

## PROCESO PARA LA FABRICACIÓN DE PRODUCTOS DE PROPIONATO

## CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un proceso para la fabricación de productos de propionato a través de un proceso de fermentación.

## ANTECEDENTES

El ácido propiónico puede ser fabricado mediante fermentación de una fuente de carbono utilizando un microorganismo. Por ejemplo, Zhu et al. (Bioresource Technology 101 (2010) 8902-8902) describe un proceso de fermentación para la fabricación de propionato de calcio en el que el glicerol es fermentado utilizando *Propionibacterium acidipropionici*. Durante la fermentación se añade hidróxido de calcio para neutralizar el ácido generado durante la fermentación, dando lugar a la formación de propionato de calcio.

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

Un problema que se ha encontrado que ocurre durante la preparación de sales de propionato a través de fermentación reside en la complejidad del proceso de fermentación, tanto en

lo que se refiere a las fuentes de carbono que se pueden fermentar como a los productos secundarios que se forman durante la fermentación. Existe la necesidad en la técnica de un proceso de fermentación para la fabricación de sales de propionato que combina 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 proceso que resuelve este problema.

### **SUMARIO**

La presente invención se refiere a un proceso para la fabricación de productos de propionato a través de fermentación, que comprende las etapas de:

- fermentar una fuente de carbono seleccionada de 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 remoción 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 segundo caldo de fermentación que comprende una sal 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.

En el proceso de acuerdo con la invención, hay dos etapas de fermentación secuenciales. En la primera etapa de fermentación, una fuente de carbono seleccionada de azúcares y lactato se fermenta bajo la formación de una corriente de producto de sal de propionato. Esta etapa también se puede indicar aquí como la etapa de fermentación de azúcar. A continuación, los microorganismos obtenidos en la etapa de fermentación de azúcar se recuperan y se utilizan para fermentar una fuente de carbono que comprende glicerol, para formar una corriente de producto de sal de propionato adicional. Las dos corrientes de producto de sal de propionato son procesadas por separado.

Mediante la aplicación de dos fermentaciones diferentes, es decir, una fermentación a base de azúcar y una fermentación a base de glicerol, y tratando separadamente las corrientes resultantes, se ha descubierto que es posible beneficiarse de los efectos ventajosos de ambos tipos de fermentación. Más específicamente, se ha descubierto que la fermentación del azúcar puede dar como resultado un crecimiento celular eficaz,

lo que hace que se obtenga un gran rendimiento de biomasa. Sin embargo, el producto resultante puede ser relativamente difícil de purificar debido a la presencia de cantidades sustanciales de aniones acetato. Por el contrario, la fermentación con glicerol produce un producto que puede purificarse a productos de sal de propionato de alta pureza. Sin embargo, la fermentación con glicerol sólo da lugar a una formación limitada de biomasa. Combinando las fermentaciones de la manera prescrita, se obtiene un proceso eficiente. Otras ventajas del proceso de acuerdo con la invención se describirán a continuación.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

El proceso de acuerdo con la invención se describirá con más detalle a continuación.

La primera etapa del proceso de acuerdo con la invención es fermentar una fuente de carbono seleccionada de 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 propionato.

Los procesos de fermentación para la fabricación de propionato son conocidos en la técnica y no requieren más aclaración en la presente memoria. Está dentro del alcance del experto en la técnica seleccionar, usando su conocimiento general común, un proceso de fermentación adecuado, incluyendo condiciones de fermentación y un microorganismo adecuado. Para la selección del microorganismo, se debe tener cuidado en

seleccionar un organismo que sea capaz de fermentar azúcares o lactato (en la primera etapa de fermentación del proceso de acuerdo con la invención) y glicerol (en la segunda etapa de fermentación del proceso de acuerdo con la invención).

La fuente de carbono utilizada en la primera etapa del proceso de acuerdo con la invención se selecciona entre azúcares y lactato. 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 de leche. Las fuentes de lactato adecuadas son lactato sódico, lactato potásico, lactato amónico, lactato magnésico, lactato cálcico y ácido láctico. De las fuentes de lactato, puede preferirse el uso de lactato de calcio, ya que esto dará como resultado la formación de propionato de calcio, que es un producto preferido de la invención. Desde un punto de vista de producción, se puede preferir glucosa, lactato y sacarosa. Desde un punto de vista de disponibilidad, se pueden preferir fuentes como la melaza y el almidón.

Al menos cuando la fuente de carbono se selecciona entre los azúcares, la fermentación se lleva a cabo en presencia de una sal alcalina inorgánica. Esta sal alcalina está presente para asegurar que el pH durante la fermentación no disminuya hasta un grado inaceptable debido a la fabricación del ácido propiónico. Cuando la fuente de carbono es una sal de lactato, la adición de una base inorgánica puede no siempre ser necesaria porque el lactato se convierte en propionato, que no tiene un efecto sobre el pH. Sin embargo, también en este caso, se puede añadir una base inorgánica para ajustar el pH.

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 de sodio o propionato de potasio. En el proceso de acuerdo con la invención se prefiere el uso de una sal de calcio alcalina, ya que esto da lugar a la formación de propionato de calcio, que es un producto preferido de acuerdo con la invención. Sales de calcio alcalinas adecuadas incluyen hidróxidos, óxidos y carbonatos de calcio.

La siguiente etapa es la eliminación de microorganismos del primer caldo de fermentación así formado. Esta etapa se puede llevar a cabo cuando se ha formado suficiente biomasa para la siguiente etapa de fermentación con glicerol. Dado que el microorganismo se va a utilizar en una fermentación adicional, se debe tener cuidado de aislar los microorganismos en condiciones tales que el organismo se mantenga vivo. Teniendo esto en cuenta, la eliminación del microorganismo puede llevarse a cabo de maneras conocidas en la técnica, por ejemplo, a través de una etapa de filtración o una etapa de centrifugación.

En la fermentación del azúcar, el peso de la biomasa ha aumentado, siendo la cantidad de biomasa recuperada generalmente al menos 10 veces el peso de la biomasa originalmente añadida, en particular al menos 20 veces, a veces incluso al menos 100 veces. En la presente especificación, el peso de la biomasa se calcula como peso seco, a menos que se indique expresamente lo contrario.

Se prefiere que la eliminación de microorganismos del primer caldo de fermentación se lleve a cabo con un rendimiento relativamente alto. Hay dos razones para esto. En primer lugar, la biomasa está destinada a ser utilizada en la subsiguiente fermentación con glicerol. Además, la biomasa que queda en el caldo de fermentación puede afectar las propiedades del producto fabricado a partir de este caldo, por ejemplo, en forma de un efecto perjudicial sobre el color del producto. Se considera preferido que la biomasa se remueva de modo que el producto resultante tenga una turbidez de como máximo 1000 NTU, en particular como máximo 500 NTU, más específicamente como máximo 200 NTU. Una turbidez de como máximo 100 NTU es preferida.

En una etapa adicional del proceso de acuerdo con la invención, el primer caldo de fermentación a partir del cual se ha recuperado el microorganismo productor de ácido propiónico se somete a una etapa de remoción de agua para formar un primer producto de sal de propionato, en particular un producto de propionato de calcio. Esta etapa de remoción de agua se puede llevar a cabo de varias maneras.

En una primera realización, el primer caldo de fermentación a partir del cual se ha recuperado el microorganismo productor de ácido propiónico se somete a una etapa de remoción 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 a partir del cual se han recuperado microorganismos que producen ácido propiónico, incluyendo los nutrientes restantes. Esta etapa de secado se puede llevar a cabo de maneras conocidas en

la técnica para la remoción de agua, incluyendo secado por pulverización, secado al vacío de tambor, secado en película delgada, por ejemplo, secado en película fina agitada, secado mecánicamente agitado, granulación por pulverización y liofilización.

El producto resultante es un material sólido, en particular un material particulado sólido, con un contenido de sal de propionato en el intervalo de 30-70 % en peso, en particular 40-60 % en peso, de sal de propionato, en particular propionato de calcio, donde el remanente comprende una o más de otras sales de ácidos carboxílicos, en particular sales de succinato y/o acetato, y componentes adicionales resultantes, por ejemplo, de la biomasa y del medio residual/componentes nutrientes. En una realización, el producto resultante comprende sal de acetato en el intervalo de 3-20 % en peso, en particular 8-15 % en peso, más en particular 10-13 % en peso y/o succinato en una cantidad de 0-10 % en peso, en particular 3-6 % en peso. Se prefiere que el propionato de calcio, el succinato de calcio y el acetato de calcio constituyan al menos el 85 % en peso del primer producto de propionato de calcio total obtenido de esta manera, en particular al menos 90 % en peso, más en particular entre 90 y 98 % en peso.

En lo anterior, los porcentajes se calculan como anión (acetato, succinato, propionato) sobre el material sólido anhidro total.

Se observa que es posible incluir otros componentes en el caldo de fermentación antes del secado por pulverización, por ejemplo, sales de ácidos carboxílicos adicionales tales como

lactatos o acetatos, vehículos como maltodextrina, almidón, sólidos de leche, suero de leche, 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 a partir del cual se ha recuperado el microorganismo productor de ácido propiónico se lleva a cabo mediante un proceso que comprende la precipitación de una sal de propionato, en particular propionato de calcio del primer caldo de fermentación. La precipitación puede iniciarse por concentración y otras medidas conocidas para 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 solo etapa o en múltiples etapas.

El producto precipitado de sal de propionato, en particular propionato de calcio, se separa del medio acuoso. Esto puede realizarse por métodos conocidos en la técnica, incluyendo uno o más de filtración, centrifugación, decantación, etc. Queda dentro del alcance del experto en la técnica seleccionar una manera adecuada. Si se desea, el producto de sal de propionato puede lavarse para aumentar la pureza del producto. El líquido de lavado, si se usa, puede, por ejemplo, ser agua o una solución de sal de propionato. El líquido de lavado se puede reciclar para obtener un alto rendimiento. El producto sólido de propionato de calcio se puede secar según se desee.

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

También es posible precipitar secuencialmente sales de succinato y sales de propionato del primer caldo de fermentación, esto puede hacerse, por ejemplo, a través de un proceso 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 convierta en una sal succinato sólida mientras que la mayoría de los iones propionato permanece en solución,

- separar el medio acuoso que comprende la mayoría de los iones propionato de la sal succinato sólida,

- aumentar la concentración de sal en el medio acuoso para convertir la mayoría de iones propionato en sal de propionato sólida,

- separar la sal de propionato sólida del medio acuoso.

Como se indicó anteriormente, el microorganismo productor de ácido propiónico es recuperado del primer caldo de fermentación. En una etapa siguiente del proceso de acuerdo con la invención, una fuente de carbono que comprende glicerol es fermentada 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 propionato.

Los procesos de fermentación para la fabricación de ácido propiónico partiendo de una fuente de carbono que comprende glicerol son conocidos en la técnica y no requieren de mayor explicación en la presente memoria. Queda dentro del alcance del experto en la técnica seleccionar, usando su conocimiento general común, un proceso de fermentación adecuado, incluyendo las condiciones de fermentación.

La fuente de carbono utilizada en esta etapa de

fermentación comprende glicerol. Se ha encontrado que el uso de glicerol como fuente de carbono hace posible obtener un proceso de fermentación que genera cantidades relativamente elevadas de sal de propionato, en particular propionato de calcio en combinación con cantidades relativamente bajas de sales de acetato. Esto es atractivo porque la separación de sales de propionato y sales de acetato es generalmente complicada. Se prefiere que la fuente de carbono consista en al menos 70 % en peso de glicerol, más en particular al menos 80 % en peso, aún más en particular al menos 90 % en peso, calculado sobre la cantidad total de fuente de carbono proporcionada durante la fermentación.

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

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 propionato de calcio, propionato de magnesio, propionato de sodio o propionato de potasio, respectivamente. En el proceso de acuerdo con la invención se prefiere el uso de una sal de calcio alcalina, ya que esto da lugar a la formación de propionato de calcio, que es un producto preferido de acuerdo con la invención. Sales de calcio alcalinas adecuadas incluyen hidróxidos, óxidos y carbonatos de calcio.

Las sales alcalinas utilizadas en las dos etapas de fermentación pueden ser iguales o diferentes. Por razones de eficacia, puede preferirse la sal alcalina proporcionada en la

fermentación de una fuente de carbono seleccionada de azúcares y lactato y la sal alcalina proporcionada en la fermentación de una fuente de carbono que comprende glicerol para ser sales del mismo catión. El uso de sales de calcio es particularmente preferido.

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

En general, el segundo caldo de fermentación se somete primero a una etapa de remoción de biomasa, que puede llevarse a cabo de maneras conocidas en la técnica. Se hace referencia a lo que se ha indicado anteriormente con respecto a la remoción de biomasa del primer caldo de fermentación. En cuanto a la etapa descrita anteriormente, se considera preferido que la biomasa se remueva de modo que el producto resultante tenga una turbidez de como máximo 1000 NTU, en particular como máximo 500 NTU, más específicamente como máximo 200 NTU. Una turbidez de como máximo 100 NTU es preferida. Se ha encontrado que la presencia de biomasa puede interferir con la etapa de precipitación adicional en el proceso de acuerdo con la invención.

La biomasa aislada en esta etapa puede proporcionarse a una segunda fermentación a base de glicerol, si se desea.

El caldo resultante del que se ha removido la biomasa es sometido al menos a una etapa de precipitación, para formar un

segundo producto de sal de propionato.

5        Antes de la etapa de precipitación, el medio puede contactarse, si se desea, con un adsorbente, en particular un adsorbente de carbono activo, para eliminar las impurezas.

10       La etapa de precipitación puede llevarse a cabo como se ha descrito anteriormente. La precipitación puede iniciarse por concentración del medio, y/o por otras medidas conocidas para mejorar el rendimiento de una etapa de precipitación, por ejemplo, reducción de la temperatura o adición de compuestos  
15       que reducen la solubilidad. Se hace referencia a lo que se ha indicado anteriormente con respecto a la etapa de precipitación.

20       El producto precipitado de sal de propionato, en particular propionato de calcio, se separa del medio acuoso. Esto puede realizarse por métodos conocidos en la técnica, incluyendo uno o más de filtración, centrifugación,  
25       decantación, etc. Queda dentro del alcance del experto en la técnica seleccionar una manera adecuada. Si se desea, el producto de sal de propionato puede lavarse para aumentar la pureza del producto. El líquido de lavado, si se usa, puede,  
30       por ejemplo, ser agua o una solución de sal de propionato. El líquido de lavado se puede reciclar para obtener un alto rendimiento. El producto de sal de propionato sólida puede secarse según se desee.

      En una realización, además de las sales de propionato, se precipitan también otras sales de carboxilato, en particular sales de succinato y/o acetato. En particular, las sales de

carboxilato de calcio presentes en el sistema pueden precipitarse conjuntamente, en particular propionato de calcio en combinación con succinato de calcio (si está presente) y/o acetato de calcio (si está presente). En este caso, se puede obtener, por ejemplo, un producto final con un contenido de sal de propionato, en particular propionato de calcio en el intervalo de 50-90 % en peso, en particular de 60-80 % en peso, más en particular de 70-80 % en peso, sal de acetato, en particular acetato de calcio en el intervalo de 0-5 % en peso, en particular de 0-2 % en peso, y sal de succinato, en particular succinato de calcio, en una cantidad de 0-20 % en peso, en particular de 0-10 % en peso, más en particular de 0-5 % en peso. Se prefiere que el propionato de calcio, el succinato de calcio y el acetato de calcio constituyan al menos el 85 % en peso del primer producto de propionato de calcio total, obtenido de esta manera, en particular al menos el 90 % en peso, más en particular al menos 95 %. En lo anterior, los porcentajes se calculan como anión (acetato, succinato, propionato) sobre el material sólido anhidro total.

25

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

30

- 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 convierta en una sal succinato sólida mientras que la mayoría de los iones propionato permanece en solución,

5

- separar el medio acuoso que comprende la mayoría de los iones propionato de la sal succinato sólida,

10

- aumentar la concentración de sal en el medio acuoso para convertir la mayoría de iones propionato en sal de propionato sólida,

15

- separar la sal de propionato sólida del medio acuoso.

Será evidente para el experto en la técnica que las diversas realizaciones y preferencias descritas en la presente memoria pueden combinarse, a menos que se presenten como alternativas que se excluyen mutuamente.

25

La presente invención será elucidada por los siguientes ejemplos, sin estar limitada a los mismos o por los mismos.

### **EJEMPLOS**

**Ejemplo 1: Fermentación de glucosa seguida de fermentación de glicerol**

30

Se inoculó un fermentador que comprendía 5 kg de medio 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 secos). El fermentador se hizo funcionar a 30°C y con un pH de 6,5. El pH se controló añadiendo solución de  $\text{Ca(OH)}_2$ . Después de  $\pm$  45 horas se detuvo la

fermentación. El caldo de fermentación se centrifugó a 5000 RPM. El microorganismo estaba presente en el sedimento de la etapa de centrifugación.

5

En esta etapa, la cantidad de biomasa se aumentó de 20 gramos añadidos inicialmente a 150 gramos cosechados, 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 hizo funcionar a 30°C y con un pH de 7,0. El pH se controló añadiendo solución de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

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 72 % en peso, calculado como gramos de propionato por gramo de glicerol.

20

## 25      **Ejemplo 2:      Preparación del caldo de fermentación de glucosa**

Se llevó a cabo una fermentación de glucosa análoga a la descrita en el primer párrafo del Ejemplo 1. La biomasa se aisló de la misma por centrifugación como se describe en el mismo. Se secaron 1000 gramos del caldo de fermentación restante usando un evaporador rotatorio, primero bajo presión atmosférica, luego al vacío. Después de 6 horas, se obtuvo un producto seco.

30

El caldo de fermentación comprendía los siguientes ácidos

orgánicos, como se determinó usando cromatografía de gases (GC) :

**Tabla 1: Ácidos orgánicos por GC en 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:

**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       |
| sólidos adicionales |           | equilibrio |

Este ejemplo ilustra la etapa de remoción de agua para formar un primer producto de propionato de calcio. En la

operación comercial, la etapa de remoción de agua se llevará a cabo por otros métodos, por ejemplo, secado por pulverización, pero pueden obtenerse resultados análogos.

5

**Ejemplo 3: Preparación del caldo de fermentación de glicerol**

10

Un caldo de fermentación de glicerol obtenido de forma análoga al segundo párrafo del Ejemplo 1 se procesa como sigue:

15

El caldo de fermentación obtenido de la fermentación con 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.

20

Al sobrenadante se añadió carbono activo en una cantidad de 0 % en peso por gramo de propionato de calcio, 0,1 % en peso por gramo de propionato de calcio, o 10 % en peso por gramo de propionato de calcio. El caldo de fermentación al que se añadió carbón activo se mantuvo durante una hora a 60 °C. El carbón activo se removi6 mediante filtraci6n al vacio utilizando un filtro de 0,2 micras.

30

Como puede observarse en la Tabla siguiente, un tratamiento con carb6n activo no dio como resultado la remoci6n del 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 carb6n activo | 5.35                    | 0.22                   | <1                   | <0.15           |

|                                  |      |      |    |       |
|----------------------------------|------|------|----|-------|
| 102 °C - 0.1 (%p/p)<br>de carbón | 5.35 | 0.23 | <1 | <0.15 |
| 102 °C - 10 (%p/p)<br>de carbón  | 5.48 | 0.23 | <1 | <0.15 |

5

10

15

20

El propionato de calcio sólido se precipitó a partir del medio de fermentación purificado concentrando el medio a través de la evaporación del agua. La evaporación se llevó a cabo a 102-103 °C (temperatura del medio) en un baño de aceite a 150 °C bajo presión atmosférica. Después de aproximadamente dos horas, se produjo la nucleación, como pudo observarse a partir de la formación de una niebla. En ese momento, la temperatura del baño de aceite se redujo a 120 °C para reducir la velocidad de evaporación durante la cristalización. Se añadió aceite fresco al baño de aceite para acelerar la reducción de la temperatura. Aproximadamente una hora después del inicio de la nucleación, se detuvo la evaporación.

25

Los cristales fueron separados del líquido usando filtración al vacío o centrifugación.

30

El tratamiento con carbón activo dio como resultado una disminución sustancial del color del material de partida para la etapa de evaporación. Adicionalmente, durante la etapa de evaporación, la solución se oscureció. Este efecto fue mucho más pronunciado para la muestra que no había sido sometida a una etapa de evaporación que para la muestra que había sido sometida a la etapa de evaporación. Esto se puede ver en los valores APHA en la siguiente tabla.

5

| Carbón activado<br>(%p/p) | Material de partida<br>[APHA] | Material obtenido<br>[APHA] |
|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 0                         | 280                           | 6600                        |
| 0.1                       | 110                           | 4200                        |
| 10                        | <5                            | 1900                        |

10

El producto sólido obtenido de las muestras sometidas a un tratamiento de carbón activo también tenía un color mucho mejor que el producto obtenido de la muestra en el que no se llevó a cabo ningún tratamiento con carbón activo.

15

La composición de los productos fue la siguiente:

20

25

30

| Muestras<br>de pasta<br>húmeda      | Separación<br>S/L                                                            | Propionato<br>de Ca<br>[%p/p] | Succinato<br>de Ca<br>[%p/p] | Acetato<br>de Ca<br>[%p/p] | Glicerol<br>[%p/p] | Pérdida<br>MC a 80<br>°C <sup>1</sup> |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| 102 °C -<br>en blanco               | Filtración<br>al vacío<br>(embudo<br>Buchner,<br>4-7 µm)                     | 58.62                         | 1.21                         | 1.21                       | <0.1               | 35 %                                  |
| 102 °C -<br>en blanco               | Centrífuga<br>(5000 rpm,<br>tamaño de<br>poro de<br>100 µm, 1<br>minuto)     | 76.46                         | 0.47                         | 1.21                       | <0.15              | 16 %                                  |
| 102 °C -<br>0.1 (%p/p)<br>de carbón | Centrífuga<br>(10000<br>rpm,<br>tamaño de<br>poro de<br>100 µm, 1<br>minuto) | 87.92                         | 0.28                         | 1.34                       | <0.1               | 10 %                                  |

|                                    |                                                          |       |      |      |      |      |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------|------|------|------|------|
| 102 °C -<br>10 (%p/p)<br>de carbón | Filtración<br>al vacío<br>(embudo<br>Buchner,<br>4-7 µm) | 61.16 | 1.61 | 1.21 | <0.1 | 25 % |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------|------|------|------|------|

1

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

Como puede observarse en la tabla anterior, el uso de una centrífuga para separación de sólidos líquidos dio mejores resultados que el uso de un embudo de vacío. La relevancia de este resultado para el funcionamiento a escala comercial es limitada.

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

25

30

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para la fabricación de productos de propionato mediante fermentación, que comprende las etapas de:

- fermentar una fuente de carbono seleccionada de 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 remoción 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 segundo caldo de fermentación que comprende una sal 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.

2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las sales de propionato generadas en el primer y el segundo caldos de fermentación son sales del mismo catión y preferiblemente propionato de calcio.

3. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2,

en el que la fuente de carbono seleccionada de azúcares y lactato se selecciona entre glucosa, lactato y sacarosa.

5           4. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en la etapa de fermentación de una fuente de carbono seleccionada de azúcares y lactato, el peso de la biomasa tiene incrementos de tal  
10 manera que la cantidad de biomasa recuperada es generalmente al menos 10 veces el peso de la biomasa añadida originalmente, en particular al menos 20 veces, a veces incluso al menos 100 veces.

15           5. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer caldo de fermentación a partir del cual se ha recuperado el  
20 microorganismo productor de ácido propiónico se somete a una etapa de remoción de agua en su totalidad.

          6. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las  
25 reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa de someter el primer caldo de fermentación, a partir del cual se ha recuperado el microorganismo productor de ácido propiónico, se lleva a cabo mediante un proceso que abarca la precipitación de una sal  
30 propionato, en particular propionato de calcio, del primer caldo de fermentación.

          7. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fuente de carbono que comprende glicerol consiste en al menos el 70 % en peso de glicerol, más en particular al menos el 80 % en peso, todavía más en particular al menos el 90 % en peso, calculado sobre la cantidad total de fuente de carbono proporcionada durante la

fermentación.

5        8.    Proceso de acuerdo con una cualquiera de las  
reivindicaciones anteriores, en el que el segundo caldo de  
fermentación se somete primero a una etapa de remoción de  
biomasa.

10       9.    Proceso de acuerdo con una cualquiera de las  
reivindicaciones anteriores, en el que además de las sales de  
propionato, también se precipitan otras sales de carboxilato,  
en particular sales de succinato y/o acetato.

15       10. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las  
reivindicaciones 1 a 8, en el que las sales de succinato y las  
sales de propionato se precipitan secuencialmente a partir del  
20    segundo caldo de fermentación.

25

30

**RESUMEN**

La invención se refiere a un proceso para la fabricación de  
5 productos de propionato mediante fermentación, que comprende  
las etapas de: - fermentar una fuente de carbono seleccionada  
de azúcares y lactato en un medio de fermentación por medio de  
un microorganismo productor de ácido propiónico para  
10 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  
15 microorganismo productor de ácido propiónico a una etapa de  
remoción 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  
20 recuperado del primer caldo de fermentación en presencia de  
una sal alcalina inorgánica para proporcionar un segundo caldo  
de fermentación que comprende una sal propionato, - someter el  
segundo caldo de fermentación a una etapa de purificación que  
25 comprende al menos una etapa de precipitación, para formar un  
segundo producto de sal de propionato. El proceso de acuerdo  
con la invención permite la fabricación eficiente de productos  
de sales de propionato.