

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 508**

51 Int. Cl.:

C12P 7/56 (2006.01)

C13B 10/08 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2007 E 07765568 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 2038422**

54 Título: **Producción de ácido láctico a partir de jugo de remolacha azucarera crudo concentrado**

30 Prioridad:

26.06.2006 EP 06115885

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

03.03.2015

73 Titular/es:

**PURAC BIOCHEM BV (100.0%)
ARKELSEDIJK 46
4206 AC GORINCHEM, NL**

72 Inventor/es:

**VISSER, DIANA;
VAN BREUGEL, JAN;
DE BRUIJN, JOHANNES MARTINUS y
A'CAMPO, PAUL**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 530 508 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de ácido láctico a partir de jugo de remolacha azucarera crudo concentrado

5 [0001] La presente invención está en el campo de la preparación de ácido láctico mediante fermentación.

[0002] El ácido láctico, sus sales y ésteres han sido usados desde hace mucho tiempo como aditivo alimenticio y en diferentes aplicaciones químicas y farmacéuticas. Más recientemente, el ácido láctico ha sido usado en la fabricación de polímeros biodegradables tanto como sustituto de presentes materiales plásticos así como en diferentes nuevos usos donde se necesita o se desea biodegradabilidad, como para implantes médicos, suturas absorbibles y fármacos de liberación controlada.

10 La producción de ácido láctico es comúnmente llevada a cabo mediante fermentación por medio de un microorganismo tal como bacterias, levaduras y hongos. El medio de fermentación consiste en un sustrato de carbohidrato junto con un mineral adecuado y nutrientes proteináceos. Un sustrato de fermentación comúnmente usado es el azúcar blanco. El azúcar es el contribuyente más importante en el precio de coste de fabricación del ácido láctico. Por lo tanto se pueden conseguir mayores reducciones en el precio de coste de fabricación del ácido láctico si se puede usar una fuente de carbohidrato menos costosa que el azúcar blanco. Con este fin, diferentes grupos de investigación intentaron fermentar subproductos más económicos y productos intermediarios de una planta productora de azúcar en ácido láctico. No obstante, mientras que la fermentación de estas fuentes de azúcar crudo en etanol puede hacerse fácilmente, surgen problemas cuando se intentan usar estos sustratos a escala industrial para la fermentación en ácido láctico. Estos problemas se basan en el campo de fermentabilidad, almacenamiento - estabilidad, sensibilidad a infecciones, la purificación del producto de la fermentación (es decir el tratamiento posterior), etcétera.

15 Los ejemplos del estado de la técnica donde se describe la fermentación del jugo de remolacha azucarera en etanol son Raw thick juice: manufacture, storage and utilisation as feedstock in biotechnological industry, G. Marke, P.V. Schmidt, R. Rieck, B. Senge, B. Steiner, Zuckerindustrie (1992), 117 (12), 984-90, The manufacture of alcohol from sugar beets, K. Antal, Zeitschrift für Spiritusindustrie (1911) 34, 239-40, 252-3 y Combined production of ethanol and white sugar, K. Austmeyer, H. Roever, H. Zuckerindustrie (1988) 113 (9), 765-72.

20 La bibliografía sobre la fermentación del jugo de remolacha azucarera en ácido láctico a escala industrial no es tan abundante.

[0003] Por ejemplo, en The industrial preparation of lactic acid from sugar beets, A. Bonelli, G. Gulinelli, Ind. Chim. Met. (1918), 5 121-4, se describe la fermentación del jugo de remolacha azucarera crudo en ácido láctico. Este jugo de remolacha azucarera crudo sólo tiene una concentración de azúcar de aproximadamente el 16% en peso. Ante todo, como se indica en la publicación esta fuente de carbohidrato es muy sensible a infecciones y frecuentemente está ya infectada al empezar. Esto se confirma por ejemplo en, F. Hollaus et al.: "Experimental studies on bacterial degradation in sugar of sugar in raw juice and preliming juice." Sucrierie belge, vol 99, No 5, (1980), p. 183. Con fábricas de remolacha azucarera funcionando en campaña y sólo activas 3-4 meses al año, está claro que esto causa problemas de almacenamiento. En segundo lugar, con una concentración de sólo el 16%, los costes de transporte y almacenamiento harán que este proceso sea relativamente costoso. Estos factores hacen que el jugo de remolacha azucarera crudo sea inadecuado como sustrato para la fermentación en ácido láctico a escala industrial.

45 [0004] En Production of lactic acid from sugar beet and cases of inactivation of lactic acid fermentation, I.P. Zakharov, M.F. Federova, Mikrobiologiya (1946), 15(No. 1), 57- 66, también se describe la fermentación del jugo de remolacha azucarera crudo. Zakharov informa de que el calentamiento o esterilización del jugo de remolacha azucarera tiene un efecto perjudicial en la fermentación. El jarabe de remolacha, preparado mediante evaporación del jugo de remolacha hasta obtener un contenido de azúcar del 51%, se diluyó y se intentó la fermentación: prácticamente no se produjo ninguna fermentación ni con ni sin adición de cal (probablemente aquí se refiere a hidróxido de calcio). Zakharov concluyó que un medio de tal jarabe demostró ser inadecuado para la fermentación en ácido láctico.

50 [0005] Al fin y al cabo, se debe concluir que la fermentación de estos sustratos crudos tales como jugo de remolacha azucarera crudo en ácido láctico a escala industrial demuestra ser mucho más complicada que comparado con una fermentación en etanol. Lo mismo se puede decir de la purificación (es decir el tratamiento posterior) del ácido láctico preparado por fermentación comparado con la purificación de etanol fermentativamente preparado.

60 [0006] Hemos descubierto que el jugo de remolacha crudo concentrado con un Brix de al menos 60 (es decir la cantidad de azúcar en peso por cada 100 gramos de líquido) es un sustrato adecuado para la fermentación a escala industrial en ácido láctico y o lactato. Además, parece ser estable en el almacenamiento y no es muy sensible a infecciones. Además, la fermentación en ácido láctico se consigue con el mismo rendimiento, pureza química, pureza óptica, claridad y sabor que con el ácido láctico obtenido a partir de la fermentación de sacarosa, es decir de azúcar blanco.

65 [0007] Cuando se trata la remolacha azucarera, la remolacha normalmente se lava con agua, se corta y las cosetas resultantes se extraen con agua, a partir de las cuales se elimina la pulpa de la remolacha y el jugo crudo resultante

se trata posteriormente a azúcar mediante posterior purificación de jugo [es decir generalmente mediante adición de cal a pH de aproximadamente 11.2 en la pre-calcificación, seguido de una adición de cal sobrante en la adición de cal principal (la alcalinización), adición de dióxido de carbono en dos estadios posteriores (la carbonatación), donde tras la primera carbonatación se retira el residuo/cal de la carbonatación] dando como resultado un jugo fino, dicho jugo fino se concentra dando como resultado un jugo denso, dicho jugo denso se somete a uno o varios pasos de cristalización para formar más grados de azúcar y melaza como subproducto.

[0008] El jugo de remolacha crudo concentrado usado en el proceso según la invención se prepara sometiendo al jugo crudo (aproximadamente 16% de azúcar) a un paso de calentamiento a una temperatura entre 50 y 90 °C y concentrando el jugo de remolacha crudo a un Brix de al menos 60 (es decir, sin adición de cal a un pH de aproximadamente 11.2 y adición de cal sobrante mediante adición de dióxido de carbono en dos estadios con eliminación del residuo/cal de carbonatación). Opcionalmente se lleva a cabo un paso de separación líquido-sólido entre el paso de calentamiento y el paso de concentración y/o después del paso de concentración para eliminar tierra residual, partículas de remolacha pequeñas y proteínas. El paso de concentración se lleva a cabo normalmente mediante evaporación a una temperatura entre 50 y 120 °C. También es posible combinar el paso de calentamiento y de concentración. Si se combinan los pasos de calentamiento y de concentración, la separación sólido/líquido opcional se lleva a cabo o bien antes del calentamiento/concentración o después. El jugo de remolacha crudo concentrado se puede añadir en forma diluida a la fermentación. Normalmente el jugo de remolacha crudo concentrado se diluye a una concentración de aproximadamente 16-30 Brix, más preferiblemente 20-30 Brix.

[0009] El tratamiento de la remolacha azucarera en azúcar blanco y la preparación del jugo de remolacha crudo concentrado a partir del jugo de remolacha crudo que es un paso intermedio del proceso de tratamiento de la remolacha, se ilustra esquemáticamente en la figura 1.

[0010] Se descubrió que la melaza y el jugo denso preparado durante el tratamiento de la remolacha azucarera no son muy adecuados para la fermentación en ácido láctico a escala industrial. Sin desear ligarnos a una teoría, pensamos que durante el tratamiento del jugo de remolacha azucarera crudo en jugo denso y posteriormente en melaza, diferentes impurezas o bien se concentran en la melaza y/o el jugo denso o bien se introducen mediante reacciones que ocurren durante la alcalinización, los tratamientos con calor y con dióxido de carbono (por ejemplo los resultados de las reacciones de Maillard). Dichas impurezas interfieren con las reacciones de fermentación en ácido láctico a escala industrial. Esto se muestra también en nuestros datos experimentales. A veces las impurezas se pueden eliminar mediante diferentes pretratamientos, pero esto requiere pasos de purificación adicionales, laboriosos y costosos.

[0011] Goeksungur y et al.: "Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses lactobacillus delbrueckii IFO 3202" Journ. Chem. Techn. and Biotechn., vol 69, No. 4; (1997) págs. 399-404, y Goeksungur y et al.: "Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized lactobacillus delbrueckii IFO 3202" Journ. Chem. Techn. and Biotechn., vol 74, No.2; (1999) págs. 131-136, describe la producción de ácido láctico a partir de melaza de remolacha pretratada con bacterias específicas. El pretratamiento comprende la acidulación con ácido sulfúrico, ebullición, centrifugación, filtración y clarificación, incluyendo pasteurización. Los experimentos fueron llevados a cabo en matraces de 250 cm³ y 500 cm³ y se indicó que incluso con una concentración inicial de azúcar baja (28.2 g/l) el azúcar no se utilizaba completamente. Los autores lo atribuyen a la naturaleza compleja de la melaza (es decir, las impurezas).

[0012] Monteagudo J.M. et al.: "Kinetics of lactic acid fermentation by lactobacillus delbrueckii grown on beet molasses", Journ. Chem. Techn. and Biotechn., vol 68, No 3, (1997), págs. 271-276 describe los experimentos de la fermentación de ácido láctico en la melaza de remolacha a escala de laboratorio (5 matraces de litro). En este caso el azúcar tampoco era completamente utilizado.

[0013] El Sherbiny et al.: "Utilisation of beet molasses in the production of lactic acid", Egyptian Journ. Of Food SC.vol 14, No 1 (1986), págs. 91-100, también muestra que en la fermentación no se utiliza todo el azúcar y que se forman varios ácidos orgánicos diferentes además del ácido láctico.

[0014] La fermentación industrial en ácido láctico requiere un control estricto de la temperatura y el pH. Debido a la formación del ácido láctico, el pH disminuye durante la fermentación. Una disminución del pH por debajo de un valor crítico, dependiendo del microorganismo usado en el proceso, podría dañar el proceso metabólico del microorganismo y detener el proceso de fermentación. Por lo tanto, es una práctica común añadir un agente neutralizador, es decir una base tal como Ca(OH)₂, Mg(OH)₂, NaOH, KOH o amoníaco a la reacción de fermentación y así producir una sal de lactato tal como lactato de calcio, lactato de sodio, etcétera. Normalmente tanto el ácido láctico como la sal de lactato están presentes en el producto de fermentación, dependiendo del pH del producto de fermentación. La fermentación puede hacerse con microorganismos productores de ácido láctico convencionales tales como bacterias, levaduras y hongos, tales como lactobacilos, bacilos moderadamente termofílicos, Rhizopus y Aspergillus. Se prefieren los bacilos moderadamente termofílicos, tal como *Bacillus coagulans*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus smithii*, porque estos tipos de microorganismos pueden fermentar a temperaturas relativamente altas.

[0015] Después de la fermentación, el producto de fermentación que contiene lactato y ácido láctico debe ser separado de la biomasa. Dicho producto de fermentación con ácido láctico está en forma líquida (es decir líquido o en solución). Normalmente esta biomasa se separa mediante filtración, centrifugado, floculación, coagulación, flotación o combinaciones de los mismos. Después de la separación de la biomasa, se reduce el pH del producto de fermentación mediante la adición de ácidos tales como ácido sulfúrico, de modo que se forma ácido láctico y una sal de la base neutralizadora y el ácido añadido. Por ejemplo, si se usa hidróxido de calcio como agente neutralizador, el producto de fermentación comprenderá tanto ácido láctico como lactato de calcio. Tras la adición de ácido sulfúrico, se formará ácido láctico y sulfato de calcio (yeso). Se retira el yeso, o cualquier otra sal, y se aísla el ácido láctico. El ácido láctico resultante se puede someter a posteriores pasos de purificación.

[0016] Los pasos de purificación convencionales posteriores son destilación incluyendo la destilación de recorrido corto y destilación al vacío, cristalización, SWAP de sales, electrodiálisis, extracción (tanto extracción directa y inversa), tratamiento de carbono, intercambio iónico y combinaciones de los mismos. Estos pasos de purificación se pueden combinar con pasos de concentración intermedios.

[0017] La invención se ilustra posteriormente mediante ejemplos que no deben ser interpretados como limitativos.

Ejemplo 1

Fermentación en ácido láctico utilizando diferentes sustratos

[0018] Se evaluó la fermentabilidad de la melaza, el jugo denso y los sustratos de jugo crudo concentrado que se originan en una fábrica de azúcar (5 muestras con valores de Brix que varían desde 59.6 hasta 73.2, concentradas a temperaturas de 55, 60, 75, y 85 °C) en fermentaciones separadas. Para todos los sustratos, se aplicó el siguiente procedimiento: se diluyó el sustrato con agua hasta obtener una concentración de sacarosa de aproximadamente 300 g/l. Para esta solución, se añadieron 6.0 g/l de nutrientes y se ajustó el pH a 6.4 usando cal. Posteriormente, se calentó el medio a 54°C y se comenzó la fermentación con 10% (v/v) de un inóculo crecido en sacarosa de un microorganismo productor de ácido láctico.

[0019] Durante la fermentación, se añadió cal diluida para mantener el pH a 6.4 y se controló la temperatura a 54°C. Se llevo a cabo una fermentación donde se usó azúcar blanco (sacarosa) como sustrato, pero aplicando las mismas condiciones, para comparar.

[0020] La Tabla 1 resume los resultados de estas fermentaciones. Las fermentaciones basadas en melaza difícilmente muestran actividad; sólo una pequeña fracción del azúcar se consumió después de 45 h y la productividad se colapsó a prácticamente cero. La fermentabilidad del jugo denso fue más activa, pero aun así sólo se consumió una parte del azúcar. El jugo crudo concentrado podría ser fermentado completamente. En comparación con la fermentación de sacarosa de referencia, el rendimiento del ácido láctico y el perfil del subproducto (ácidos orgánicos) es similar; la pureza quiral es inferior pero todavía aceptable. El contenido de azúcar residual es más alto, porque el jugo crudo concentrado contiene algunos azúcares que no son fermentados o son fermentados lentamente.

Tabla 1. Resumen de los resultados de la fermentación para la sacarosa (referencia), melaza, jugo denso y jugo crudo concentrado.

Sustrato	Caldo de composición final				
	Lactato (% p/p de máx. obtenible)	Lactato de pureza quiral (%S)	Azúcares residuales (% p/p de entrada de azúcar)	Polisacáridos (% p/p de lactato formado)	Ácidos orgánicos totales* (%p/p)
Sacarosa***	95%	99.7%	1%	0.9%	n.d.
Melaza	n.d.	n.d.	100%	n.d.	n.d.
Jugo denso	n.d.	n.d.	>50%	n.d.	n.d.
Jugo crudo concentrado**	95%	99.2%	3.5%	2.3%	<0.2%

* Suma de ácidos succínico, pirúvico, fórmico, 2-hidroxi-butírico y acético
 ** Promedio de 11 fermentaciones
 *** Promedio de 13 fermentaciones
 n.d. = no determinado

Ejemplo 2

Jugo de remolacha azucarera crudo concentrado en la fermentación a escala industrial

[0021] Se realizaron dos fermentaciones semi-industriales (a escala de 5000 litros) en el jugo de remolacha crudo

concentrado. Del caldo final de fermentación de estas dos fermentaciones, se eliminó biomasa y se aciduló el producto con lactato.

A. Materiales y métodos

5

Sustrato

[0022] Se cortaron remolachas azucareras, se lavaron y se extrajeron en agua a 70°C. Se eliminó la pulpa y el jugo de remolacha crudo se sometió a un tratamiento con calor a 60 °C, una separación sólido/líquido y una evaporación a 65°C para hacer jugo de remolacha crudo concentrado de un Brix entre 65-70. La densidad de los lotes de jugo de remolacha crudo concentrado fue 1.334 kg/l y 1.335 kg/l a 66 Brix, respectivamente.

10

Fermentación

15

[0023] Se llevó a cabo la fermentación de jugo de remolacha crudo concentrado en el fermentador de 5000 l usando un microorganismo productor de ácido láctico. La composición media de la fermentación se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. El reactor de 5 m³ recibió un medio de la siguiente composición:

20

Composición media	Cantidad añadida
Agua	2000 l
Jugo de remolacha crudo concentrado (apr. 70° Bx)	1000 l
Nutriente	18.16 kg
Volumen de inicio	3000 l
Inóculo	500 l

[0024] Se mantuvo la temperatura durante la fermentación a 54°C. Se controló el pH añadiendo un lodo líquido de cal.

[0025] Ambas fermentaciones comenzaron con 275 g/l de sacarosa (y una cantidad total de aproximadamente 3 g/l de glucosa y fructosa).

25

Eliminación de la biomasa

[0026] Se llevó a cabo la floculación, para eliminar células bacterianas, metales, proteínas, etc., con un caldo final de fermentación sin azúcar mediante la alcalinización del caldo a una temperatura de 75 °C con cal y añadiendo floculante.

30

La capa superior clara fue extraída con sifón tan pronto como se completó el asentamiento de la biomasa. La capa superior alcalina clara fue posteriormente transferida a un segundo reactor de 5 m³ para su acidulación. Se descartó la biomasa que contiene la capa inferior.

35

Acidulación

[0027] Se removió la capa superior alcalina clara continuamente y se añadió ácido sulfúrico (96%) lentamente utilizando una bomba. Se continuó hasta que se alcanzó un pH de 2.2 y una conductividad de aproximadamente 5 mS. Se analizó la precipitación de calcio utilizando una solución de oxalato de amonio (35.5 g/l). Se retiró el caldo acidulado del reactor y se aisló del yeso formado.

40

Se sometió la solución de ácido láctico crudo claro a pasos de purificación convencionales para hacer ácido láctico S final (90%).

45

Resultados

[0028] Ambas fermentaciones resultaron como estaba previsto. El cultivo siguió a la fase de crecimiento y la fase estacionaria o de producción hasta que se quedó sin azúcar. La primera fermentación duró 24 horas. La segunda fermentación finalizó tras 21 horas.

50

El caldo de fermentación final de la primera fermentación tenía una cantidad sustancialmente más alta de polisacáridos que el caldo de fermentación final de la segunda fermentación. La diferencia en la cantidad de nitrógeno total en el caldo de fermentación final de estos dos lotes es insignificante. La pureza óptica del caldo de fermentación final fue 99.3 % para la primera fermentación y 99.4 % para la segunda fermentación.

Los resultados de los análisis de las muestras de caldo de fermentación final están expuestos en la tabla 3. Los resultados muestran que el jugo de remolacha azucarera crudo concentrado se puede fermentar en ácido láctico a escala industrial.

55

Tabla 3. Lactato, azúcares residuales totales, polisacáridos y pureza óptica del caldo de fermentación final

5m ³ caldo de fermentación final	Lactato (% p/p del máx. obtenible)	Azúcares residuales totales (% p/p de entrada)	Polisacáridos (% p/p de lactato)	Pureza quiral (% lactato S)
1 ^o	95%	4.2%	4.0%	99.3%
2 ^o	95%	6.5%	2.6%	99.4%

5 [0029] Después de la purificación, pareció que el ácido láctico resultante cumplía las especificaciones establecidas para el ácido láctico comercial para aplicaciones alimenticias respecto color, sabor y pureza óptica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso para la preparación de ácido láctico y/o lactato donde se usa un jugo de remolacha crudo concentrado, es decir jugo de remolacha que no ha sido sometido a la adición de cal a pH de aproximadamente 11.2 ni a la adición de cal sobrante seguida de la adición de dióxido de carbono en dos estadios con eliminación del residuo/cal de carbonatación, con una concentración de al menos 60 g de sacarosa por 100 g de líquido (al menos un Brix de 60) como sustrato para la fermentación en ácido láctico y/o lactato mediante un microorganismo productor de ácido láctico.
- 10 2. Proceso según la reivindicación 1 donde el jugo de remolacha crudo concentrado tiene un Brix de al menos 70.
3. Proceso según la reivindicación 1 o 2 donde el jugo de remolacha crudo concentrado se diluye hasta un Brix entre 16 y 30 antes de la adición a la fermentación.
- 15 4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el microorganismo es un Bacillus moderadamente termofílico.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el jugo de remolacha crudo concentrado se prepara mediante un procedimiento que comprende un tratamiento con calor de un jugo de remolacha crudo a una temperatura entre 50 y 90 grados Celsius y la concentración del jugo de remolacha crudo a al menos 60 Brix.
- 20 6. Proceso según la reivindicación 5 donde el jugo de remolacha crudo concentrado se prepara mediante un procedimiento que comprende los siguientes pasos:
- 25 a. lavar y cortar la remolacha azucarera para obtener cosetas y extraer las cosetas con agua,
b. eliminar la pulpa de remolacha del jugo de remolacha crudo resultante, y
c. tratar con calor el jugo de remolacha crudo a una temperatura entre 50 y 90 grados Celsius, y
d. concentrar el jugo de remolacha crudo a al menos 60 Brix.
- 30 7. Proceso según las reivindicaciones 5 o 6 donde se combinan el paso de tratamiento con calor y el paso de concentración.
8. Proceso según las reivindicaciones 5, 6 o 7 donde antes del paso de tratamiento con calor y/o entre el paso de tratamiento con calor y el paso de concentración, y/o después del paso de concentración, se lleva a cabo un paso de separación líquido/sólido.
- 35 9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el ácido láctico y/o lactato resultantes de la fermentación son sometidos a uno o varios pasos de purificación.
- 40 10. Proceso según la reivindicación 9 donde los pasos de purificación comprenden separación de la biomasa, extracción, intercambio de sal, destilación, intercambio iónico, tratamiento con carbono, extracción, y/o concentración y combinaciones de los mismos.

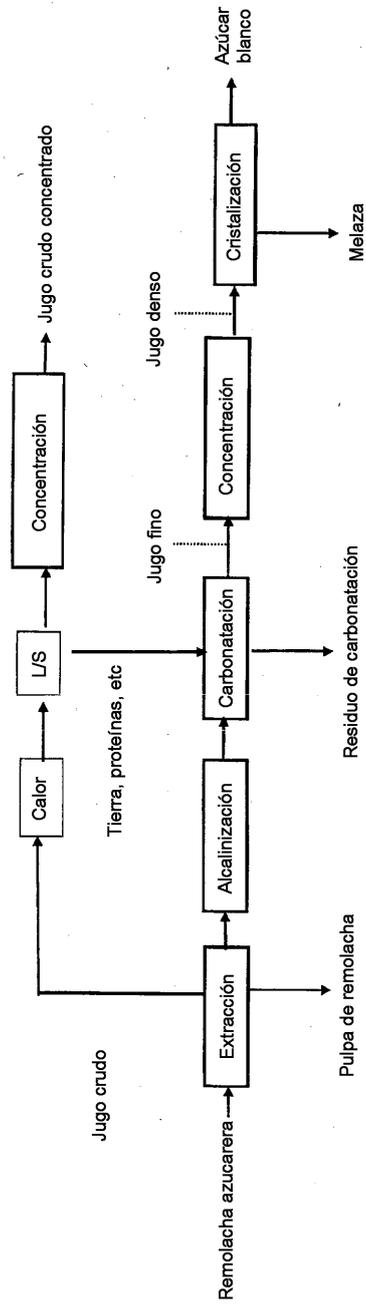


Figura 1. Procesamiento de la remolacha azucarera y tratamiento del jugo crudo para la fermentación en ácido láctico