

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 848**

51 Int. Cl.:

C12P 7/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2016 PCT/EP2016/055753**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16146721**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2016 E 16710201 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 3271466**

54 Título: **Procedimiento en dos etapas de fabricación de productos de sal de propionato**

30 Prioridad:

18.03.2015 EP 15159568

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

30.05.2019

73 Titular/es:

**PURAC BIOCHEM B.V. (100.0%)
Arkelsedijk 46
4206 AC Gorinchem, NL**

72 Inventor/es:

**VISSER, DIANA;
MEIJER, JASPER y
SOARES MENDES, FILIPA CRISTINA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 714 848 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

Procedimiento en dos etapas de fabricación de productos de sal de propionato

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para fabricar productos de sal de propionato mediante un procedimiento de fermentación. Se puede fabricar ácido propiónico a través de la fermentación de una fuente de carbono usando un microorganismo. Por ejemplo, Zhu y col. (Bioresource Technology 101 (2010) 8902-8906) describen un procedimiento de fermentación para la fabricación de propionato de calcio en el que se fermenta glicerol usando *Propionibacterium acidipropionici*. Se añade hidróxido de calcio durante la fermentación para neutralizar el ácido generado durante la fermentación, dando como resultado la formación de propionato de calcio.

10 Las sales de propionato son atractivas para numerosos fines. Por ejemplo, son atractivas para su uso en alimentación y conservación de alimentos, donde proporcionan actividad de amplio espectro de larga duración. Las sales más importantes a este respecto son las sales de calcio, sodio, potasio, y amonio. La sal de calcio se considera de interés particular. La sal de propionato se puede usar en solución, o en forma de una sal sólida.

15 Un problema que se ha descubierto que se produce en la preparación de sales de propionato mediante fermentación reside en la complejidad del procedimiento de fermentación, tanto en lo que respecta a las fuentes de carbono que se pueden fermentar, como en lo concerniente a los productos secundarios que se forman durante la presentación. Existe la necesidad en la técnica de un procedimiento de fermentación para fabricar sales de propionato que combine un alto rendimiento de sal de propionato con un crecimiento eficaz del microorganismo y la posibilidad de obtener un producto de sal de propionato de alta pureza.

La presente invención proporciona un procedimiento que soluciona este problema.

20 La presente invención se refiere a un procedimiento para fabricar productos de sal de propionato a través de fermentación, que comprende las etapas de

- fermentar una fuente de carbono seleccionada entre azúcares y lactato en un medio de fermentación por medio de un microorganismo productor de ácido propiónico para proporcionar un primer caldo de fermentación que comprende una sal de propionato,
- 25 - recuperar el microorganismo productor de ácido propiónico del primer caldo de fermentación,
- someter el primer caldo de fermentación del que se ha recuperado el microorganismo productor de ácido propiónico a una etapa de retirada de agua para formar un primer producto de sal de propionato,
- fermentar una fuente de carbono que comprende glicerol con el microorganismo productor de ácido propiónico recuperado del primer caldo de fermentación en presencia de una sal alcalina inorgánica para proporcionar un
- 30 - segundo caldo de fermentación que comprende una sal de propionato,
- someter el segundo caldo de fermentación a una etapa de purificación que comprende al menos una etapa de precipitación, para formar un segundo producto de sal de propionato.

35 Se describe un procedimiento para la fabricación de productos de propionato mediante fermentación de azúcares y glicerol en Liu y col. (Current Microbiology, vol. 62, 2011, pág. 152-158). Este procedimiento implica la fermentación conjunta de glucosa y glicerol. En el procedimiento de acuerdo con la invención, existen dos etapas de fermentación secuenciales. En la primera etapa de fermentación, se fermenta una fuente de carbono seleccionada entre azúcares y lactato con la formación de una corriente de producto de sal de propionato. Esta etapa también se puede indicar en el presente documento como la etapa de fermentación de azúcar. A continuación, los microorganismos obtenidos en la etapa de fermentación de azúcar se recuperan y se usan para fermentar una fuente de carbono que comprende

40 glicerol, para formar una corriente de producto de sal de propionato adicional. Las dos corrientes de producto de sal de propionato se procesan por separado.

Mediante la aplicación de dos fermentaciones diferentes, es decir, una fermentación basada en azúcar y una fermentación basada en glicerol, y el tratamiento de las corrientes resultantes por separado, se ha descubierto que es posible beneficiarse de los efectos ventajosos de ambos tipos de fermentación. Más específicamente, se ha descubierto que la fermentación de azúcar puede dar como resultado un crecimiento celular eficaz, que produce un gran rendimiento de biomasa. Sin embargo, el producto resultante puede ser relativamente difícil de purificar debido a la presencia de cantidades considerables de aniones acetato. Por el contrario, la fermentación de glicerol produce un producto que se puede purificar hasta productos de sal de propionato de alta pureza. Sin embargo, la fermentación de glicerol solo da como resultado una formación de biomasa limitada. Mediante la combinación de las

45 fermentaciones de la forma prescrita, se obtiene un procedimiento eficaz. A continuación se discutirán ventajas adicionales del procedimiento de acuerdo con la invención.

La primera etapa en el procedimiento de acuerdo con la invención es fermentar una fuente de carbono seleccionada entre azúcares y lactato en un medio de fermentación por medio de un microorganismo productor de ácido propiónico para proporcionar un primer caldo de fermentación que comprende una sal de propionato.

55 Los procedimientos de fermentación para la fabricación de propionato se conocen en la técnica y no requieren ninguna elucidación adicional en el presente documento. Está dentro del ámbito del experto en la materia seleccionar, usando su conocimiento general común, un procedimiento de fermentación adecuado, incluyendo las

condiciones de fermentación, y un microorganismo adecuado. En la selección del microorganismo, se debería tener cuidado de seleccionar un organismo que sea capaz de fermentar azúcares o lactato (en la primera etapa de fermentación del procedimiento de acuerdo con la invención) y glicerol (en la segunda etapa de fermentación del procedimiento de acuerdo con la invención).

5 La fuente de carbono que se usa en la primera etapa del procedimiento de acuerdo con la invención se selecciona entre azúcares y lactato. Algunos ejemplos de azúcares y fuentes de azúcar adecuados incluyen glucosa, sacarosa, jarabe de dextrosa, almidón, almidón hidrolizado, celulosa, celulosa hidrolizada, melaza, xilosa, hidrolizados de lignocelulosa, lactosa y suero. Las fuentes de lactato adecuadas son lactato sódico, lactato potásico, lactato de amonio, lactato de magnesio, lactato de calcio, y ácido láctico. De las fuentes de lactato, el uso de lactato de calcio
10 puede ser preferente, dado que este dará como resultado la formación de propionato de calcio, que es un producto de sal preferente del presente procedimiento. Desde un punto de vista de producción pueden ser preferentes glucosa, lactato y sacarosa. Desde un punto de vista de disponibilidad, pueden ser preferentes fuentes tales como melaza y almidón.

15 Al menos cuando la fuente de carbono se selecciona entre azúcares la fermentación se realiza en presencia de una sal alcalina inorgánica. Esta sal alcalina está presente para asegurar que el pH durante la fermentación no disminuya en un grado inaceptable debido a la fabricación del ácido propiónico. Cuando la fuente de carbono es una sal de lactato, puede no requerirse siempre la adición de una base inorgánica debido a que el lactato se convierte en propionato, lo que no tiene efecto en el pH. No obstante, también en ese caso, se puede añadir una base inorgánica para el ajuste de pH.

20 Las bases adecuadas incluyen hidróxidos, óxidos, y carbonatos de calcio, magnesio, sodio, y potasio, dando como resultado la formación de un caldo de fermentación que contiene respectivamente propionato de calcio, propionato de magnesio, propionato sódico, o propionato potásico. Es preferente dentro del procedimiento de acuerdo de la presente invención usar una sal alcalina de calcio, ya que esto da como resultado la formación de propionato de calcio, que es un producto de sal preferente de acuerdo con la invención. Las sales alcalinas de calcio adecuadas
25 incluyen hidróxidos, óxidos, y carbonatos de calcio.

La siguiente etapa es la retirada de microorganismos del primer caldo de fermentación formado de ese modo. Esta etapa se puede realizar cuando se ha formado suficiente biomasa para la siguiente etapa de fermentación de glicerol. Dado que el microorganismo se va a usar en una fermentación adicional, se debería tener cuidado de aislar los microorganismos en unas condiciones tales que el microorganismo se mantenga vivo. Teniendo esto en cuenta,
30 la retirada del microorganismo se puede realizar de formas conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante una etapa de filtración o una etapa de centrifugación.

En la fermentación de azúcar, el peso de la biomasa ha aumentado, siendo la cantidad de biomasa recuperada generalmente al menos 10 veces el peso de la biomasa añadida originalmente, en particular al menos 20 veces, en ocasiones incluso al menos 100 veces. En la presente memoria descriptiva el peso de la biomasa se calcula como el
35 peso en seco, a menos que se indique expresamente de otro modo.

Es preferente que la retirada de microorganismos del primer caldo de fermentación se realice con un rendimiento relativamente alto. Existen dos razones para esto. En primer lugar, se pretende que se use la biomasa en la fermentación de glicerol posterior. Además, la biomasa remanente en el caldo de fermentación puede afectar a las propiedades del producto fabricado a partir de este caldo, por ejemplo en forma de un efecto perjudicial en el color
40 del producto. Se considera preferente que la biomasa se retire de un modo tal que el producto resultante tenga una turbidez de como máximo 1000 NTU, en particular como máximo 500 NTU, más específicamente como máximo 200 NTU. Es preferente una turbidez de como máximo 100 NTU.

En una etapa adicional del procedimiento de acuerdo con la invención, el primer caldo de fermentación del que se ha recuperado el microorganismo productor de ácido propiónico se somete a una etapa de retirada de agua para formar
45 un primer producto de sal de propionato, en particular un producto de propionato de calcio. Esta etapa de retirada de agua se puede realizar de numerosas formas.

En una primera realización, el primer caldo de fermentación del que se ha recuperado el microorganismo productor de ácido propiónico se somete a una etapa de retirada de agua en su totalidad. En este caso, se forma un primer producto de sal de propionato que comprende toda la materia presente en el primer caldo de fermentación del que
50 se ha recuperado el microorganismo productor de ácido propiónico, incluyendo los nutrientes remanentes. Esta etapa de secado se puede realizar de formas conocidas en la técnica para la retirada de agua, incluyendo secado por pulverización, secado en tambor de vacío, secado de película delgada, por ejemplo, secado de película delgada agitada, secado agitado mecánicamente, granulación por pulverización, y liofilización.

El producto de sal resultante es un material sólido, en particular un material sólido formado por partículas, con un contenido de sal de propionato en el intervalo de un 30-70 % en peso, en particular un 40-60 % en peso, de sal de propionato, en particular propionato de calcio, comprendiendo el resto una o más sales adicionales de ácidos carboxílicos, en particular sales de succinato y/o acetato, y componentes adicionales que resultan de, por ejemplo, la biomasa y componentes residuales del medio/nutrientes. En una realización, el producto de sal resultante
55

comprende sal de acetato en el intervalo de un 3-20 % en peso, en particular un 8-15 % en peso, más en particular un 10-13 % en peso y/o sal de succinato en una cantidad de un 0-10 % en peso, en particular un 3-6 % en peso. Es preferente que propionato de calcio, succinato de calcio y acetato de calcio compongan al menos un 85 % en peso del total del primer producto de propionato de calcio obtenido de este modo, en particular al menos un 90 % en peso, más en particular entre un 90 y un 98 % en peso.

En lo indicado anteriormente, los porcentajes se calculan como el anión (acetato, succinato, propionato) con respecto al material sólido anhidro total.

Se ha de observar que es posible incluir otros componentes en el caldo de fermentación antes del secado por pulverización, por ejemplo, sales de ácido carboxílico adicionales tales como lactatos o acetatos, vehículos tales como maltodextrina, almidón, sólidos de leche, suero, harina u otros ingredientes funcionales tales como extracto de té verde, nisina, y extracto de romero. Esto puede ser atractivo si se desea fabricar un producto con una composición particular.

En otra realización, la etapa de someter el primer caldo de fermentación del que se ha recuperado el microorganismo productor de ácido propiónico se realiza mediante un procedimiento que incluye precipitación de una sal de propionato, en particular propionato de calcio, del primer caldo de fermentación. La precipitación se puede iniciar por concentración y otras medidas conocidas por mejorar el rendimiento de una etapa de precipitación, por ejemplo, reducción de la temperatura o adición de compuestos que reducen la solubilidad. La precipitación se puede realizar de forma discontinua o continua, en una etapa individual o en múltiples etapas. El producto de sal de propionato precipitado, en particular propionato de calcio, se separa del medio acuoso. Esto se puede realizar mediante procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo uno o más de filtración, centrifugación, decantación, etc. Está dentro del ámbito del experto en la materia seleccionar una forma adecuada. Si se desea, el producto de sal de propionato se puede lavar para aumentar la pureza del producto. El líquido de lavado, si se usara, puede ser, por ejemplo, agua o una solución de sal de propionato. El líquido de lavado se puede reciclar para obtener un mayor rendimiento. El producto de propionato de calcio sólido se puede secar según se desee.

En esta realización, es posible precipitar todos los tipos de sales de carboxilato, en particular las sales de carboxilato de calcio, presentes en el sistema, en particular propionato de calcio en combinación con succinato de calcio (si estuviera presente) y/o acetato de calcio (si estuviera presente). En este caso, se puede obtener un producto final, por ejemplo, con un contenido de sal de propionato, en particular propionato de calcio, en el intervalo de un 30-80 % en peso, en particular un 40-70 % en peso, sal de acetato, en particular acetato de calcio, en un intervalo de un 3-20 % en peso, en particular un 8-15 % en peso, más en particular un 10-13 % en peso y sal de succinato, en particular succinato de calcio, en una cantidad de un 0-10 % en peso, en particular un 3-6 % en peso. Es preferente que propionato de calcio, succinato de calcio, y acetato de calcio compongan al menos un 85 % en peso del total del primer producto de propionato de calcio, obtenido de este modo, en particular al menos un 90 % en peso, más en particular al menos un 95 %. En lo indicado anteriormente, los porcentajes se calculan como el anión (acetato, succinato, propionato) con respecto al material sólido anhidro total.

También es posible precipitar secuencialmente sales de succinato y sales de propionato del primer caldo de fermentación, y esto se puede realizar, por ejemplo, mediante un procedimiento para fabricar una sal de propionato sólida a partir de una mezcla que comprende propionato y succinato que comprende las etapas de

- proporcionar un medio acuoso que comprende aniones succinato y aniones propionato,
- proporcionar una sal soluble inorgánica en el medio acuoso en una cantidad tal que la mayoría de los iones succinato se conviertan en una sal de succinato sólida mientras que la mayoría de los iones propionato permanezcan en solución,
- separar el medio acuoso que comprende la mayoría de los iones propionato de la sal de succinato sólida,
- aumentar la concentración de sal en el medio acuoso para convertir la mayoría de los iones propionato en una sal de propionato sólida,
- separar la sal de propionato sólida del medio acuoso.

Como se ha indicado anteriormente, el microorganismo productor de ácido propiónico se recupera del primer caldo de fermentación. En una etapa siguiente en el procedimiento de acuerdo con la invención, se fermenta una fuente de carbono que comprende glicerol con el microorganismo productor de ácido propiónico recuperado del primer caldo de fermentación en presencia de una sal alcalina para proporcionar un segundo caldo de fermentación que comprende una sal de propionato. Los procedimientos de fermentación para la fabricación de ácido propiónico partiendo de una fuente de carbono que comprende glicerol se conocen en la técnica y no requieren ninguna elucidación adicional en el presente documento. Está dentro del ámbito del experto en la materia seleccionar, usando su conocimiento general común, un procedimiento de fermentación adecuado, incluyendo las condiciones de fermentación.

La fuente de carbono usada en esta etapa de fermentación comprende glicerol. Se ha descubierto que el uso de glicerol como fuente de carbono hace posible obtener un procedimiento de fermentación que genera cantidades relativamente altas de sal de propionato, en particular propionato de calcio en combinación con cantidades relativamente bajas de sales de acetato. Esto es atractivo debido a que la separación de sales de propionato y sales de acetato es generalmente complicada. Es preferente que la fuente de carbono consista en al menos un 70 % en

peso de glicerol, más en particular al menos un 80 % en peso, aún más en particular al menos un 90 % en peso, calculado con respecto a la cantidad total de la fuente de carbono proporcionada durante la fermentación.

Se añade una base durante la etapa de fermentación para compensar la disminución de pH que se produciría debido a la producción de ácidos carboxílicos.

5 Las bases adecuadas incluyen hidróxidos, óxidos, y carbonatos de calcio, magnesio, sodio, y potasio, dando como resultado la formación de un caldo de fermentación que contiene, respectivamente, propionato de calcio, propionato de magnesio, propionato sódico, o propionato potásico. Es preferente dentro del procedimiento de acuerdo con la invención usar una sal alcalina de calcio, dado que esto da como resultado la formación de propionato de calcio, que es un producto de sal preferente de acuerdo con la invención. Las sales alcalinas de calcio adecuadas incluyen hidróxidos, óxidos, y carbonatos de calcio.

10 Las sales alcalinas usadas en las dos etapas de fermentación pueden ser iguales o diferentes. Por razones de eficacia puede ser preferente que la sal alcalina proporcionada en la fermentación de una fuente de carbono seleccionada entre azúcares y lactato y la sal alcalina proporcionada en la fermentación de una fuente de carbono que comprende glicerol sean sales del mismo catión. El uso de sales de calcio es particularmente preferente.

15 Una vez se ha procesado la fermentación hasta el grado deseado, el segundo caldo de fermentación se somete a una etapa de purificación que comprende al menos una etapa de precipitación, para formar un segundo producto de propionato de calcio.

20 En general, el segundo caldo de fermentación se somete en primer lugar a una etapa de retirada de biomasa, que se puede realizar de las formas conocidas en la técnica. Se hace referencia a la que se ha indicado anteriormente para la retirada de biomasa del primer caldo de fermentación. Al igual que para la etapa descrita anteriormente, se considera preferente que la biomasa se retire de un modo tal que el producto resultante tenga una turbidez de como máximo 1000 NTU, en particular como máximo 500 NTU, más específicamente como máximo 200 NTU. Es preferente una turbidez de como máximo 100 NTU. Se ha descubierto que la presencia de biomasa puede interferir en la etapa de precipitación adicional en el procedimiento de acuerdo con la invención. La biomasa aislada en esta etapa se puede proporcionar a una segunda fermentación basada en glicerol, si se desea esto.

25 El caldo resultante del que se ha retirado la biomasa se somete al menos a una etapa de precipitación, para formar un segundo producto de sal de propionato.

Antes de la etapa de precipitación, el medio se puede poner en contacto con un adsorbente, si así se desea, en particular un adsorbente de carbón activado, para retirar impurezas.

30 La etapa de precipitación se puede realizar como se ha descrito anteriormente. La precipitación se puede iniciar por concentración del medio, y/o mediante otras medidas conocidas por mejorar el rendimiento de una etapa de precipitación, por ejemplo, reducción de la temperatura o adición de compuestos que reducen la solubilidad. Se hace referencia a lo que se ha indicado anteriormente en la etapa de precipitación. El producto de sal de propionato precipitado, en particular propionato de calcio, se separa del medio acuoso. Esto se puede realizar mediante procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo uno o más de filtración, centrifugación, decantación, etc. Está dentro del ámbito del experto en la materia seleccionar una forma adecuada. Si así se desea, el producto de sal de propionato se puede lavar para aumentar la pureza del producto. El líquido de lavado, si se usara, puede ser, por ejemplo, agua o una solución de sal de propionato. El líquido de lavado se puede reciclar para obtener un mayor rendimiento. El producto de sal de propionato sólido se puede secar según se desee.

40 En una realización, además de sales de propionato, también se pueden precipitar sales de carboxilato, en particular sales de succinato y/o sales de acetato. En particular, las sales de carboxilato de calcio presentes en el sistema se pueden precipitar conjuntamente, en particular propionato de calcio en combinación con succinato de calcio (si estuviera presente) y/o acetato de calcio (si estuviera presente). En este caso, se puede obtener un producto final, por ejemplo, con un contenido de sal de propionato, en particular propionato de calcio, en el intervalo de un 50-90 % en peso, en particular un 60-80 % en peso, más en particular un 70-80 % en peso, sal de acetato, en particular acetato de calcio, en el intervalo de un 0-5 % en peso, en particular un 0-2 % en peso, y sal de succinato, en particular succinato de calcio, en una cantidad de un 0-20 % en peso, en particular un 0-10 % en peso, más en particular un 0-5 % en peso. Es preferente que propionato de calcio, succinato de calcio, y acetato de calcio compongan al menos un 85 % en peso del total del primer producto de propionato de calcio, obtenido de este modo, en particular al menos un 90 % en peso, más en particular al menos un 95 %. En lo indicado anteriormente, los porcentajes se calculan como anión (acetato, succinato, propionato) con respecto al material sólido anhidro total.

También es posible precipitar secuencialmente sales de succinato y sales de propionato del segundo caldo de fermentación, y esto se puede realizar, por ejemplo, mediante un procedimiento para fabricar una sal de propionato sólida a partir de una mezcla que comprende propionato y succinato que comprende las etapas de

- 55 - proporcionar un medio acuoso que comprende aniones succinato y aniones propionato,
 - proporcionar una sal soluble inorgánica en el medio acuoso en una cantidad tal que la mayoría de los iones succinato se conviertan en una sal de succinato sólida mientras que la mayoría de los iones propionato permanezcan en solución,
 - separar el medio acuoso que comprende la mayoría de los iones propionato de la sal de succinato sólida,
 60 - aumentar la concentración de sal en el medio acuoso para convertir la mayoría de los iones propionato en una sal de propionato sólida,

- separar la sal de propionato sólida del medio acuoso.

Ejemplo 1: Fermentación de glucosa seguida de fermentación de glicerol

5 Un fermentador que comprendía 5 kg de medio se inoculó con un cultivo de *Propionibacterium acidipropionici*. El medio contenía 80 g/kg de glucosa y 52 g/kg de YEP (pasta de extracto de levadura, 50 % de sólidos en seco). El fermentador se operó a 30 °C y con un pH de 6,5. El pH se controló mediante la adición de solución de Ca(OH)₂. Después de ± 45 horas, la fermentación se detuvo. El caldo de fermentación se centrifugó a 5000 rpm. El microorganismo estaba presente en el sedimento de la etapa de centrifugación.

En esta etapa, la cantidad de biomasa se aumentó de los 20 gramos añadidos inicialmente a 150 gramos recogidos, ambos calculados como peso en seco.

10 Se añadieron 24 gramos de biomasa a un fermentador que comprendía 1 kg de medio que contenía 80 g/kg de glicerol y 52 g/kg de YEP. El fermentador se operó a 30 °C y con un pH de 7,0. El pH se controló mediante la adición de solución de Ca(OH)₂.

15 La fermentación produjo una productividad volumétrica de 1,2 gramos de propionato de calcio por kilogramo de medio por hora. El rendimiento total de la fermentación fue de un 72 % en peso, calculado como los gramos de propionato por gramo de glicerol.

Ejemplo 2: Procesamiento del caldo de fermentación de glucosa

20 Se realizó una fermentación de glucosa de forma análoga a la que se ha descrito en el primer párrafo del Ejemplo 1. La biomasa se aisló del mismo mediante una centrifugación como se ha descrito en el mismo. Se secaron 1000 gramos del caldo de fermentación remanente usando un evaporador rotatorio, en primer lugar a presión atmosférica, y a continuación el vacío. Después de 6 horas, se obtuvo un producto seco.

El caldo de fermentación comprendió los siguientes ácidos orgánicos, según se determina usando GC.

Tabla 1: Ácidos orgánicos por GC en el caldo de fermentación

componente		
ácido fórmico	[% (p/p)]	< 0,02
ácido acético	[% (p/p)]	0,57
ácido propiónico	[% (p/p)]	2,4
etanol	[% (p/p)]	< 0,02
ácido maleico	[% (p/p)]	< 0,01
ácido oxálico	[% (p/p)]	< 0,01
ácido sórbico	[% (p/p)]	< 0,01
ácido fumárico	[% (p/p)]	< 0,01
ácido succínico	[% (p/p)]	0,24
ácido láctico	[% (p/p)]	0,02
ácido pirúvico	[% (p/p)]	< 0,03
ácido 2-hidroxibutírico	[% (p/p)]	< 0,01

El producto sólido después de la etapa de secado tenía la siguiente composición:

25

Tabla 2: composición del producto sólido

componente		
ácido propiónico	[% (p/p)]	36
ácido acético	[% (p/p)]	9,2
ácido succínico	[% (p/p)]	4,2
calcio	[% (p/p)]	18,2
agua	[% (p/p)]	16,5

(continuación)

componente	
sólidos adicionales	resto

5 Este ejemplo ilustra la etapa de retirada de agua para formar un primer producto de propionato de calcio. En la operación comercial, la etapa de retirada de agua se realizará mediante otros procedimientos, por ejemplo, secado por pulverización, pero se pueden obtener resultados análogos.

Ejemplo 3: Procesamiento del caldo de fermentación de glicerol

10 Se procesó un caldo de fermentación de glicerol obtenido de forma análoga al segundo párrafo del Ejemplo 1 como sigue a continuación: el caldo de fermentación obtenido a partir de la fermentación de glicerol se sometió a una etapa de centrifugación a 5000 rpm. El sedimento de la etapa de centrifugación fue el microorganismo. El sobrenadante se procesó adicionalmente. Al sobrenadante, se añadió carbón activo en una cantidad de un 0 % en peso por gramo de propionato de calcio, un 0,1 % en peso por gramo de propionato de calcio, o un 10 % en peso por gramo de propionato de calcio. El caldo de fermentación al que se añadió el carbón activo se mantuvo durante una hora a 60 °C. El carbón activo se retiró por filtración al vacío usando un filtro de 0,2 micrómetros.

15 Como se puede observar a partir de la siguiente Tabla, un tratamiento con carbón activo no dio como resultado la retirada de propionato de calcio del sistema:

materiales de partida	Propionato de Ca [% p/p]	Succinato de Ca [% p/p]	Acetato de Ca [% p/p]	Glicerol [% p/p]
102 °C - sin carbón activo	5,35	0,22	< 1	< 0,15
102 °C - 0,1 (% p/p) de carbón	5,35	0,23	< 1	< 0,15
102 °C - 10 (%p/p) de carbón	5,48	0,23	< 1	< 0,15

20 Se precipitó propionato de calcio sólido del medio de fermentación purificado por concentración del medio a través de evaporación de agua. La evaporación se realizó a 102-103 °C (temperatura del medio) en un baño de aceite de 150 °C a presión atmosférica. Después de aproximadamente dos horas, se produjo la nucleación, que se pudo observar por la formación de turbidez. En ese punto temporal, la temperatura del baño de aceite se redujo a 120 °C para reducir la tasa de evaporación durante la cristalización. Se añadió cierta cantidad de aceite frío al baño de aceite para acelerar la reducción de la temperatura. Aproximadamente una hora después del inicio de la nucleación, se detuvo la evaporación.

Los cristales se separaron del líquido usando filtración al vacío o centrifugación.

25 El tratamiento de carbón activo dio como resultado una disminución considerable en el color del material de partida durante la etapa de evaporación. Además, durante la etapa de evaporación, la solución se oscureció. Este efecto fue mucho más pronunciado para la muestra que no se había sometido a una etapa de evaporación que para la muestra que se había sometido a la etapa de evaporación. Esto se puede observar a partir de los valores de APHA en la siguiente tabla.

Carbón activado (% p/p)	Material de partida [APHA]	Material obtenido [APHA]
0	280	6600
0,1	110	4200
10	< 5	1900

30 El producto sólido obtenido a partir de las muestras sometidas a tratamiento con carbón activo también tuvo un color mucho mejor que el producto obtenido a partir de la muestra en la que no se realizó el tratamiento con carbón activo.

La composición de los productos fue la que sigue a continuación:

Muestras de torta húmeda	Separación S/L	Propionato de Ca [% p/p]	Succinato de Ca [% p/p]	Acetato de Ca [% p/p]	Glicerol [% p/p]	Pérdida de MC a 80 °C¹
102 °C - blanco	Filtración al vacío (embudo de Buchner, 4-7 µm)	58,62	1,21	1,21	< 0,1	35 %
102 °C - blanco	Centrífuga (5.000 rpm, tamaño de poro de 100 µm, 1 minuto)	76,46	0,47	1,21	< 0,15	16 %
102 °C - 0,1 (% p/p) de carbón	Centrífuga (10.000 rpm, tamaño de poro de 100 µm, 1 minuto)	87,92	0,28	1,34	< 0,1	10 %
102 °C - 10 (% p/p) de carbón	Filtración al vacío (embudo de Buchner, 4-7 µm)	61,16	1,61	1,21	< 0,1	25 %

1 Pérdida de MC a 80 °C significa el contenido de humedad de los materiales, determinado manteniendo el material durante 16 horas en un horno a una temperatura de 80 °C.

- 5 Como se puede observar a partir de la tabla anterior, el uso de una centrífuga para la separación sólido líquido dio mejores resultados que el uso de un embudo de vacío. La relevancia de este resultado para una operación a escala comercial es limitada.

Los productos húmedos se secaron a 80 °C durante 16 horas para formar un producto seco.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de fabricación de productos de sal de propionato a través de fermentación, que comprende las etapas de
 - 5 - fermentar una fuente de carbono seleccionada entre azúcares y lactato en un medio de fermentación por medio de un microorganismo productor de ácido propiónico para proporcionar un primer caldo de fermentación que comprende una sal de propionato,
 - recuperar el microorganismo productor de ácido propiónico del primer caldo de fermentación,
 - someter el primer caldo de fermentación del que se ha recuperado el microorganismo productor de ácido propiónico a una etapa de retirada de agua para formar un primer producto de sal de propionato,
 - 10 - fermentar una fuente de carbono que comprende glicerol con el microorganismo productor de ácido propiónico recuperado del primer caldo de fermentación en presencia de una sal alcalina inorgánica para proporcionar un segundo caldo de fermentación que comprende una sal de propionato,
 - someter el segundo caldo de fermentación a una etapa de purificación que comprende al menos una etapa de precipitación, para formar un segundo producto de sal de propionato.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sal de propionato generada en el primero y el segundo caldos de fermentación son sales del mismo catión.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la sal de propionato generada en el primero y el segundo caldos de fermentación son sales de propionato de calcio.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la fuente de carbono seleccionada entre azúcares y lactato se selecciona entre glucosa, lactato, y sacarosa.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la etapa de fermentar una fuente de carbono seleccionada entre azúcares y lactato, el peso de la biomasa ha aumentado de un modo tal que la cantidad de biomasa recuperada es generalmente al menos 10 veces el peso de la biomasa añadida originalmente.
- 25 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la cantidad de biomasa recuperada es al menos 20 veces el peso de la biomasa añadida originalmente.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la cantidad de biomasa recuperada es al menos 100 veces el peso de la biomasa añadida originalmente.
- 30 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer caldo de fermentación del que se ha recuperado el microorganismo productor de ácido propiónico se somete a una etapa de retirada de agua en su totalidad.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la etapa de someter el primer caldo de fermentación del que se ha recuperado el microorganismo productor de ácido propiónico se realiza mediante un procedimiento que incluye precipitación de una sal de propionato del primer caldo de fermentación
- 35 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la sal de propionato es propionato de calcio.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la fuente de carbono que comprende glicerol consiste en al menos un 70 % en peso de glicerol, calculado sobre la cantidad total de la fuente de carbono proporcionada durante la fermentación.
- 40 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la fuente de carbono que comprende glicerol consiste en al menos un 80 % en peso de glicerol.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la fuente de carbono que comprende glicerol consiste en al menos un 90 % en peso de glicerol.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el segundo caldo de fermentación se somete en primer lugar a una etapa de retirada de biomasa.
- 45 15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que además de sales de propionato, también se precipitan otras sales de carboxilato.
16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que las otras sales de carboxilato son sales de succinato y/o acetato.
- 50 17. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que las sales de succinato y las sales de propionato se precipitan secuencialmente del segundo caldo de fermentación.