, sin embargo, importantes, especialmente para alcanzar insumos de calcio de 1,2 a 1,5 g/día (RNI EE. UU.). La mayoría de los vegetales contienen calcio, aunque en baja densidad. Por tanto, se necesitan raciones relativamente grandes para igualar el insumo total alcanzado con respecto a raciones típicas de productos lácteos.

15 [0012] La adecuación del calcio depende no solo de la cantidad de insumo, sino también de la porción de calcio en alimentos que pueda ser absorbida a través de los intestinos y sea capaz de utilizarse en el cuerpo, denominada biodisponibilidad. Aún si el insumo alimenticio diario contiene calcio suficiente para mantener teóricamente un balance adecuado de calcio en el cuerpo, puede ocurrir una carencia de calcio en el cuerpo. La biodisponibilidad de calcio a partir de vegetales es generalmente alta. La espinaca es una excepción, que es elevada en oxalato, haciendo que el calcio de ésta no esté biodisponible virtualmente. Algunos alimentos altamente fitogénicos, tales como los cereales de salvado, pueden tener también una pobre biodisponibilidad de calcio.

20 [0013] Aunque la vitamina D y la hormona paratiroidea están involucradas en el proceso activo de absorción intestinal, los fosfatos juegan un papel fundamental en la absorción pasiva basada en la difusión. Este proceso de absorción se estimula positivamente mediante la concentración de calcio disuelto: a mayor solubilidad del compuesto de calcio, más fuerte la absorción pasiva.

25 [0014] Casi todo el calcio ingerido y presente en el estómago está esencialmente en forma iónica debido a las bajas condiciones del pH. Sin embargo, cuando el calcio entra al intestino las condiciones son más neutras (pH 6 a 7) y el calcio puede precipitar un fosfato insoluble de calcio, en dependencia de la cantidad de fosfato presente. El cuerpo no es capaz de absorber estos fosfatos precipitados de calcio. Es más probable que la precipitación ocurra cuando la proporción de fosfato de calcio en los alimentos o en el intestino sea inferior a 1. En Europa esta proporción es de alrededor del 0,6% y en los EE. UU. éste número es aún menor. Por lo tanto, el suplemento de calcio en los alimentos es beneficioso por numerosas razones.

30 [0015] Se han introducido varios productos que son fortificados con calcio. Estos productos, muy notablemente el jugo de naranjas, son fortificados para lograr una concentración de calcio similar a la de la leche. Estudios limitados sugieren que la biodisponibilidad del calcio en estos productos es al menos comparable con la de la leche. Los datos de biodisponibilidad de los diversos fortificantes de calcio no son concluyentes. Varios estudios indican igual biodisponibilidad entre carbonato de calcio, sulfato de calcio, citrato de calcio y lactato de calcio mientras otras investigaciones muestran que las sales orgánicas de calcio pueden poseer mayor biodisponibilidad que las sales inorgánicas tales como carbonato de calcio. Generalmente, la biodisponibilidad se determina en base a la solubilidad de un compuesto de calcio tal como se mencionó previamente. La solubilidad se define como concentración soluble en agua de un cierto compuesto en presencia de la forma cristalina del compuesto, i. e. las formas solubles y cristalinas están en equilibrio termodinámico.

35 [0016] Los mayores problemas asociados con la fortificación de alimentos incluyen la identificación de vehículos apropiados, selección de compuestos fortificantes apropiados, determinación de tecnologías para uso en la producción del fortificante y en el proceso de fortificación y la influencia en el gusto y en la satisfacción del consumidor con respecto al producto alimenticio. La selección de la fuente apropiada de calcio para una aplicación específica de fortificación se basa usualmente en la consideración de un número de propiedades asociadas al producto respectivo tal como el gusto, contenido de calcio, biodisponibilidad, capacidad de absorción (usualmente 10-40%) y, de manera más importante en el caso del calcio, la solubilidad, que determina la biodisponibilidad y capacidad de absorción. Las consideraciones económicas son, evidentemente, otro factor importante. Un fortificante ideal de calcio exhibe una solubilidad en exceso de 3 gramos de  $\text{Ca}^{2+}$  por litro.

40 [0017] El carbonato de calcio, a partir de conchas de ostra o piedra caliza, es el suplemento de calcio más ampliamente utilizado debido a su alto contenido de calcio y bajo costo. Sin embargo, el carbonato de calcio tiene la desventaja de que desarrolla  $\text{CO}_2$  en el estómago, tiende a producir una sensación bucal gredosa, puede impartir un gusto amargo, jabonoso o de limón en el producto terminado y puede producir sedimento en el producto alimenticio. De mayor importancia, el carbonato de calcio es poco soluble ( $<0,1$  g/L a  $25^\circ\text{C}$ ) y por tanto tiene una baja absorción. Los fosfatos de calcio, tales como el fosfato dicálcico imparten una sensación bucal arenosa, tienen un sabor blando y también son poco solubles ( $<0,1$  g/L a  $25^\circ\text{C}$ ).

45 [0018] Algunas sales orgánicas de calcio como el lactato de calcio, y el gluconato de calcio exhiben una solubilidad más elevada y se absorben mejor por parte del cuerpo. El citrato tricálcico ofrece un alto contenido de calcio y un gusto neutro pero es el menos soluble (0,2 g/L a  $25^\circ\text{C}$ ). El lactato de calcio, por otra parte, es altamente soluble (9,3 g/L a  $25^\circ\text{C}$ ) haciéndolo muy beneficioso para obtener un alto contenido de calcio en un

- producto alimenticio. Sin embargo, el lactato de calcio se percibe como amargo. El gluconato de calcio es algo menos soluble (3,5 g/L a 25°C) como lactato de calcio y se considera como una de las sales más solubles de calcio con respecto al gusto permitiendo altos niveles de adición en productos alimenticios sin impacto negativo en el gusto. El gluconato de calcio es también muy compatible con el cuerpo humano. No muestra esencialmente toxicidad o astringencia alguna, y es por tanto bien tolerado.
- [0019] El gluconato de calcio es la sal de calcio del ácido glucónico. Para registrar el producto como un fortificante alimenticio, debe prepararse a una alta pureza i. e., sin la presencia de subproductos que no estén registrados. Una desventaja importante del gluconato de calcio es que es relativamente costoso en su producción. Se describen diversos procesos para la producción de gluconatos en la literatura. La Patente de los EE. UU. No 4 845 208 describe un proceso para la producción de ácidos aldónicos mediante oxidación de aldosa utilizando un catalizador basado en paladio. La desventaja de este método radica en el uso de catalizadores muy costosos y tóxicos y de la formación de diversos subproductos.
- [0020] La Patente de los EE. UU. No. 5 102 795 describe la oxidación electroquímica de glucosa a ácido glucónico utilizando bromuro de sodio y una base neutralizante. Este método se utiliza actualmente para la producción de gluconatos pero tiene el problema de que el bromuro de sodio o bromuro hay que separarlo del producto final.
- [0021] Un proceso de producción que genera gluconatos de alta pureza (sin la formación de subproductos en la mezcla de reacción) se describe en la solicitud internacional de patente 96/35 800. En esa publicación, se utiliza una combinación de enzimas de oxidasa glucosa y de catalasa para convertir de manera enzimática la glucosa a ácido glucónico a la vez que se neutraliza con hidróxido de sodio para obtener gluconato de sodio con un rendimiento cercano al 100% y prácticamente sin impurezas. El gluconato de sodio es altamente soluble (380g/L a 20°C) y los inventores de esa solicitud internacional de patente fueron capaces de lograr la conversión total de 273 g/L de glucosa a ácido glucónico (en la forma de gluconato de sodio líquido). Aunque los iones de sodio pueden ser intercambiados por iones de calcio para obtener gluconato de calcio, tal proceso no es práctico debido a los problemas de la precipitación del calcio y al hecho de que un ión monovalente tiene que ser intercambiado por uno ión divalente, enlazado a la resina, y la producción industrial de gluconato de calcio de esta forma es poco atractiva. Es más, el intercambio iónico es una operación que requiere una unidad costosa y el proceso genera sales de desecho.
- [0022] La solicitud internacional de patente 97/24 454 describe la conversión enzimática de glucosa a ácido glucónico (en la forma de gluconato de sodio líquido) hasta concentraciones iniciales de glucosa de 450 g/L a un pH de 6,0 utilizando un sistema de reactor presurizado y oxidasa glucosa a partir de *Aspergillus Níger* y catalasa de *Micrococcus luteus*. Sin embargo, este proceso no permite producciones de alto rendimiento de gluconato de calcio ya que la solubilidad del gluconato de calcio (30g/L a 20°C) es una orden de magnitud más baja que la de la sal de sodio correspondiente.
- [0023] También, el gluconato de calcio puede prepararse mediante fermentación microbiana tal como se describe por Shah y Kothari (Biotechnol. Lett. 1993; 15:35-40) y por Klewicki y Krol (Pol. J. Food Nutr.Sci.1999; 8:71-79). El inconveniente de estos procedimientos se relaciona con la necesidad de purificación del gluconato de calcio después de la producción a partir de los subproductos formados y de separación de los microorganismos del producto.
- [0024] Para la producción de gluconato de calcio se prefiere un proceso enzimático debido a su elevada especificidad y a la alta pureza resultante del producto. Sin embargo, la solubilidad del gluconato de calcio bajo las condiciones requeridas para la conversión enzimática óptima (pH 5a 7 , 30 a 35°C) es solamente de 40 g/L. Para obtener cantidades industriales del producto, se necesitan grandes reactores y la concentración de cristales de gluconato de calcio requiere la evaporación de grandes cantidades de agua. El incremento de la concentración inicial de glucosa y la cristalización al instante del gluconato de calcio formado resulta en una viscosidad incrementada de la mezcla de la reacción y un decrecimiento concomitante en la proporción de transferencia de oxígeno y conversión enzimática. La intensificación de la agitación para restaurar la transferencia de oxígeno y superar los problemas de viscosidad, e. g. utilizando turbinas Rushton para revolver elevará los costos de equipamiento y aumentará el riesgo de daño al equipo utilizado y la contaminación concomitante de metales (cromo o níquel) de producto final. Estos inconvenientes han traído como consecuencia que la producción de gluconato de calcio a escala industrial sea poco atractiva.
- [0025] La presente invención expone un método para prevenir la formación de cristales durante la conversión enzimática de glucosa a gluconato de calcio permitiendo que el proceso enzimático para la producción de gluconato de calcio sea económicamente favorable.
- [0026] La Figura 1 muestra las ecuaciones de reacción asociadas con la producción de gluconato de calcio según una realización de la presente invención.
- [0027] La presente invención proporciona un método para la preparación de gluconato de calcio que comprende la conversión enzimática de glucosa a ácido glucónico (vía lactona-gluconodelta) seguida de la conversión de ácido glucónico a gluconato de calcio en una mezcla de reacción a la cual se administra una base de calcio en una cantidad suficiente para la producción de una cantidad de gluconato de calcio en exceso

de 30 g/l de la mezcla de reacción y que comprende además al menos una sal de un ácido orgánico que es aceptable para uso en alimentos, y agua. Una ventaja del nuevo método es que las condiciones de reacción resultan en rendimientos muy elevados de gluconato de calcio por unidad de volumen de producción sin la formación de cristales de gluconato de calcio.

5 [0028] Se ha encontrado que en principio el uso de cualquier sal de un ácido orgánico la cual pueda ser utilizada en alimentos conduce a las ventajas de la presente invención. La frase "aceptable para uso en alimentos" significa que el consumo por parte de humanos o animales mediante insumo de alimentos no conlleva esencialmente a efectos perjudiciales. En general, la frase se refiere a sales esencialmente no tóxicas. Los ejemplos específicos de sales apropiadas incluyen sales de lactato, sales de citrato, sales de malato y combinaciones de éstas. En la siguiente descripción, se ilustra la presente invención en referencia a sales de lactato. Esto no debe interpretarse bajo ninguna circunstancia como restrictivo con respecto al uso de otras sales en el contexto de la presente invención. Aunque se han obtenido resultados favorables utilizando una sal de lactato, otras sales de ácidos orgánicos conllevan principalmente a resultados similares.

10 [0029] La presente invención proporciona por primera vez un método industrialmente atractivo para la preparación enzimática de gluconato de calcio. El método no requiere procedimientos de intercambio iónico sodio-calcio ni purificación del producto con posterioridad a la producción. La presente invención se refiere a un nuevo proceso selectivo para producir gluconato de calcio de alta pureza y altamente soluble en la presencia de una o más sales de lactato.

15 [0030] Los presentes inventores han demostrado *inter alia* que el gluconato de calcio, cuando se prepara mediante reacción enzimática en la presencia de lactato de calcio, exhibe una solubilidad en exceso de 225 g/kg de solución a 20°C. Esto es considerablemente superior a la solubilidad del gluconato producido mediante una reacción enzimática en la ausencia de lactato de calcio (30 g/L a 20°C) y resulta en soluciones claras sin cristales y con un contenido total de calcio en exceso de 46 g de solución de calcio/kg. El rendimiento enzimático de gluconato de calcio en la mezcla de reacción según la presente invención puede alcanzar niveles particularmente elevados cuando la conversión enzimática resulta en una mezcla de 65 % en peso de gluconato de calcio y 35% en peso de lactato de calcio. Cantidades considerablemente más bajas o considerablemente más altas de lactato de calcio presentes en la mezcla de reacción resultarán en cantidades menores de gluconato de calcio producidas por kg de mezcla de reacción. Sin embargo, la simple presencia de sales de lactato durante la conversión enzimática de glucosa a ácido glucónico permite el reforzamiento de cantidades ventajosamente elevadas de gluconato de calcio en la mezcla de reacción sin la formación de precipitado de gluconato de calcio. Es más, el gluconato de calcio producido según un método de la presente invención es esencialmente puro y no requiere pasos adicionales de purificación. La presencia de sales de lactato en el producto de reacción no limita la aplicación del gluconato de calcio como un fortificante registrado, ya que las sales de lactato constituyen por sí mismas un compuesto alimenticio registrado. Por tanto, las sales de lactato en el producto de reacción no necesitan ser retiradas o separadas del producto de gluconato de calcio. La presencia de sales metálicas de lactato adicionales es beneficiosa para la aplicación del gluconato de calcio producido mediante un método según la presente invención como un fortificante alimenticio ya que los micronutrientes adicionales pueden proporcionarse en la forma de sales de lactato.

20 [0031] El proceso enzimático utiliza una mezcla de las enzimas oxidasa glucosa y catalasa para convertir glucosa a ácido glucónico en la presencia de una sal de lactato. Durante la conversión enzimática, una base de calcio (e. g. óxido de calcio, hidróxido de calcio y/o carbonato de calcio) se utiliza con el objetivo de neutralizar el ácido glucónico en desarrollo y para servir como una fuente de calcio. La presencia de la sal(es) de lactato durante las reacciones enzimáticas evita la cristalización del gluconato de calcio y/o del lactato de calcio pudiendo alcanzarse concentraciones finales elevadas (aún por encima de lactato de calcio-gluconato de calcio combinados disueltos por kg de mezcla de reacción).

25 [0032] La presente invención se refiere a un proceso para producir sal de gluconato de calcio que pueda ser utilizada en aplicaciones de fortificación de alimentos.

[0033] La presente invención proporciona un proceso nuevo, efectivo y económico de producción de gluconato de calcio a partir de glucosa en presencia de sales de ácido láctico.

30 [0034] La presente invención se refiere *inter alia* a un método que comprende los pasos de

- preparar de una mezcla de glucosa, enzimas y una sal de lactato en agua,
- convertir de manera enzimática glucosa a ácido glucónico
- convertir ácido glucónico a gluconato de calcio a través de la adición de una base de calcio

35 [0035] La conversión se lleva a cabo mediante la acción combinada de una mezcla de al menos dos enzimas, que comprenden al menos oxidasa glucosa (EC 1.1.3.4) y catalasa (EC 1.11.1.6). Es un aspecto de la presente invención que las enzimas puedan provenir de cualquier fuente apropiada y que esté comercialmente disponible. Una fuente conveniente de las enzimas es una fuente microbiana tal como una fuente fungosa o una fuente bacteriana. Por ejemplo OxyGO 1500 (Genencor Inc., EE. UU.) o Novozyme 771 /Novo Nordisk

A/S, Dinamarca) es una preparación de enzima que contiene ambas oxidasa glucosa y catalasa que pueden utilizarse de manera beneficiosa en la presente invención. De manera alternativa, puede utilizarse una combinación de una preparación de oxidasa glucosa y una preparación de catalasa. Como oxidasa glucosa, está disponible por ejemplo la oxidasa glucosa G9010 (Sigma, EE. UU.). Una enzima de catalasa que puede utilizarse de manera beneficiosa en la presente invención es por ejemplo catalasa T100 (Genencor Inc., EE. UU.). Como una alternativa para oxidasa glucosa, pueden utilizarse otras enzimas, tales como oxidasa hexosa (EC 1.1.3.5) u oxidasa glucooligosacárida, o cualquier otra enzima que catalice la oxidación de glucosa con oxígeno resultando en los productos de reacción ácido glucónico y peróxido de hidrógeno.

[0036] Las cantidades de enzimas utilizadas en la mezcla de reacción pueden ser preparaciones para producir el compuesto de la presente invención en un período de tiempo deseado. La fuente de enzimas puede seleccionarse para que resulte en proporciones óptimas de conversión bajo las condiciones de reacción aplicadas.

[0037] La glucosa, utilizada en el contexto de la presente invención puede administrarse a la mezcla de reacción en una forma cristalina o en la forma de un sirope. La concentración inicial de glucosa en la mezcla de reacción puede ser de hasta 180 g/l de la mezcla de reacción. Preferiblemente, la concentración inicial de glucosa en la mezcla de reacción antes de la conversión total a gluconato de calcio está por encima de 30 g/l de la mezcla de reacción.

[0038] La sal de lactato presente en la mezcla de reacción puede provenir de cualquier fuente apropiada y puede ser cualquier sal de lactato tal como una sal de metal alcalino y/o sal de metal alcalinotérreo de lactato, tal como un sodio, un potasio, un calcio y/o una sal de magnesio o una combinación de éstas. La sal de ácido láctico puede administrarse a la mezcla de reacción como una sal cristalina de lactato. De manera alternativa, el ácido láctico puede administrarse como ácido láctico en forma disuelta y puede neutralizarse antes de comenzar la reacción enzimática de conversión mediante cualquier base apropiada tal como una base de sal de metal alcalino y/o base de sal de metal alcalinotérreo, e. g. una base de calcio.

[0039] En otro aspecto de la presente invención, la sal de ácido láctico puede obtenerse por adelantado mediante fermentación microbiana de un carbohidrato seguida de neutralización con una base apropiada, tal como una base de sal de metal alcalino y/o base de sal de metal alcalinotérreo, e. g. una base de calcio para obtener una base de lactato apropiada. En tal realización según la presente invención, la glucosa es un carbohidrato preferido. Puede llevarse a cabo una fermentación microbiana de tal realización de la presente invención bajo condiciones conocidas en la técnica y con cualquier microorganismo capaz de producir lactato a partir de fermentación de carbohidrato, tal como bacterias de ácido láctico. El *Lactobacillus rhamnosus* es un tal microorganismo preferido.

[0040] La sal de lactato puede estar presente al comienzo de la reacción de conversión en cantidades suficientes como para rendir niveles óptimos de gluconato de calcio en la mezcla de reacción. Alternativamente, la sal de lactato o ácido láctico puede administrarse en pasos consecutivos o continuamente durante el curso de la reacción para mantener una cierta proporción entre gluconato y lactato.

[0041] El método de la presente invención puede llevarse a cabo en cualquier tipo de reactor disponible para los expertos en la técnica. Estos pueden comprender fermentadores de laboratorio o a escala industrial con pH automatizado, controles de adición de álcali y de temperatura, pero pueden comprender también recipientes estáticos del reactor a los cuales se añaden reactantes en forma de administraciones separadas. Adicionalmente, pueden aplicarse agitadores en el reactor para facilitar una mezcla apropiada de los reactantes. Los reactantes pueden añadirse en un paso o pueden añadirse en pasos múltiples. Los reactantes pueden añadirse también de manera continua al reactor durante la reacción de conversión.

[0042] Las condiciones de reacción que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención pueden variarse para aportar un producto con propiedades deseadas o para producir la sustancia de la presente invención en un período deseado de tiempo. Las condiciones de reacción que pueden ser variadas por el especialista incluyen, pero no se limitan a temperatura, pH, nivel de aireación, tensión de oxígeno, presión, nivel de dióxido de carbono, viscosidad, y similares.

[0043] Las temperaturas de la mezcla de reacción durante la reacción de conversión que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención son aquellas que contribuyan al funcionamiento apropiado de las enzimas. Tales temperaturas pueden seleccionarse entre 0°C y 50°C. Las temperaturas que pueden utilizarse de manera beneficiosa están entre 30°C y 40°C. Las temperaturas de la reacción de conversión durante la producción industrial de gluconato de calcio según un método de la presente invención pueden optimizarse para lograr proporciones elevadas de conversión mediante las enzimas y para lograr altos niveles de solubilidad del gluconato de calcio producido.

[0044] El pH de la mezcla de reacción durante la conversión puede regularse, i. e. controlarse, mediante la adición de una o más bases y a un valor tal que contribuya al funcionamiento apropiado de las enzimas. Fundamentalmente, dichas una o más bases se administran durante el curso de la reacción de conversión para mantener valores apropiados de pH que contribuyan al funcionamiento apropiado de las enzimas. Dichas bases también pueden administrarse antes del comienzo de la reacción de conversión enzimática. Las bases

adecuadas utilizadas en el contexto de la presente invención para la neutralización de ácido glucónico en desarrollo incluyen aniones de metales alcalinos y/o aniones de metales alcalinotérreos.

5 [0045] Una función adicional de la base(es) añadida a la mezcla de reacción durante el curso de la reacción de conversión puede ser la de proporcionar una fuente de calcio para el gluconato de calcio. Esta fuente de calcio puede administrarse de una vez antes del comienzo de la reacción de conversión enzimática o continuamente durante la reacción. Para esta fuente de calcio, puede utilizarse una base de calcio con gran beneficio, aunque también pueden utilizarse otras fuentes de calcio. La base de calcio utilizada como una fuente de calcio puede ser idéntica a la base(es) utilizada para mantener valores de pH apropiados, pero también puede ser una base diferente. Preferiblemente, la(s) base(s) neutralizante(s) es(son) una(s) base(s) de calcio tal como un carbonato de calcio. Más preferiblemente, la base de calcio es hidróxido de calcio. La base de calcio se administra en una cantidad suficiente para la producción de una cantidad de gluconato de calcio en exceso de 30 g/L de la mezcla de reacción, que es equivalente a una concentración de ión de calcio en exceso de 3,1 g/L a 20°C derivada solamente de gluconato de calcio. La cantidad total de base de calcio administrada a la mezcla de reacción es equivalente a una concentración de ión de calcio en exceso de 3,6 g/L a 40°C derivada solamente de gluconato de calcio.

[0046] La reacción se puede no mantener a pH constante o sí mantener a pH constante utilizando búferes apropiados disponibles para los expertos en la técnica. Durante la reacción de conversión, el pH de la mezcla de reacción se mantiene preferiblemente entre 3 y 9, más preferiblemente entre 4 y 6.

20 [0047] La aireación puede lograrse burbujeando con oxígeno y otra fuente apropiada de oxígeno, tal como aire. La tensión del oxígeno en la mezcla de reacción puede incrementarse utilizando presión en exceso en el reactor. Una tensión de oxígeno disuelto (DOT) que puede utilizarse de manera beneficiosa es preferiblemente mayor que 50%, más preferiblemente, mayor que 70%, de mayor preferencia mayor que 80%.

25 [0048] Se puede seguir el progreso de la conversión monitoreando el consumo de reactantes tales como la cantidad de base neutralizante añadida al recipiente del reactor o monitoreando la velocidad de consumo de oxígeno. La reacción se puede detener cuando se producen niveles de ácido glucónico suficientemente elevados o puede mantenerse activada hasta que se convierta toda la glucosa.

30 [0049] Después de la terminación de la conversión, o cuando se ha producido suficiente gluconato de calcio, las enzimas se retiran preferiblemente de la mezcla de reacción. El retiro de las enzimas de la mezcla de reacción puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los métodos apropiados conocidos en la técnica. En una realización preferida según la presente invención, las enzimas se desactivan y precipitan mediante calentamiento a una temperatura en exceso de 40°C, preferiblemente en exceso de 50°C. El retiro de las enzimas precipitadas puede realizarse mediante centrifugación. Los precipitados de enzimas pueden retirarse de manera beneficiosa por filtración.

35 [0050] La mezcla de reacción clara y libre de enzimas que contiene al gluconato de calcio puede entonces secarse para obtener la sal de gluconato. En una realización preferida según la presente invención, el líquido que contiene al gluconato de calcio se seca mediante atomización utilizando métodos conocidos en la técnica. En otra realización preferida según la presente invención, se obtiene una sal de gluconato de calcio como una mezcla seca de una sal de gluconato y una sal de lactato de calcio. Opcionalmente, dicha mezcla puede ser decolorada mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

40 [0051] Un método según la presente invención puede conllevar a mezclas de sales de gluconato y sales de un ácido orgánico aceptable para uso en alimentos en una proporción de peso de 5:95 a 95:5. Ejemplos ventajosos específicos de estas mezclas incluyen a mezclas de gluconato de calcio y lactato de calcio, de gluconato de calcio de lactato de magnesio, de gluconato de calcio y citrato de calcio, de gluconato de calcio y citrato de magnesio, de gluconato de calcio y malato de calcio, y de gluconato de calcio y malato de magnesio. También, es posible utilizar uno o más ácidos orgánicos con la base mineral de éstos en la mezcla de reacción, añadida durante la reacción enzimática o después. Sin embargo, si se desea, el gluconato de calcio preparado según la presente invención puede purificarse aún más, e. g. por remoción de la sal de un ácido orgánico aceptable para uso en alimentos.

[0052] La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

## 50 **Ejemplos**

### **Métodos analíticos**

#### *Análisis*

55 [0053] El calcio y el magnesio se determinaron mediante Espectrometría de Absorción de Atómica. El gluconato y el lactato se midieron mediante HPLC. Los azúcares reductores se sometieron a ensayo según *LUF Schoorl* presentados como % glucosa/g peso seco. El índice de refracción se midió según la escala de Brix.

*Oxidasa glucosa – catalasa (GOCI/Cat)*

[0054] En todos los experimentos se utilizó una preparación comercial – OxyGO 1500 – de Genencor Internacional. Esta preparación de enzima contenía,  $\geq 1500$  unidades titrimétricas de oxidasa glucosa/ml y  $\geq 400$  unidades de unidades Baker de catalasa/ml, según el fabricante.

*Condiciones de la reacción enzimática*

5 [0055] Todas las reacciones de enzimas se llevaron a cabo en fermentadores de laboratorio (Applikon) con adición automatizada de álcali y control de pH (punto fijado de  $\text{pH}=5,0$ ) y control de temperatura fijado en  $35^{\circ}\text{C}$ . DOT (tensión de oxígeno disuelto) se fijó en 80% mediante control automatizado de flujo de aire (1-2 litro/min) y velocidad de impelente (600-1250 RPM). Se monitoreó la reacción a partir de la velocidad de consumo de oxígeno y álcali.

10 **Ejemplo 1. Preparación de gluconato de calcio /lactato.**

[0056] Se preparó una solución añadiendo 237,6 g de glucosa. $\text{H}_2\text{O}$ , 60 g de ácido láctico (90%) y 516,6 g de agua desmineralizada al fermentador. Con control automatizado de pH y una suspensión al 10% (p/v) de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , se neutralizó el ácido láctico, hasta alcanzar  $\text{pH } 5,0$ . Se requirió un total de 180 ml  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

15 [0057] La reacción enzimática se inició añadiendo 3,0 ml de GOD/Cat ocurriendo un consumo instantáneo de oxígeno y álcali provocado por la conversión oxidante de glucosa a ácido glucónico. Durante la reacción enzimática, se utilizó una suspensión de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  al 10% (p/v) para neutralizar el ácido glucónico producido. Después de 11,5 horas se completó la reacción, indicada por el cese de consumo de álcali y oxígeno. Durante la reacción enzimática se consumieron 462 ml de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Después de eso, se llevó a cabo la desactivación de la enzima calentando la mezcla de reacción durante 30 min a  $80^{\circ}\text{C}$ , lo que resultó en la precipitación de material proteináceo, derivado de la preparación enzimática añadida. Entonces, el líquido se enfrió hasta temperatura ambiente, se estableció el pH en 6,8 añadiendo  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Subsecuentemente, se filtró la mezcla en un filtro de profundidad Seitz para retirar la proteína precipitada.

[0058] Como resultado se obtuvo un líquido claro, incoloro, conteniendo gluconato de lactato de calcio. Esta solución de  $24^{\circ}$  Brix contenía 0,6 M de calcio (24 g/L), 0,4 M de lactato (36 g/L) y 0,8 M de gluconato (156 g/L).

25 [0059] La solución antes mencionada se secó mediante atomización y como resultado, se obtuvo un polvo blanco, que tenía la siguiente composición:

Humedad	3,62%
Calcio	10,26%
Lactato	658 mg/ g como es
30 Gluconato	125 mg/g como tal
Azúcares reductores	0,23%

**Ejemplo 2. Preparación de gluconato de calcio/lactato.**

[0060] En un experimento similar, como se mencionó en el ejemplo 2, se obtuvo una concentración superior de lactato gluconato de calcio durante la reacción enzimática.

35 [0061] Se preparó una solución añadiendo 279 g de glucosa. $\text{H}_2\text{O}$ , 75 g de ácido láctico (90%) y 271 g de agua desmineralizada a un fermentador. El ácido láctico se neutralizó con 240 ml de suspensión de hidróxido de calcio. La conversión enzimática se inició añadiendo 2,25 ml de GOD/Cat con una adición extra de 0,1 ml de esta enzima después de 18 horas. El tiempo de reacción enzimática total fue de 21 horas, durante las cuales se utilizaron 560 ml de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  para neutralizar el ácido glucónico producido.

40 [0062] La solución así obtenida contenía 0,75 M de calcio (30 g/L), 0,5 M de lactato (44,5 g/L) y 1,0 M de gluconato (195 g/L), conteniendo por lo tanto, aproximadamente 270 g/L de materia seca.

45 [0063] Después de calentado y filtrado, de forma tal como se mencionó en el ejemplo 2, el líquido se almacenó durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ , sin indicación visual alguna de cristalización. Subsecuentemente, la solución se secó mediante atomización, resultando en un polvo blanco de la composición siguiente que tenía una composición aproximadamente similar a la mencionada en el ejemplo 2.

**Ejemplo 3. Preparación de gluconato de calcio/lactato de magnesio**

50 [0064] Una cantidad de 349,2 gramos de glucosa. $\text{H}_2\text{O}$ , 140,4, g de ácido láctico (90%) y 688 g de agua desmineralizada se añadieron al fermentador. Con control automatizado de pH y una suspensión al 20% (p/v) de  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , se neutralizó el ácido láctico, hasta alcanzar un  $\text{pH } 5,0$ . Se requirieron 204 g de suspensión de  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  para la neutralización del ácido láctico.



5 [0065] La reacción enzimática se inició añadiendo 3,0 ml de GOD/Cat. Durante la reacción enzimática se utilizó suspensión al 20% (p/v) de  $\text{CaCO}_3$  para neutralizar el ácido glucónico desarrollado. Después de 19,5 horas se añadieron al reactor 0,5 ml de glucosa extra, lo cual se repitió a las 21,5 y 22,5 horas. La reacción se completó después de 24 horas, como lo indicó la terminación del consumo de álcali y oxígeno. Durante la reacción enzimática se consumieron 386,1 ml de  $\text{CaCO}_3$ .

[0066] Después de calentado y filtrado, tal como se mencionó en el ejemplo 2, el líquido claro e incoloro se secó mediante atomización, dando como resultado un polvo blanco de la siguiente composición:

	Humedad	7,4%
	Calcio	70,4 mg/g como tal
10	Magnesio	22,8 mg/g como tal
	Lactato	161 mg/g como tal
	Gluconato	572 mg/g como tal
	Azúcares reductores	0,23%

#### Ejemplo 4. Lactato de calcio fermentativamente /gluconato de calcio enzimáticamente.

15 [0067] En una reacción en un recipiente, se preparó lactato de calcio fermentativamente a partir de glucosa, seguido de conversión enzimática de glucosa a gluconato de calcio. Con este propósito, se llevó a cabo una fermentación utilizando cepa de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC10863. Se añadieron al fermentador 257,5 g de glucosa.1H<sub>2</sub>O, 20 g de extracto de levadura y agua hasta un volumen final de 2000 ml. Se inició la fermentación añadiendo 100 ml de un precultivo, cultivado anaerobiamente durante la noche conteniendo:  
20 Cepa de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863, 4,6% de glucosa, 3% de extracto de levadura, 2,5% de  $\text{CaCO}_3$  y 0,1%  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Durante la fermentación la temperatura de reacción se estableció en 37°C, el pH se estableció en 5,7 utilizando una suspensión al 20% (p/v) de  $\text{Ca(OH)}_2$  para neutralizar el ácido láctico producido. La velocidad del impelente se estableció en 100 RPM y no se utilizó aireación. Durante la fermentación, se utilizaron 440 g de suspensión de  $\text{Ca(OH)}_2$ . Después de 24 horas se detuvo la reacción calentando la mezcla de reacción durante 30 min a 70°C, para desactivar las bacterias.

25 [0068] La reacción enzimática subsiguiente se llevó a cabo añadiendo 847,5 g de glucosa.1H<sub>2</sub>O, 452,5 g de H<sub>2</sub>O y 8 ml de GOD/Cat al caldo de fermentación. Se llevó a cabo aireación como se mencionó anteriormente (ver: condiciones de reacción enzimática). Después de 22,5, 23,5 y 24,5 horas de reacción enzimática se añadieron porciones extra de oxidasa glucosa de 2,2 y 1 ml respectivamente. La reacción se terminó a las 26,5 horas. Se utilizó un total de 819,1 g de suspensión de  $\text{Ca(OH)}_2$  durante la reacción enzimática.

30 [0069] El caldo resultante se procesó mediante centrifugación para retirar la biomasa bacteriana. El material flotante se calentó a 80°C durante 30 min tratándolo con 10 g/l de carbón activado para decolorar la solución. Después de filtrado a través de un filtro de profundidad Seitz, se obtuvo un líquido claro, muy ligeramente amarillo, que se secó mediante atomización.

35 [0070] El polvo blanco resultante tenía la siguiente composición:

	Humedad	4,6%
	Calcio	103 mg/ g como tal
	Lactato	156 mg/g como tal
	Gluconato	643 mg/g como tal
40	Azúcares reductores	0,29%

#### Ejemplo 5. Preparación de un gluconato de calcio – lactato de calcio con una alta proporción de lactato

45 [0071] Se preparó una solución añadiendo 275 g de glucosa.H<sub>2</sub>O y 750 g de agua desmineralizada a un fermentador. La reacción se inició añadiendo 3 ml de GOD/Cat. Simultáneamente se añadió lentamente una solución al 50% de ácido láctico (añadiendo 274 g de ácido láctico al 90% y 220 g de agua desmineralizada) al fermentador bombeando a una velocidad de flujo de 30 ml/hora. La adición de ácido láctico tomó 22 horas.

[0072] Mediante un control automatizado de pH y una suspensión al 25% (p/v) de  $\text{CaCO}_3$ , tanto el ácido glucónico, producido mediante la reacción enzimática como el ácido láctico añadido lentamente, se neutralizaron y mantuvieron a pH 5,0 a lo largo de todo el proceso.

[0073] La reacción enzimática se completó después de 28 horas tal como indicó el cese de consumo de álcali y oxígeno. Se añadió durante el proceso un total de 820 g de suspensión de carbonato de calcio. Entonces se estableció el pH de la solución a 7,0 y se calentó y filtró tal como se mencionó en el ejemplo 1.

5 [0074] La solución resultante clara e incolora contenía 3,9 M de calcio, 1,3 M de lactato y 0,66 M de gluconato (156 g/l de calcio, 117 g/l de lactato, 129 g/l de gluconato).

**Ejemplo 6. Preparación de gluconato /lactato/citrato de calcio.**

10 [0075] Según el método de reacción enzimática del ejemplo 2, se preparó una solución altamente concentrada de gluconato de calcio y lactato de calcio, conteniendo aproximadamente 28% de sustancia seca. A esta mezcla se añadió carbón activado, que se calentó entonces a 90°C para desactivar y precipitar las enzimas. Subsiguientemente, la mezcla se enfrió a 40°C.

[0076] A 2 kg de esta mezcla se añadieron 250 g de monohidrato de ácido cítrico y 200 g de CaCO<sub>3</sub> mientras se revolvía constantemente. Después de cesar la formación de CO<sub>2</sub>, la solución se filtró en un filtro de profundidad Seitz. La solución resultante clara y casi incolora contenía aproximadamente 38% de sustancia seca y tenía un pH de 5,2.

15 [0077] La solución se secó mediante atomización, dando como resultado un polvo blanco (gluconato /lactato/citrato de calcio). El polvo tenía un contenido de humedad del 7,2% y un contenido de calcio del 15,3%, basado en la sustancia seca. El polvo era completamente soluble en agua fría.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la preparación de gluconato de calcio que comprende conversión enzimática de glucosa a ácido glucónico seguido de conversión de ácido glucónico a gluconato de calcio en una mezcla de reacción a la cual se administra una base de calcio en una cantidad suficiente para la producción de una cantidad de gluconato de calcio en exceso de 30 g/l de la mezcla de reacción y la cual comprende además al menos una sal de un ácido orgánico el cual es aceptable para uso en alimentos, y agua.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en donde dicha conversión enzimática se lleva a cabo utilizando oxidasa glucosa y catalasa.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho gluconato de calcio se produce a concentraciones superiores a los 40 g/L en la mezcla de reacción y se disuelve esencial y completamente.
- 15 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicho gluconato de calcio se produce a concentraciones superiores a los 100 g/L en la mezcla de reacción y se disuelve esencial y completamente.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicho gluconato de calcio se produce a concentraciones superiores a los 200 g/L en la mezcla de reacción y se disuelve esencial y completamente.
- 20 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la al menos una sal de un ácido orgánico el cual es aceptable para uso en alimentos se selecciona del grupo de sales de lactato, sales de citrato, sales de malato, y combinaciones de éstas.
7. Método según la reivindicación 6, en donde la sal es una sal de lactato.
8. Método según la reivindicación 7, en donde la sal de lactato se administra como una sal cristalina de lactato.
9. Método según la reivindicación 6, en donde se utiliza una combinación de ácido glucónico, ácido láctico, ácido cítrico y una base de calcio como la al menos una sal de un ácido orgánico.
- 25 10. Método según la reivindicación 7, en donde dicha al menos una sal de lactato se obtiene por neutralización de ácido láctico con una base de metal alcalino y/o base alcalina de metal alcalinotérreo.
11. Método según la reivindicación 10, en donde dicho ácido láctico se obtiene mediante conversión microbiana anaeróbica de un carbohidrato.
12. Método según la reivindicación 11, en donde dicho carbohidrato es glucosa.
- 30 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha al menos una sal de un ácido orgánico la cual es aceptable para uso en alimentos es una sal de calcio.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha conversión enzimática se lleva a cabo a una temperatura de entre 0 y 50°C.
- 35 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha conversión enzimática se lleva a cabo a una temperatura de entre 30 y 40°C.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha conversión enzimática se lleva a cabo a un pH entre 3 y 9.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha conversión enzimática se lleva a cabo a un pH entre 4 y 6.
- 40 18. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha base de calcio se administra a la mezcla de reacción en una cantidad equivalente a una concentración final de ión de calcio de más de 3,6 g/L a 40°C derivada de gluconato de calcio solamente.
19. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha base de calcio es hidróxido de calcio.
- 45 20. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las enzimas se retiran de la mezcla de reacción mediante precipitación por calor seguida de filtración.
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha agua se retira mediante secado por atomización para obtener una mezcla de sal de gluconato/sal de ácido orgánico.

**22.** Método según la reivindicación 21, en donde dicha mezcla de sal de gluconato/sal de ácido orgánico se decolora de manera opcional.

**23.** Mezcla de sal de gluconato/sal de ácido orgánico que puede obtenerse mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la sal de gluconato y la sal de

5 ácido orgánico están presentes en una proporción de peso de 5:95 a 95:5, en donde el gluconato de calcio está presente en exceso de 30 g/l de la mezcla y en donde la sal de ácido orgánico es una sal de citrato o de malato.

**24.** Gluconato/lactato de calcio que comprende una proporción de gluconato de calcio/lactato de calcio de 65/35 basado en % de peso.

Fig. 1

