

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 854 374**

51 Int. Cl.:

C12R 1/465 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12P 7/24 (2006.01)

C12N 11/08 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2007 PCT/MX2007/000053**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2008 WO08130210**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2007 E 07747199 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020 EP 2157184**

54 Título: **Procedimiento para producir vainillina a partir de microorganismos inmovilizados por cultivo de superficie**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.09.2021

73 Titular/es:

**LABORATORIOS MINKAB, S.A. DE C.V. (100.0%)
Prolongación Toltecas No. 4, Col. Los Reyes
Ixtacala
Tlalnepantla, C.P. 54090, MX**

72 Inventor/es:

**ASAFF TORRES, ALI;
DE LA TORRE MARTÍNEZ, MAYRA y
MACIAS OCHOA, ROBERTO MIGUEL**

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 854 374 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 para producir vainillina a partir de microorganismos inmovilizados por cultivo de superficie

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a un procedimiento para producir vainillina. Más particularmente, se refiere a un procedimiento para producir vainillina mediante biotransformación de ácido ferúlico por *Streptomyces setonii* ATCC 39116 en espuma de poliuretano a partir de un cultivo de superficie que es una realización simple del cultivo sobre sustrato sólido.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La vainillina es un compuesto ampliamente utilizado como saborizante en la industria de alimentos, como aroma en la industria cosmetológica y como precursor para la síntesis química de fármacos en la industria farmacéutica. En su mayor parte, la vainillina es obtenida por síntesis química a partir del guayacol y la lignina como es descrita por Clark, "Vanillin" en Perf Flavor (1990) 15: 45-54. Sin embargo, si bien la vainillina obtenida por este método es adecuada para su uso en las industrias cosmetológica y farmacéutica, puede confrontar problemas legislativos en la industria de alimentos. Además en la actualidad, la tendencia entre los consumidores por productos de origen natural va en creciente aumento, dejando de lado los productos sintéticos. Hasta ahora la vainillina natural comercializada ha sido
15 obtenida únicamente por extracción de las vainas de la vainilla, aunque a un costo muy elevado de la materia prima.

En los últimos 13 años se han hecho muchos esfuerzos para la obtención de vainillina natural por procesos biológicos alternativos, los cuales emplean microorganismos (bacterias, levaduras, hongos), células vegetales o sus sistemas enzimáticos.

20 En general, estos procesos biológicos involucran la biotransformación de un precursor adecuado en vainillina. Se han señalado como precursores al eugenol, isoeugenol, curcumina, algunas resinas y al ácido ferúlico. En la mayoría de los casos los rendimientos de transformación son muy bajos como se detalla en la revisión publicada en: "H. Priefert *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2001) 56: 296-314". Solo en algunos casos los procedimientos fermentativos que se han descrito en los últimos años ofrecen rendimientos volumétricos elevados con un potencial económico atractivo.

25 Por ejemplo, Blandine Audras y Joeelle More, en la solicitud de patente internacional WO-9634971, describen un procedimiento en cultivo sumergido para la biotransformación de ácido ferúlico a vainillina por *Streptomyces setonii* (cepa CNCM n.º I-1555) con el microorganismo inmovilizado en esférulas de alginato de calcio. Aquí se alcanzaron concentraciones de vainillina entre 0,65 y 0,90 g l⁻¹ en un periodo de 3 días con un rendimiento molar de 53 % a 69 % con respecto al ácido ferúlico consumido. Adicionalmente se obtuvieron 0,65 g l⁻¹ de ácido vainillínico como subproducto de la fermentación. Una ventaja económica de este procedimiento es que el biocatalizador puede ser
30 reciclado.

Juergen Rabenhorst y Rudolf Hopp, en la solicitud de patente europea EP-0405197, describen el aislamiento de una nueva cepa de *Amycolatopsis* sp., que en cultivo sumergido es capaz de convertir 19,92 g l⁻¹ de ácido ferúlico en 11,5 g l⁻¹ de vainillina en 32 horas con un rendimiento molar del 77,8 %.

35 Andreas Muheim *et al.* en la patente estadounidense US-6.235.507 B1, revelan un procedimiento en cultivo sumergido para la biotransformación de ácido ferúlico en vainillina por *Streptomyces setonii* cepa ATCC 39116, alcanzando una concentración de vainillina de 9 g l⁻¹ en un periodo de 26 horas de biotransformación, con un rendimiento molar del 51 %.

40 Las enzimas y los genes correspondientes involucrados en la biotransformación a vainillina han sido recientemente caracterizados y utilizados para su producción (WO-9735999, US-20010014467A1). El creciente conocimiento de las enzimas involucradas en las rutas metabólicas de biotransformación ofrece nuevas oportunidades para la ingeniería metabólica y para la construcción de organismos genéticamente modificados (US-20030070188A1, US-20030092143A1, US-6.372.461B1, WO-2004/006657A1).

Sin embargo, el uso de organismos genéticamente modificados en la producción de vainillina puede resultar problemático por las objeciones de los consumidores a este tipo de productos, especialmente en Europa.

45 En diferentes publicaciones científicas se señala a la vainillina como un compuesto intermediario en las rutas metabólicas de degradación de sus precursores. Dos publicaciones se refieren concretamente a la implicación de la vainillina en la degradación del ácido ferúlico. Toms y Wood, Biochemistry (1970) 9: 337-43, cultivaron *Pseudomonas* sp. sobre ácido ferúlico y elucidaron la ruta de degradación. El producto final obtenido fue el ácido vainillínico por lo cual se dedujo que la vainillina es únicamente un intermediario inestable de esta vía. Sutherland *et al.*, Can. J. Microbiol. (1983) 29: 1253-57, estudiaron la degradación de ácido ferúlico en cultivos de *Streptomyces setonii*,
50 encontrando que este microorganismo es capaz de acumular vainillina como un producto de degradación que puede ser posteriormente convertida en ácido vainillínico, alcohol vainillínico y/o guayacol. En ambos casos, el procedimiento de degradación del ácido ferúlico involucra un paso único de desacetilación de este compuesto que no emplea CoA.

El ácido ferúlico empleado como sustrato para la biotransformación es un compuesto muy abundante en la naturaleza

al ser un componente de la pared celular de muchas especies vegetales como el arroz, el maíz, la remolacha azucarera entre otras. Sin embargo, no se encuentra en forma libre sino formando enlaces glicosídicos con las cadenas de carbohidratos de la pared celular, por lo cual para su liberación se recurren a métodos hidrolíticos ya sean estos enzimáticos o alcalinos. Birgit Michelsen *et al.*, patente estadounidense US-6.143.543 A1, describen un método enzimático para la obtención de ácido ferúlico libre. En la solicitud de patente internacional WO-2004/110975 A1 se revela un procedimiento para la recuperación y purificación del ácido ferúlico ya en su forma libre a partir de las aguas de cocimiento del maíz conocidas como "nexayote" resultantes de la industria del nixtamal (maíz especialmente preparado para la producción de tortitas).

Los procedimientos de biotransformación para la obtención de vainillina hasta ahora descritos son desarrollados en cultivo sumergido. Este sistema de fermentación si bien permite llevar un control bueno de proceso, tiene costes de inversión y operación elevados debido a sus características intrínsecas y la productividad volumétrica alcanzada.

Durante los últimos años se ha despertado un gran interés por procedimientos en cultivo sobre sustrato sólido, o su realización más simple que es el cultivo de superficie, gracias un mejor desarrollo de muchos microorganismos en estos sistemas de cultivo, una velocidad específica de crecimiento alta, así como rendimientos elevados en la producción de metabolitos de importancia comercial y enzimas (Papagianni *et al.*, Food Technol. Biotechnol. (2001) 39: 319-326).

Es por tanto necesario proveer un procedimiento para producir vainillina en concentraciones que resultan industrialmente interesantes mediante la biotransformación de ácido ferúlico con microorganismos inmovilizados a partir de un cultivo de superficie.

20 **SUMARIO DE LA INVENCION**

En vista de lo anteriormente descrito y con el propósito de dar solución a las limitantes encontradas, es objeto de la invención ofrecer un procedimiento de biotransformación de ácido ferúlico en vainillina, el procedimiento comprende los pasos de (a) inmovilizar un microorganismo de la cepa ATCC 39116 de *Streptomyces setonii* en espuma de poliuretano; (b) agregar una solución de ácido ferúlico o de alguna de sus sales; (c) incubar para llevar a cabo la reacción de biotransformación; (d) recuperar la solución de biotransformación obtenida en el paso (c); y (e) extraer la vainillina de la solución de biotransformación obtenida en el paso (d).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Los detalles característicos de la invención se describen en los siguientes párrafos en conjunto con las figuras que lo acompañan, los cuales tienen el propósito de definir la invención pero sin limitar el alcance de esta.

30 Figura 1 muestra al actinomiceto *Streptomyces setonii* desarrollado y fijado en la espuma de poliuretano después de su cultivo de superficie.

Figura 2 muestra perfiles de crecimiento de *Streptomyces setonii* en un cultivo sumergido conforme al estado de la técnica ($\mu = 0,22 \text{ h}^{-1}$) y en un cultivo de superficie de acuerdo con la invención ($\mu = 0,70 \text{ h}^{-1}$).

35 Figura 3 muestra los análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) del medio de biotransformación en tres momentos desde el inicio del procedimiento. Se observa los productos obtenidos: 1) ácido ferúlico, 2) vainillina, 3) alcohol vainillínico, 4) ácido vainillínico, y 5) guayacol.

Figura 4 muestra la concentración máxima de vainillina alcanzada durante varios ciclos de biotransformación y la productividad volumétrica en cada uno de ellos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 La invención contempla un procedimiento microbiológico con un alto rendimiento de biotransformación de ácido ferúlico en vainillina que comprende inicialmente el cultivo de superficie en un medio nutritivo de microorganismos de la bacteria *Streptomyces setonii* ATCC 39116. El cultivo de superficie, que es una realización simple del cultivo sobre sustrato sólido, comprende un sistema con las siguientes características: El medio de cultivo acuoso, después de haber sido inoculado con el microorganismo, es agregado a una espuma de poliuretano, que es un material compresible, inerte, poroso, en el cual es absorbido. Entre los intersticios de la espuma, el medio nutritivo inoculado va formando películas muy delgadas de aproximadamente 0,50 μm a aproximadamente 0,90 μm de espesor. De esta manera se obtiene un sistema muy compacto con gran superficie, donde aproximadamente 1 g de espuma contiene entre 5 ml a 50 ml de medio, preferentemente entre 20 ml a 35 ml de medio, brinda una superficie de cultivo de 3000 cm^2 a 4000 cm^2 , tal como se describe en la tesis doctoral de Romero-Gómez, Universidad Autónoma Metropolitana (Iztapalapa), México D.F. (2001) y en la patente mexicana MX-178723 para la producción de enzimas y otros metabolitos fúngicos. La espuma es de una densidad de 0,005 g ml^{-1} a 0,070 g ml^{-1} , preferentemente de 0,015 g ml^{-1} a 0,025 g ml^{-1} , cortada en pequeños cubos de 0,2 cm a 3,0 cm de arista, preferentemente de 0,4 cm a 0,9 cm de arista, depositados en recipientes cerrados como matraces o bandejas, con una altura de lecho entre 1 cm a 10 cm, preferentemente entre 3 cm a 6 cm. El término "altura de lecho" está referido a la distancia entre la base y la cota vertical máxima alcanzada por los cubos de poliuretano depositados en el recipiente que los contiene. El sistema es

incubado a una temperatura de 30 °C a 45 °C, durante un periodo de 6 horas a 35 horas, periodo en el cual el microorganismo va creciendo como micelio sobre la superficie de las películas formadas, quedando fijado entre las estructuras del material poroso inerte compresible, tal y como se observa en la Figura 1. Al final de la fermentación, la biomasa alcanza un máximo y la fuente de carbono, generalmente glucosa, queda agotada. Los nutrientes residuales como la fuente de nitrógeno y sales del medio de cultivo en solución son entonces separados de la biomasa fijada en el soporte por compresión. El medio de cultivo acuoso residual es desechado.

Para el procedimiento de biotransformación, se agrega a la espuma de poliuretano que contiene los microorganismos inmovilizados y libre del medio de cultivo residual, una solución de ácido ferúlico o de sus sales con una concentración de aproximadamente 5 g l⁻¹ a aproximadamente 30 g l⁻¹, preferentemente de aproximadamente 10 g l⁻¹ a aproximadamente 20 g l⁻¹, con un pH entre 7 y 9, preferentemente entre 7,5 a 8,5, en un volumen de 5 ml a 50 ml, preferentemente 20 ml a 30 ml, por gramo de soporte inerte. La biotransformación es llevada a cabo a una temperatura de 30 °C a 45 °C durante un periodo de 7 a 48 horas. Al término de esta fase es consumido prácticamente todo el precursor, acumulándose en las películas acuosas del cultivo de superficie la vainillina resultante en concentraciones de aproximadamente 3 g l⁻¹ a aproximadamente 12 g l⁻¹, con un rendimiento molar de 70 % a 80 %. También son producidos, aunque en mucha menor cantidad ácido vainillínico, alcohol vainillínico y trazas de guayacol. Todos los productos de la biotransformación son recuperados en solución compresión. Los microorganismos inmovilizados en el soporte libre del medio acuoso pueden ser nuevamente utilizados para un nuevo procedimiento de biotransformación, agregando una solución fresca de ácido ferúlico. Este procedimiento puede ser repetido cíclicamente entre 2 veces a 15 veces, preferentemente entre 6 veces a 10 veces, con similares rendimientos de biotransformación.

Es importante finalizar el procedimiento de biotransformación de la invención cuando el precursor está siendo agotado porque luego se produce la degradación de la vainillina formada en ácido vainillínico y alcohol vainillínico. En otros términos, se tienen prácticamente dos etapas claramente definidas que son la de formación de vainillina y la de degradación de la vainillina. Considerar este punto es muy importante si se quiere facilitar el procedimiento de purificación y asegurar un rendimiento que sea industrialmente interesante.

La recuperación y purificación de la vainillina se realiza mediante adsorción en carbón activado o resinas sintéticas de la familia de la amberlita, a partir de la solución obtenida del procedimiento de biotransformación. La vainillina adsorbida es eluida con alcohol etílico al 95 %, concentrando luego la solución resultante entre 0,05 g ml⁻¹ a 0,5 g ml⁻¹, preferentemente entre 0,1 g ml⁻¹ a 0,4 g ml⁻¹. A la solución concentrada, se agrega agua donde la vainillina cristaliza. El procedimiento de purificación descrito es particularmente importante porque en él se hace uso de un solvente que es enteramente de origen natural.

Como se ha señalado anteriormente, la combinación adecuada de un novedoso sistema de fermentación como el cultivo de superficie con condiciones exactas de fermentación y un procedimiento efectivo de purificación, permite la biotransformación de ácido ferúlico o sus sales en vainillina con un alto rendimiento. El sistema de fermentación está basado en el cultivo de superficie de la cepa ATCC 39116 de *Streptomyces setonii*, en un medio de cultivo adecuado.

Para llevar a cabo el cultivo de superficie se utiliza un medio acuoso, que contiene nutrientes usuales, el cual es absorbido por la espuma de poliuretano, entre cuyos intersticios forma películas delgadas. Sobre las películas formadas el microorganismo se desarrolla como micelio. Un medio de cultivo adecuado contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y factores de crecimiento.

Como fuente de carbono se utiliza preferentemente glucosa o maltosa en una concentración de aproximadamente 8 g l⁻¹ a aproximadamente 40 g l⁻¹, preferentemente de aproximadamente 15 g l⁻¹ a aproximadamente 30 g l⁻¹. Como fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y elementos traza, usualmente es empleado extracto de levadura, en una concentración de aproximadamente 1 g l⁻¹ a aproximadamente 15 g l⁻¹, preferentemente en una concentración de aproximadamente 3 g l⁻¹ a aproximadamente 10 g l⁻¹. Adicionalmente se emplea una fuente de magnesio y una solución amortiguadora de fosfatos (de pH 7 a pH 8).

El medio de cultivo preparado es esterilizado y luego inoculado con *Streptomyces setonii* ATCC 39116.

El inóculo utilizado proviene del cultivo sumergido del microorganismo en el mismo medio de cultivo. El inóculo con una edad de 15 a 30 horas, preferentemente de 18 h a 24 h, es añadido en un volumen de 3 % a 6 % (v/v). Posteriormente el medio de cultivo con el inóculo es agregado a la espuma de poliuretano estéril donde es absorbido, iniciándose el crecimiento por cultivo de superficie. La fermentación es desarrollada de 30 °C a 45 °C, con una duración del periodo de crecimiento de 6 a 35 horas, preferentemente de 12 a 24 horas.

Terminada la fase de crecimiento, la espuma de poliuretano que contiene la biomasa que quedó inmovilizada entre sus intersticios, es comprimida dejando escurrir el medio acuoso que contiene los nutrientes residuales. De esta manera, la espuma recobra nuevamente su capacidad absorbente, siendo alimentada a continuación con una solución de ácido ferúlico con una concentración de aproximadamente 5 g l⁻¹ a aproximadamente 30 g l⁻¹, preferentemente de aproximadamente 10 g l⁻¹ a aproximadamente 20 g l⁻¹, con un pH entre 7 y 9, preferentemente entre 7,5 a 8,5. Una cantidad adecuada de alimentación es de 5 ml a 50 ml por gramo de espuma, preferentemente de 20 ml a 35 ml por

gramo de espuma.

La fase de biotransformación se inicia en el momento de la alimentación y tiene una duración de 7 h a 48 h, preferentemente de 15 h a 28 h, al cabo de las cuales prácticamente todo el sustrato ha sido consumido y convertido en vainillina y algunos subproductos minoritarios.

- 5 Terminada la fase de biotransformación, la espuma que contiene la biomasa inmovilizada, nuevamente es separada del medio acuoso que contiene la vainillina por compresión. La solución recuperada arrastra una pequeña cantidad de material celular que es separada por centrifugación o filtración para luego proceder al procedimiento de recuperación y purificación, tal como fue descrito anteriormente. La espuma libre de medio acuoso queda nuevamente lista para iniciar un nuevo ciclo de biotransformación por alimentación de una solución fresca de ácido ferúlico. El sistema
10 mantiene su eficiencia y velocidad de conversión a lo largo de 3 ciclos a 15 ciclos, preferentemente de 6 ciclos a 10 ciclos, al cabo de los cuales se produce una pérdida de la viabilidad celular así como un lavado paulatino de la biomasa.

- Es importante señalar que únicamente la fase de desarrollo del microorganismo es llevada en condiciones de esterilidad ya que posteriormente al ser eliminado el medio de cultivo no existe posibilidad de desarrollo de microorganismos no deseados. Tampoco durante el procedimiento de alimentación de la solución de ácido ferúlico y
15 recuperación de la vainillina en solución pues ambos compuestos resultan tóxicos para una gran variedad de microorganismos, pudiendo únicamente sobrevivir aquellos que cuentan con un mecanismo de desintoxicación altamente especializado como *Streptomyces setonii*.

EJEMPLOS ILUSTRATIVOS DE LA INVENCION

- 20 La invención será descrita ahora con respecto a los ejemplos siguientes, los cuales son únicamente con el propósito de representar la manera de llevar a cabo la implementación de los principios de la invención.

Ejemplo 1

- Se prepararon matraces de 250 ml que contienen 1 g de espuma de poliuretano cortada en pequeños cubos. Se les agregó 20 ml de medio de cultivo previamente inoculados con 0,8 ml de un precultivo de *Streptomyces setonii* cepa
25 ATCC 39116, cultivado en un matraz agitado a 37 °C, a 190 min⁻¹, durante 20 h. El medio de cultivo contenía 10 g l⁻¹ de glucosa, 4 g l⁻¹ de extracto de levadura, 4 g l⁻¹ Na₂HPO₄, 1 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 0,2 g l⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O, 0,2 g l⁻¹ NaCl y 0,05 g l⁻¹ de CaCl₂ · H₂O, con un pH de 7,2. El cultivo de superficie en los matraces fue tratado a 37 °C durante 18 h, al cabo de las cuales la glucosa se agotó. Tras este periodo, los cubos de espuma de poliuretano se comprimieron dentro de una jeringa liberando el medio de cultivo residual que fue posteriormente desechado. Para dar inicio a la biotransformación se agregó sobre la biomasa inmovilizada en la espuma de poliuretano y colocada nuevamente en
30 los matraces, 20 ml de una solución de 10 g l⁻¹ de ácido ferúlico a pH 7,2.

- La biotransformación se llevó a cabo a 37 °C durante 20 h al cabo de las cuales la espuma se comprimió, liberando la solución de biotransformación que fue recuperada con un contenido de 4,3 g l⁻¹ de vainillina, 0,7 g l⁻¹ de ácido ferúlico, 0,12 g l⁻¹ de ácido vainillínico, 0,09 g de alcohol vainillínico y trazas de guayacol. Se calculó un rendimiento molar de conversión en vainillina del 60 %. Los cubos con los microorganismos inmovilizados fueron devueltos a los matraces,
35 agregando 20 ml de una solución fresca de 10 g l⁻¹ de ácido ferúlico, manteniendo los matraces a 37 °C durante 24 h. La solución de biotransformación recuperada presentaba un contenido de 6,1 g l⁻¹ de vainillina, 0,39 g l⁻¹ de ácido ferúlico, 0,06 g l⁻¹ de ácido vainillínico, 0,04 g l⁻¹ de alcohol vainillínico y trazas de guayacol. El rendimiento de biotransformación fue del 81 %. Se repitieron adicionalmente 3 ciclos de biotransformación bajo las mismas condiciones de temperatura y durante el mismo periodo obteniendo resultados similares al anterior. En los 5 ciclos de biotransformación se colectaron por matraz aproximadamente un total de 90 ml de solución.

Ejemplo 2

- Se prepararon bandejas con tapa de 12 l que contienen 25 g de espuma de poliuretano cortada en pequeños cubos. Se les agregó 500 ml de medio de cultivo previamente inoculados con 20 ml de un precultivo de *Streptomyces setonii*
45 ATCC 39116, cultivado en un matraz agitado a 37 °C, a 190 min⁻¹, durante 20 h. El medio de cultivo contenía 15 g l⁻¹ de glucosa, 6 g l⁻¹ de extracto de levadura, 4 g l⁻¹ Na₂HPO₄, 1 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 0,2 g l⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O, 0,2 g l⁻¹ NaCl y 0,05 g l⁻¹ de CaCl₂ · H₂O, con un pH de 7,2. El cultivo de superficie en las bandejas fue desarrollado a 37 °C durante 24 h, al cabo de las cuales la glucosa fue agotada. Luego de este periodo, los cubos de espuma de poliuretano fueron comprimidos dentro de las bandejas, liberando el medio de cultivo residual que fue desechado. Luego se agregó 500 ml de una solución de 10 g l⁻¹ de ácido ferúlico a pH 7,2.

- 50 La biotransformación se llevó a cabo a 37 °C durante 24 h al cabo de las cuales se recuperó de manera similar al ejemplo anterior la solución de biotransformación que contiene 4,71 g l⁻¹ de vainillina, 0,63 g l⁻¹ de ácido ferúlico, 0,07 g l⁻¹ de ácido vainillínico, 0,06 g de alcohol vainillínico y trazas de guayacol. Se calculó un rendimiento molar de conversión en vainillina del 64 %. En un segundo ciclo se agregó nuevamente 500 ml de una solución fresca de 10 g l⁻¹ de ácido ferúlico, manteniendo las bandejas a 37 °C durante 24 h. La solución de biotransformación recuperada presentaba un contenido de 5,87 g l⁻¹ de vainillina, 0,24 g l⁻¹ de ácido ferúlico, 0,14 g l⁻¹ de ácido vainillínico, 0,10 g l⁻¹ de alcohol vainillínico y 0,04 g de guayacol. El rendimiento de conversión fue del 77 %. Se repitieron adicionalmente
55 5 ciclos de biotransformación bajo las mismas condiciones de temperatura y durante el mismo periodo obteniendo

resultados similares al anterior. En los 7 ciclos de biotransformación se recolectaron por bandeja aproximadamente un total de 3,2 l de solución que contienen 5,6 g l⁻¹ de vainillina. Ver Figura 4.

5 Para la recuperación y purificación de la vainillina, a la solución de biotransformación se agregaron 100 g de carbón activado dejando en agitación 5 h, al cabo de las cuales el sobrenadante fue desechado. La desorción fue llevada a cabo con 100 ml de etanol al 95 % bajo agitación durante 3 h. La solución etanólica fue concentrada por evaporación, reduciendo su volumen a 30 ml. A continuación se agregaron 30 ml de agua, dejando en reposo durante 12 horas, al cabo de las cuales la vainillina cristalizó.

Ejemplo 3

10 En otra realización de la invención, se emplearon 150 g de amberlita XAD-4 en lugar del carbón activado empleado en el ejemplo 2, continuando los mismos pasos hasta alcanzar la cristalización de la vainillina.

Las ventajas de la invención con respecto al estado de la técnica se pueden resumir en los siguientes puntos:

- El procedimiento permite la biotransformación de ácido ferúlico y la acumulación de vainillina en concentraciones que resultan industrialmente interesantes (de aproximadamente 3 g l⁻¹ a aproximadamente 12 g l⁻¹). Ver figura 4.
- 15 • Gracias a las ventajas intrínsecas del cultivo de superficie, la velocidad específica de crecimiento de *Streptomyces setonii* cepa ATCC 39116 es incrementada hasta en tres veces en comparación a su crecimiento en cultivo sumergido, reduciendo el tiempo para el desarrollo del microorganismo. Ver Figura 2.
- El procedimiento de conversión en comparación a otros procedimientos en cultivo sumergido es selectivo ya que la vainillina es casi un único producto de biotransformación.
- 20 • El sistema utilizado permite fijar a los microorganismos en un soporte poroso inerte compresible por lo cual es posible su reutilización en un nuevo proceso de biotransformación (ciclo) por alimentación fresca de una solución de ácido ferúlico.
- Los costos de operación relacionados con las materias primas del medio de cultivo, así como servicios auxiliares son reducidos en igual número de veces a la cantidad de ciclos de biotransformación (de 3 ciclos a 15 ciclos) en comparación a un cultivo sumergido por lotes.
- 25 • El procedimiento de la invención es de baja complejidad técnica, por lo cual los costos de inversión en instalaciones y equipos son, por mucho, menores a los requeridos para un procedimiento en cultivo sumergido.
- El proceso de recuperación y purificación se ve altamente favorecido porque las soluciones resultantes de la biotransformación contienen vainillina casi como un único producto al ser el proceso selectivo. Además no contiene sales inorgánicas u otros nutrientes residuales del medio de cultivo como ocurre en procedimientos en cultivo sumergido.
- 30 • En general el escalamiento industrial de los procedimientos en cultivo de superficie sobre sustrato sólido resulta más sencillo que los procedimientos en cultivo sumergido.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de biotransformación de ácido ferúlico en vainillina **caracterizado por que** comprende los pasos de:
 - (a) inmovilizar un microorganismo de la cepa ATCC 39116 de *Streptomyces setonii* en espuma de poliuretano;
 - 5 (b) agregar una solución de ácido ferúlico o de alguna de sus sales;
 - (c) incubar para llevar a cabo la reacción de biotransformación;
 - (d) recuperar la solución de biotransformación obtenida en el paso (c); y
 - (e) extraer la vainillina de la solución de biotransformación obtenida en el paso (d).
- 10 2. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el paso (a) comprende los pasos de:
 - (a) adicionar un inóculo de la cepa ATCC 39116 de *Streptomyces setonii* a un medio de cultivo líquido;
 - (b) adicionar el medio de cultivo inoculado a una espuma de poliuretano, para formar películas entre los intersticios de dicho soporte;
 - (c) cultivar la cepa ATCC 39116 de *Streptomyces setonii* en el soporte; y
 - 15 (d) eliminar el medio de cultivo residual de dicha espuma de poliuretano.
3. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 2, **caracterizado por que** el inóculo del microorganismo se cultiva en agitación a 190 min^{-1} , durante un periodo de tiempo de 15 h a 30 h, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.
4. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 2, **caracterizado por que** el volumen del inóculo que se adiciona al medio de cultivo es del 3 % al 6 % del volumen total del medio.
- 20 5. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 2, **caracterizado por que** el medio de cultivo líquido comprende:
 - glucosa o maltosa en un rango de concentración entre 8 g l^{-1} a 40 g l^{-1} ; y
 - extracto de levadura en un rango de concentración entre 1 g l^{-1} a 15 g l^{-1} .
- 25 6. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 2, **caracterizado por que** el volumen del medio de cultivo inoculado que se adiciona a la espuma de poliuretano es de 5 ml por gramo de soporte a 50 ml por gramo de soporte, preferentemente de 20 ml por gramo de soporte a 35 ml por gramo de soporte.
7. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 2, **caracterizado por que** la altura de lecho de la espuma de poliuretano es de 1 cm a 10 cm, preferentemente de 3 cm a 6 cm.
- 30 8. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 2, **caracterizado por que** el paso (c) de cultivar el microorganismo en el soporte se lleva a cabo a una temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un periodo de tiempo de 6 h a 35 h.
9. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 2, **caracterizado por que** el paso (d) se lleva a cabo mediante la compresión de la espuma de poliuretano.
- 35 10. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la solución de ácido ferúlico o de alguna de sus sales del paso (b) tiene una concentración de 5 g l^{-1} a 30 g l^{-1} , preferentemente de 10 g l^{-1} a 20 g l^{-1} .
11. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la solución de ácido ferúlico o de alguna de sus sales del paso (b) tiene valores de pH entre 7 y 9, preferentemente valores de pH entre 7,5 y 8,5.
- 40 12. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el tiempo de incubación para la reacción de biotransformación del paso (c) es de 7 h a 48 h, preferentemente de 15 h a 28 h.
13. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el paso (d) se lleva a cabo mediante la compresión de la espuma de poliuretano.
- 45 14. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado por que** los pasos

(b), (c) y (d) se llevan a cabo entre 2 veces a 15 veces de forma cíclica.

15. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el paso (e) de extraer la vainillina de la solución de biotransformación comprende los pasos de:
- (a) tratar la solución de biotransformación con carbón activado o resinas sintéticas;
 - 5 (b) eluir la vainillina adsorbida en el carbón activado o en las resinas sintéticas con una solución alcohólica;
 - (c) concentrar por evaporación la vainillina eluida en la solución alcohólica; y
 - (d) cristalizar la vainillina en agua.
16. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 15, **caracterizado por que** las resinas sintéticas del paso (a) se seleccionan de la familia de la amberlita.
- 10 17. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 15, **caracterizado por que** la solución alcohólica del paso (b) comprende una solución de etanol al 95 %.
18. El procedimiento de biotransformación de conformidad con la reivindicación 15, **caracterizado por que** la etapa (c) de concentrar por evaporación la vainillina eluida en la solución alcohólica, se lleva a cabo a una temperatura entre 30 °C y 40 °C y a presión reducida.

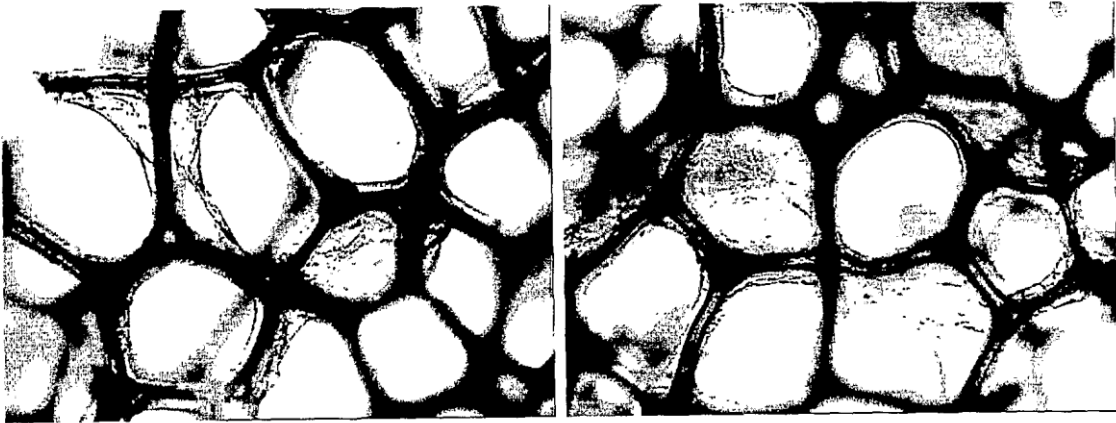


FIG. 1

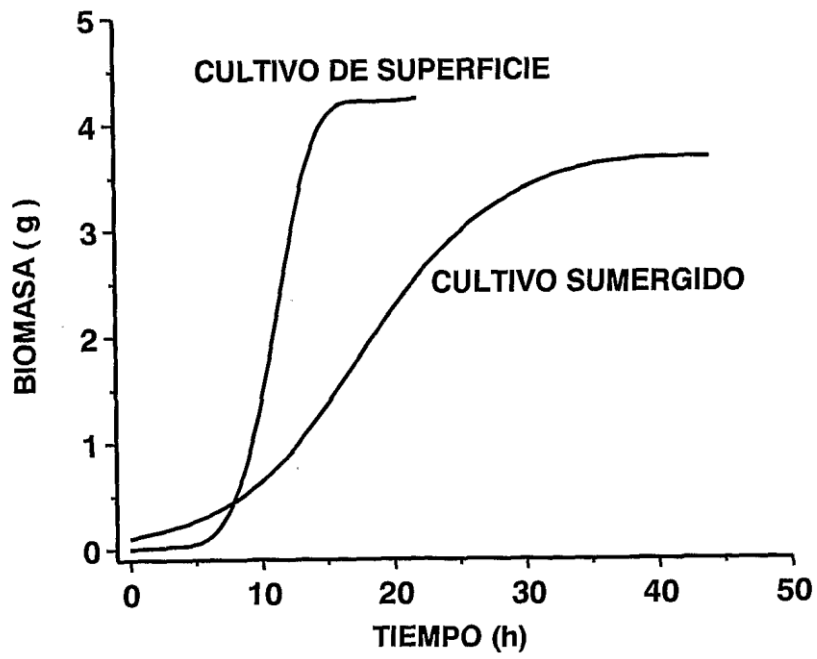


FIG. 2

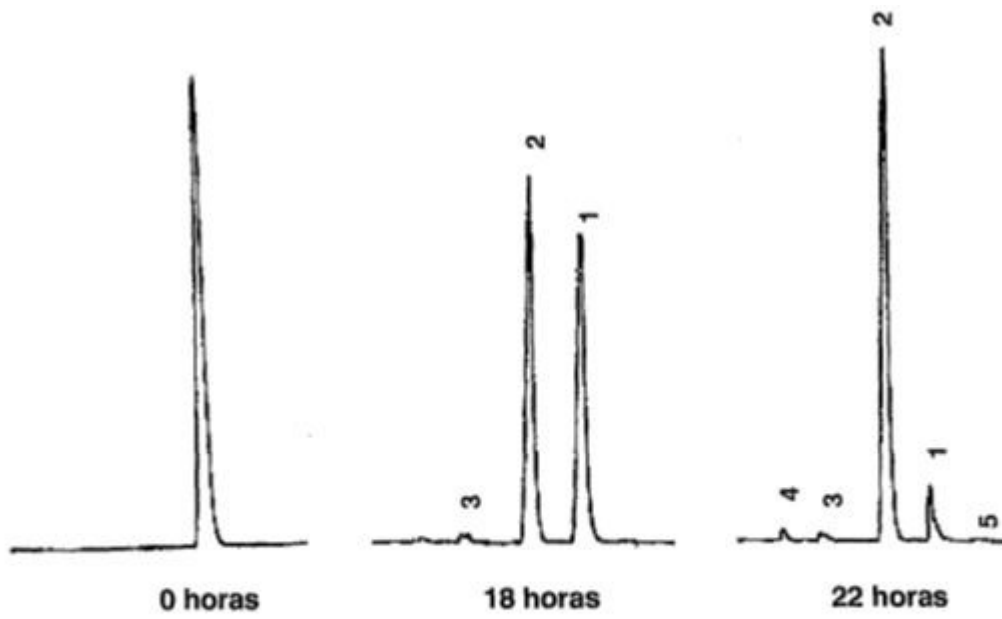


FIG. 3

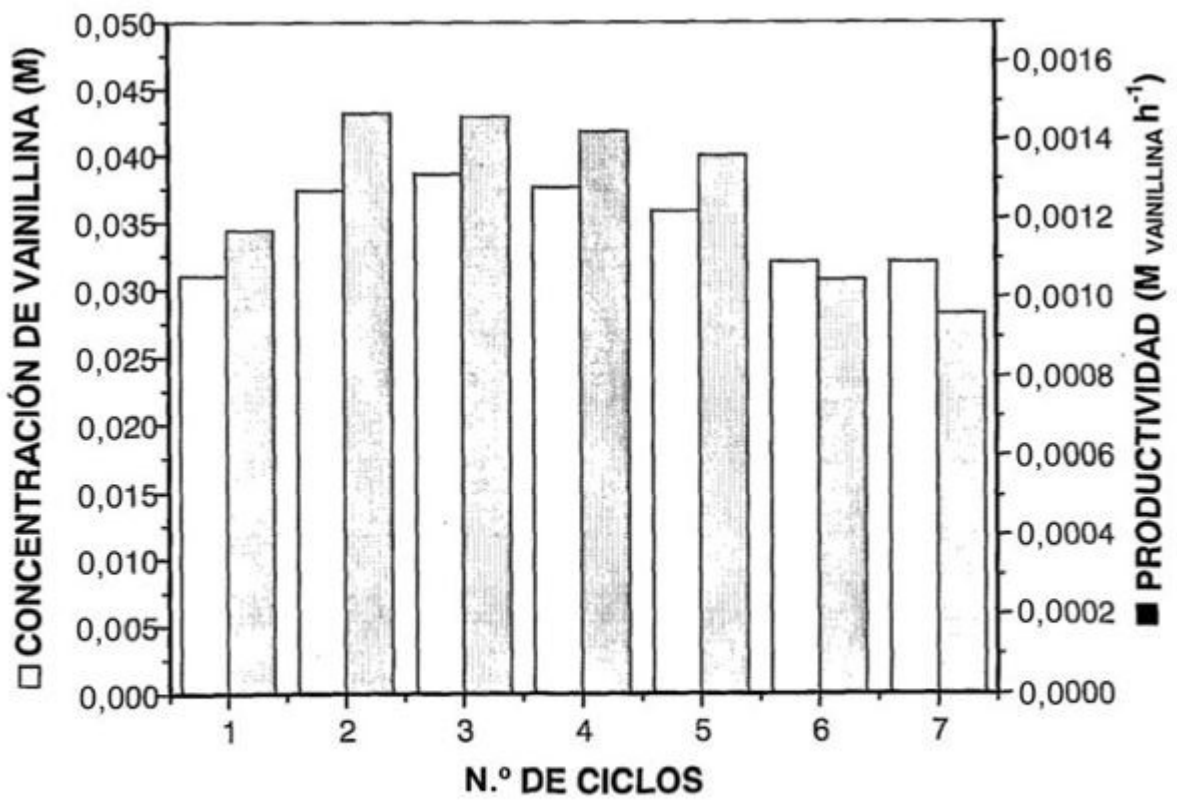


FIG. 4