

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 019 569**

51 Int. Cl.:

A23L 11/30	(2006.01)
A23J 1/14	(2006.01)
A23J 3/14	(2006.01)
A23J 3/16	(2006.01)
B01J 19/24	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01)
A23L 33/17	(2006.01)
A23K 10/12	(2006.01)
A61K 36/48	(2006.01)
A23K 10/14	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2018 PCT/EP2018/086282**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2019 WO19122181**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2018 E 18822088 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025 EP 3727029**

54 Título: **Proceso de flujo de pistón vertical para la bioconversión empleando microorganismos**

30 Prioridad:

22.12.2017 EP 17210105

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

20.05.2025

73 Titular/es:

**HAMLET PROTEIN A/S (100.00%)
Saturnvej 51
8700 Horsens, DK**

72 Inventor/es:

**THIRUP, LAILA;
DICKOW, JONATAN AHRENS;
ELLEGÅRD, KATRINE HVID;
PETERSEN, STIG VICTOR y
GELEFF, SVEND ANDREAS**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 3 019 569 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

Proceso de flujo de pistón vertical para la bioconversión empleando microorganismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un sustrato sólido, un método de bioconversión para la producción de un producto de transformación sólido valioso del sustrato en donde la bioconversión se lleva a cabo mediante el uso de uno o más microorganismos adecuados mediante un proceso de flujo de pistón continuo en un tanque vertical, no agitado donde el transporte está mediado por la fuerza gravitacional.

Antecedentes de la invención

Hay una necesidad para bioproductos que principalmente se puedan usar como alimento o pienso o como ingredientes en alimento o pienso. Los constituyentes básicos en tales productos son proteínas, grasas, e hidratos de carbono. Las biomásas adecuadas para tales productos son cultivos oleaginosos tal como semillas oleaginosas, cereales, y leguminosas. Los cereales tienen un contenido en proteína de hasta el 15%, por ejemplo, en trigo, y las leguminosas tienen un contenido de proteína de hasta el 40%, por ejemplo, en habas de soja, basado en la materia seca.

Hay una necesidad similar para el desarrollo de bioproductos que comprenden compuestos orgánicos, tal como ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido láctico, y ácido succínico, o alcoholes, tal como etanol, bioproductos y compuestos orgánicos que se pueden producir de una manera económica en procesos bien conocidos usando géneros de microorganismos que producen uno o más compuestos orgánicos como producto metabólico de la bioconversión de hidratos de carbono.

Los géneros de bacterias del ácido láctico producen ácido orgánico, en particular, ácido láctico y ácido acético, como su producto metabólico final principal de la bioconversión de hidratos de carbono. Los géneros de bacterias del ácido láctico son, en particular, pero no están limitados a, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, y *Weisella*.

Otros géneros de microorganismos también producen ácidos como sus productos metabólicos finales de la bioconversión de hidratos de carbono. Tales géneros que producen ácido orgánico son, en particular, pero no están limitados a, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brevibacillus*, *Propionibacterium*, *Candida*, *Clostridium*, y *Geobacillus* productores de ácido.

Un problema general especialmente relacionado con legumbres y frutos y semillas de leguminosas como fuentes de bioproducto y ácidos orgánicos son el contenido de oligosacáridos indigeribles, tal como estaquiosa y rafinosa, que producen flatulencia y diarrea cuando fermentan en el colon.

Los métodos de incubación de bajo coste conocidos en la técnica son procesos de fermentación de sustrato sólido o en estado sólido (SSF) realizados con bajo contenido de agua. El proceso consiste en un sustrato sólido, húmedo inoculado con microorganismos adecuados y dejado para la bioconversión en condiciones controladas de temperatura durante un periodo de tiempo.

Normalmente el sustrato se inocula por lotes en lechos planos sin agitación; un ejemplo de este proceso se conoce como el proceso Koji. Los procesos por lotes también se realizan usando medios de agitación.

Los procesos SSF continuos también se describen en la bibliografía usando los siguientes biorreactores: reactores de tanque agitado, de tambor giratorio y de flujo tubular. Un ejemplo de un reactor de flujo tubular es el tipo transportador de tornillo.

El documento US 4 735 724 divulga un digestor anaerobio en torre vertical no mezclado y un proceso para la digestión de la parte biodegradable de la materia prima por microorganismos productores de metano. El método se caracteriza en que hay una retirada de líquido de una zona media o inferior respecto a la parte superior de la torre.

El documento EP 2 453 004 B1 divulga un método para la fermentación anaerobia de material orgánico en un tanque cerrado y alimentación de arriba a abajo en el tanque bajo la acción de la gravedad. El método se caracteriza en que la masa que fermenta se agita al alternativamente aumentar la presión del gas producto y aliviar abruptamente la presión del gas producto.

El documento EP 3 101 136 divulga una fermentación en estado sólido de harina de soja que tiene un contenido de agua del 45% con *Bacillus amyloliquefaciens* K2G a 37°C durante 20 horas.

El objeto de la presente invención es proporcionar un método mejorado para la producción de un producto de transformación sólido de un sustrato de biomasa en un proceso de bioconversión, de flujo de pistón, vertical llevado a cabo mediante el uso de uno o más microorganismos adecuados.

Otro objeto es proporcionar un método, que se pueda realizar en un diseño de reactor mayor, pero más sencillo que el diseño del estado de la técnica.

5 Aun un objeto es proporcionar un método eficaz y rápido para la bioconversión de biomásas, en particular soja o colza o mezclas de las mismas, de modo que se produzcan bioproductos que comprenden compuestos orgánicos, tal como ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido láctico, y ácido succínico, y alcoholes, a partir de fuentes de hidratos de carbono baratas.

10 Estos objetos se cumplen con el método de la presente invención.

Compendio de la invención

15 Según esto, en un aspecto de la presente invención se refiere a un método como se define en la reivindicación 1 para producir un producto de transformación sólido de un sustrato.

20 El presente método para el tratamiento de biomasa usa fuerza gravitacional para transportar/mover la biomasa durante la incubación/bioconversión. Aunque el uso de gravedad para el transporte en general es directo, requiere la selección cuidadosa de las condiciones de reacción para el fin específico, tal como en el caso del presente proceso de flujo de pistón.

25 Normalmente, cuando el contenido de agua aumenta, una mezcla de incubación tiende a compactarse, por la reducción del volumen de vacío, de modo que el comportamiento de transporte está negativamente afectado. Cuando se alcanza un cierto contenido de agua la mezcla se compacta a un grado de modo que el transporte por fuerza gravitacional se para. El material se puede pegar a las paredes del reactor, o puede crear sedimentación, y el flujo de pistón uniforme se perturba produciendo tiempo de retención desigual de la biomasa.

30 Además, si la bioconversión se realiza a presión elevada, que puede ser el caso bajo en efecto de la gravedad, la reacción de incubación tiende a ralentizarse.

35 La solución según la presente invención al problema relacionado con el transporte por fuerza gravitacional de la mezcla de incubación es hacer uso de un tanque como se define en las reivindicaciones para la incubación en donde el flujo del material se puede mantener tan alto y uniforme que las condiciones de flujo de pistón se alcanzan y mantienen. La velocidad de flujo está regulada por los medios de entrada y salida y por las dimensiones (proporción de anchura a altura) del tanque.

40 Además, la solución según la invención debe garantizar el equilibrio del contenido de agua en la mezcla de incubación de modo que la actividad acuosa en la superficie de la partícula sea suficiente para el proceso de reacción. Esto se alcanza manteniendo la proporción de densidad aparente húmeda respecto a la densidad aparente seca del sustrato baja y en ciertos límites como se define en la reivindicación 1.

45 Más específicamente, los presentes inventores han encontrado que el necesario proceso uniforme se puede alcanzar usando una mezcla de incubación inicial que tiene un contenido de agua desde el 30% al 70% en peso, y una proporción de densidad aparente húmeda respecto a la densidad aparente seca desde 0,60 a 1,45. En combinación con el presente diseño vertical para el proceso de flujo de pistón es posible garantizar un flujo de pistón uniforme y asegurar el mismo tiempo de procesamiento para la mezcla de incubación. Además, el método de la presente invención se lleva a cabo sin agitación. Si el contenido de agua supera aproximadamente el 70% en peso, la biomasa no puede mantener el agua, y la mezcla de incubación se vuelve una papilla que tiene una fase acuosa y una fase sólida. Estas dos fases no fluirán con las mismas velocidades de flujo, el flujo de pistón uniforme no se obtendrá, y la mezcla de incubación se puede pegar a las paredes del incubador. Un contenido de agua de más de aproximadamente el 70% producirá una proporción de densidad aparente húmeda respecto a la densidad aparente seca que supera 1,45 que es el límite superior según la invención.

55 El diseño vertical es menos caro en inversión que un diseño horizontal debido a su mayor capacidad en una única línea de producción. También es menos caro de mantener debido a menos movimientos mecánicos. El uso de un tanque no agitado contribuye adicionalmente a los costes operacionales reducidos.

60 Por tanto, el presente método permite una configuración eficaz y rápida del proceso por lo cual el microorganismo se puede propagar en fase líquida y realizar la bioconversión en fuentes basadas en hidratos de carbono baratas.

65 El presente método es, en particular, eficaz si el sustrato de biomasa se ha pretratado antes de mezclarlo con el microorganismo vivo o combinación de microorganismos vivos, porque el pretratamiento mejora el acceso de los microorganismos a los componentes en la biomasa que se van a transformar. El pretratamiento típicamente se lleva a cabo por pretratamiento químico o físico, por ejemplo, por medio de disgregación, molido, descamación, tratamiento con calor, tratamiento con presión, tratamiento ultrasónico, tratamiento hidrotérmico, o tratamiento ácido o alcalino.

5 El método de la invención se puede usar para proporcionar un producto de transformación sólido del sustrato que es un producto de la transformación de hidratos de carbono y/o proteínas originarias de dicha biomasa. Tales productos de transformación sólidos se pueden usar, por ejemplo, en un producto alimenticio procesado o como un ingrediente en un producto alimenticio o de pienso o como un ingrediente de un producto cosmético o farmacéutico, o un suplemento nutricional.

Definiciones

10 En el contexto de la presente invención, se pretende que los siguientes términos comprendan lo siguiente, a menos que se definan en otro lugar en la descripción.

15 Los términos "sobre", "alrededor de", "aproximadamente", o "~" se pretende que indiquen, por ejemplo, la incertidumbre de medida comúnmente experimentada en la técnica, que puede estar en el orden de magnitud de, por ejemplo, +/- 1, 2, 5, 10, 20, o incluso el 50%.

20 El término "comprende" se debe interpretar como que especifica la presencia de parte(s), etapa(s), característica(s), composición(es), sustancia(s) química(s), o componente(s) indicado(s), pero no excluye la presente de una o más partes, etapas, características, composiciones, sustancias químicas o componentes adicionales. Por ejemplo, una composición que comprende un compuesto químico puede por tanto comprender compuestos químicos adicionales, etc.

Proceso de flujo de pistón:

25 En este tipo de proceso continuo, la mezcla de reacción fluye a través de, por ejemplo, un reactor tubular o poliédrico con retromezcla limitada. El flujo es un flujo laminar donde la composición de la mezcla de reacción cambia a lo largo de la dirección axial del reactor, o un flujo de masa uniforme.

Biomasa:

30 Comprende material biológico, producido por la fotosíntesis y que se puede usar como materia prima en producción industrial. En este contexto, biomasa se refiere a materia vegetal en forma de semillas, cereales, legumbres, por ejemplo, habas y guisantes, etc., y mezclas de las mismas, y en particular frutos y semillas de leguminosas. Además, una biomasa que comprende legumbres es específicamente aplicable debido al contenido y composición de proteínas.

35 El sustrato de biomasa se puede disgregar por pretratamiento, tal como pretratamiento químico o físico, por ejemplo, por medio de disgregación, molido, descamación, tratamiento con calor, tratamiento con presión, tratamiento ultrasónico, tratamiento hidrotérmico, o tratamiento ácido o alcalino.

Bioconversión/incubación:

40 Es el proceso para incubar cultivos de microorganismos en un sustrato para un fin específico, por ejemplo, incubar un microorganismo sobre un hidrato de carbono para producir ácidos orgánicos o alcoholes.

Producto de transformación sólido del sustrato:

45 En general, el tratamiento de la biomasa por incubación con microorganismos se puede dividir en cuatro tipos:

- Producción de biomasa – material celular
- Producción de componentes extracelulares – compuestos químicos, metabolitos, tal como ácidos, enzimas
- Producción de componentes intracelulares – enzimas, etc.
- Producto de transformación del sustrato – el sustrato transformado es el producto

50 En el presente contexto, el producto de transformación sólido del sustrato se refiere a un producto resultante de la incubación de la biomasa seleccionada con el microorganismo vivo y opcionalmente ayudas de procesamiento.

Densidad aparente:

55 La densidad aparente es un parámetro importante para el comportamiento físico de una biomasa que tiene la forma de polvo, gránulos, y similares. El parámetro se define como peso por volumen, y se puede medir en, por ejemplo, g/ml. No es una propiedad intrínseca, sino que puede cambiar dependiendo del manejo, y se puede usar como un índice de cambios estructurales. La densidad de un material se determina colocando un volumen fijado del material en un vaso medidor y determinando el peso o determinando el peso de un volumen medido de un polvo. Mediante esta prueba se pueden determinar las siguientes características:

65 Densidad aparente (también conocida como densidad volumétrica) = masa/volumen seco sin compactar en g/ml o kg/m³;

Densidad aparente húmeda (también conocida como densidad total) = la proporción de la masa total ($M_s + M_l$) respecto a su volumen total;

5 M_s = masa de sólidos y M_l = masa de líquidos.

Por tanto, en el contexto de la presente invención, "densidad aparente seca" es la densidad aparente medida de la biomasa sin la adición de agua, es decir, la densidad aparente/densidad volumétrica. "Densidad aparente húmeda" es la densidad aparente medida después de la adición de una cierta cantidad de agua.

10 Normalmente, la densidad aparente se determina según los Estándares Internacionales ISO 697 e ISO 60, pero debido a la naturaleza de las sustancias esto no era aplicable en el presente contexto. El método individual usado se describe en los ejemplos.

15 Oligosacáridos y polisacáridos:

Un oligosacárido es un polímero sacárido que contiene al menos dos azúcares monoméricos componentes. Los polisacáridos son polímeros sacáridos que contienen muchos azúcares monoméricos componentes, también conocidos como hidratos de carbono complejos. Los ejemplos incluyen polisacáridos de almacenamiento tal como almidón y polisacáridos estructurales tal como celulosa.

Hidratos de carbono:

25 Comprenden mono-, di-, oligo- y polisacáridos.

Materiales proteínicos:

30 Comprenden compuestos orgánicos con un contenido sustancial de proteínas hechas de aminoácidos organizados en una o más cadenas. A una longitud de cadena de hasta aproximadamente 50 aminoácidos el compuesto se llama un péptido; a mayor peso molecular el compuesto orgánico se llama un polipéptido o una proteína.

Grasas:

35 Comprenden ésteres entre ácidos grasos y glicerol. Una molécula de glicerol se puede esterificar con una, dos o tres moléculas de ácido graso produciendo un monoglicérido, un diglicérido o un triglicérido, respectivamente. Habitualmente, las grasas consisten en principalmente triglicéridos y cantidades minoritarias de lecitinas, esteroides, etc. Si la grasa es líquida a temperatura ambiente normalmente se llama aceite. Con respecto a los aceites, grasas, y productos relacionados en este contexto, se hace referencia a "Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes", AOCS, 1996, así como a "Lipid Glossary 2", F.D. Gunstone, The Oily Press, 2004.

40 Glicéridos:

Comprenden mono-, di-, y triglicéridos.

45 Microorganismos

Los microorganismos son organismos que son microscópicos, lo que los hace demasiado pequeños para ser vistos por un ojo humano sin ayuda. Los microorganismos incluyen bacterias, hongos, arqueas, protistas, y virus. La mayoría de los microorganismos son organismos de una única célula o unicelulares, pero hay protistas unicelulares que son visibles al ojo humano, y algunas especies multicelulares son microscópicas. Los microorganismos viven casi en cualquier lugar en la tierra donde hay agua líquida, incluyendo aguas termales en el fondo del mar y profundo dentro de rocas en la corteza de la tierra. Tales hábitats están habitados por extremófilos.

55 En el contexto de la presente invención, los microorganismos no incluyen levaduras vivas.

Bacterias del ácido láctico

(o Lactobacillales) son un orden de bacterias gram positivas, bajas en GC (bajo contenido en guanina-citosina), tolerantes a ácido, en general no esporulantes, que no respiran, ya sea en forma de varilla o coco, que comparten características metabólicas y fisiológicas comunes. Estas bacterias, habitualmente encontradas en plantas en descomposición y productos lácteos, producen ácido láctico como el producto final metabólico principal de la bioconversión de hidratos de carbono. Las bacterias del ácido láctico son géneros de microorganismos que producen ácidos orgánicos, tal como ácido láctico y ácido acético, como productos metabólicos de la bioconversión de hidratos de carbono. Los géneros son en particular, pero no están limitados a, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Streptococcus*, y *Leuconostoc*.

Otros géneros

5 En el contexto de la presente invención, otros géneros se refieren a los otros géneros bacterianos más relevantes en relación a la invención. Comprenden un número de géneros que también producen ácidos orgánicos, tal como ácido láctico y ácido acético, como productos metabólicos de la bioconversión de hidratos de carbono, pero con frecuencia a un nivel menor que las bacterias del ácido láctico.

10 En el contexto de la presente invención otros géneros que las del ácido láctico comprende, pero no están limitados a, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brevibacillus*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, y *Geobacillus*.

Bacillus son géneros en el orden de Bacillales. Las bacterias son gram positivas, con forma de varilla, y forman endosporas en condiciones estresantes. Ciertas cepas se usan como probióticos.

15 Ayudas de procesamiento:

1. Enzimas

20 Enzima(s) es una gran clase de sustancias proteicas con la capacidad de actuar como catalizadores. Comúnmente, se dividen en seis clases, y las principales clases que están dentro del ámbito de esta invención pueden ser transferasas que transfieren grupos funcionales o hidrolasas que hidrolizan varios enlaces. Los ejemplos típicos pueden comprender: proteasa(s), peptidasa(s), (α -)galactosidasa(s), amilasa(s), glucanasa(s), pectinasa(s), hemicelulasa(s), fitasa(s), lipasa(s), fosfolipasa(s), transferasa(s), celulasa(s), y oxidorreductasa(s).

25 2. Componentes vegetales y agentes de procesamiento orgánicos

Algunas de las propiedades funcionales que son importantes en este contexto son: antioxidante, acción antibacteriana, propiedades humectantes y estimulación de la actividad enzimática.

30 La lista de componentes vegetales es muy grande, pero los más importantes son los siguientes: romero, tomillo, orégano, flavonoides, ácidos fenólicos, saponinas, y α - y β -ácidos de lúpulos, por ejemplo, ácido α -lupúlico para la modulación de hidratos de carbono solubles.

Además, ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido sórbico, propiónico, cítrico y ascórbico, y sus sales para el ajuste del valor de pH, conservación y propiedades quelantes es parte de este grupo de ayudas de procesamiento.

35 3. Agentes de procesamiento inorgánicos

Comprenden composiciones inorgánicas, por ejemplo, antiaglomerantes y agentes mejoradores de flujo en el producto final, por ejemplo, silicato de potasio y aluminio, etc.

Comprenden ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico.

Productos alimenticios procesados:

45 Comprenden productos lácteos, productos de carne procesados, dulces, postres, postres helados, productos enlatados, comidas liofilizadas, aderezos, sopas, platos preparados, pan, tartas, etc.

Productos de pienso procesados:

50 Comprenden pienso listo para usar para animales tal como lechones, terneras, aves de corral, animales de piel, ovejas, gatos, perros, peces, y crustáceos, etc.

Productos farmacéuticos:

55 Comprenden productos, típicamente en forma de un comprimido o en forma granulada, que contienen uno o más ingredientes biológicamente activos que se pretenden para curar y/o aliviar los síntomas de una enfermedad o una afección. Los productos farmacéuticos además comprenden excipientes y/o soportes farmacéuticamente aceptables. Los bioproductos sólidos divulgados en el presente documento son muy adecuados para uso como un ingrediente farmacéuticamente aceptable en un comprimido o granulada.

60 Productos cosméticos:

Comprenden productos que se pretende para higiene personal, así como aspecto mejorado tal como acondicionadores y preparaciones para el baño.

65 **Descripción detallada de la invención**

ES 3 019 569 T3

Al menos el 20% en peso de la biomasa comprende hidratos de carbono y materia proteínica originaria de semillas de soja, semilla de colza, o mezcla de las mismas.

5 En una primera forma de realización del método de la invención al menos el 30% en peso de la biomasa, tal como al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, o al menos el 90% en peso, comprende materia proteínica originaria de soja opcionalmente desgrasada. La soja también puede estar descascarillada.

10 En una segunda forma de realización del método de la invención, al menos el 30% en peso de la biomasa, tal como al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, o al menos el 90% en peso, comprende materia proteínica originaria de colza opcionalmente desgrasada.

15 En una tercera forma de realización del método de la invención la biomasa comprende materia proteínica originaria de soja opcionalmente desgrasada en una cantidad desde el 5% al 95% en peso en mezcla con materia proteínica originaria de colza opcionalmente desgrasada en una cantidad desde el 95% al 5% en peso opcionalmente en mezcla adicional con materia proteínica originaria de habas, guisantes, semillas de girasol y/o cereales en cantidades para hacer una cantidad total de materia proteínica del 100% en peso.

20 En cualquiera de las formas de realización de la invención la biomasa que comprende materia proteínica puede además comprender oligosacáridos, y/o polisacáridos, y/o comprende además aceites y grasas, por ejemplo, de semillas de plantas oleaginosas.

25 En cualquiera de las formas de realización de la invención el producto de transformación sólido del sustrato puede ser un producto de transformación de hidratos de carbono, en particular, oligosacáridos y polisacáridos, y/o materia proteínica originaria de dicha biomasa, tal como un producto de transformación de legumbres, tal como soja, guisante, altramuza, girasol, y/o cereales, tal como trigo, o maíz, o de semillas de plantas oleaginosas, por ejemplo, colza.

30 En cualquiera de las formas de realización de la invención el microorganismo vivo o mezcla de microorganismos vivos puede ser uno o más microorganismos que pueden producir uno o más compuestos orgánicos, tal como ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido láctico, y ácido succínico, o alcoholes, por ejemplo, etanol, a partir de hidratos de carbono.

35 En cualquiera de las formas de realización de la invención el microorganismo vivo o combinación de microorganismos vivos puede ser uno o más microorganismo(s) que produce(n) ácidos orgánicos.

40 En cualquiera de las formas de realización de la invención el microorganismo vivo o combinación de microorganismos vivos se puede seleccionar de la siguiente lista de géneros:

- *Lactobacillus*
- *Lactococcus*
- *Streptococcus*
- *Pediococcus*
- 45 • *Enterococcus*
- *Leuconostoc*
- *Weissella*
- *Bifidobacterium*
- *Bacillus*
- 50 • *Brevibacillus*
- *Propionibacterium*
- *Clostridium*
- *Trichoderma*
- *Candida*
- 55 • *Aspergillus*

En cualquiera de las formas de realización de la invención el microorganismo vivo o combinación de microorganismos vivos se puede seleccionar de cepas de *Lactobacillus*, y la mezcla se puede incubar a una temperatura de 15-50°C.

60 En cualquiera de las formas de realización de la invención el microorganismo vivo o combinación de microorganismos vivos se puede seleccionar de cepas de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, y *Weissella*, y la mezcla se puede incubar a una temperatura de 15-50°C.

65 En cualquiera de las formas de realización de la invención el microorganismo vivo o combinación de microorganismos vivos se puede seleccionar de cepas de *Bacillus*, y la mezcla se puede incubar a una temperatura de 20-60°C.

En cualquiera de las formas de realización de la invención el microorganismo vivo o combinación de microorganismos vivos se puede seleccionar de cepas de *Bifidobacterium*, y la mezcla se puede incubar a una temperatura de 20-45°C.

5 En cualquiera de las formas de realización anteriores se añade agua a dicho sustrato de biomasa en una cantidad que proporciona una mezcla de incubación inicial que tiene una proporción de densidad aparente húmeda respecto a densidad aparente seca desde 0,65 a 1,40, tal como 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,00, 1,10, 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, o 1,35.

10 En cualquiera de las formas de realización anteriores el microorganismo vivo o combinación de microorganismos vivos se usa en una cantidad de 10^3 a 10^{11} UFC (unidades formadoras de colonias) por g de dicho sustrato de biomasa, tal como 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o 10^{10} UFC/g de sustrato de biomasa. El experto en la materia sabría cómo seleccionar una cantidad adecuada, dependiendo de las condiciones de proceso seleccionadas, tal como dimensión del reactor, el tiempo y temperatura del proceso, el microorganismo aplicado, y el producto de transformación que se va a producir.

15 En cualquiera de las formas de realización de la invención se añade agua a dicho sustrato de biomasa en una cantidad para proporcionar una proporción de densidad aparente húmeda respecto a densidad aparente seca desde 0,60 a 1,45 en el sustrato, tal como desde aproximadamente 0,65 hasta aproximadamente 1,40, por ejemplo, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,00, 1,10, 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, o 1,35.

20 En cualquiera de las formas de realización de la invención al menos el 40% en peso de la biomasa, tal como al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, o al menos el 90% en peso, puede comprender materia proteínica originaria de colza opcionalmente desgrasada, mientras se puede añadir agua al sustrato en una cantidad para proporcionar una proporción de densidad aparente húmeda respecto a densidad aparente seca desde aproximadamente 0,65 hasta aproximadamente 1,10, tal como 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,00, o 1,05.

25 En cualquiera de las formas de realización de la invención una o más ayudas de procesamiento seleccionadas de enzimas, componentes vegetales, y agentes de procesamiento orgánicos e inorgánicos se pueden añadir al sustrato de biomasa y/o a la mezcla de incubación inicial.

30 En cualquiera de las formas de realización de la invención el grado de llenado de dicho tanque de incubación se puede mantener constante. Esto producirá un flujo uniforme.

35 En cualquiera de las formas de realización de la invención se puede añadir una ayuda de procesamiento seleccionada como α -galactosidasa al sustrato de biomasa y/o a la mezcla de incubación inicial, por ejemplo, una preparación de α -galactosidasa se añade al sustrato de biomasa y/o a la mezcla de incubación inicial en una cantidad desde 0,05 a 50 unidades de α -galactosidasa por g de materia seca de sustrato de biomasa, tal como desde 0,5 a 25 unidades de α -galactosidasa por g de materia seca de sustrato de biomasa, por ejemplo de 1 a 10, de 2 a 8, de 3 a 6, o de 4 a 5 unidades de α -galactosidasa por g de materia seca de sustrato de biomasa.

40 En cualquiera de las formas de realización de la invención la incubación se puede llevar a cabo en condiciones anaerobias. Las condiciones anaerobias se facilitan por la presente invención.

45 En cualquiera de las formas de realización de la invención el contenido de agua en la mezcla de incubación puede ser desde el 35% al 70% en peso, tal como el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, o 65% en peso. Por tanto, el contenido de agua en la mezcla inicial no supera el 70% en peso y puede variar desde, por ejemplo, desde el 40% al 65%, desde el 45% al 60%, desde el 48% al 52%, o desde el 50% al 55%, tal como el 49, 50, 51, 52, 53, o 54%.

50 En cualquiera de las formas de realización de la invención la mezcla se incuba durante 1-240 horas a 15-70°C. El experto sabrá cómo optimizar el tiempo de reacción y la temperatura de reacción en vista de las otras condiciones de reacción, tal como la selección de microorganismos. Por tanto, la temperatura puede variar como, por ejemplo, 20-65°C, 25-60°C, 30-55°C, 35-50°C, o 40-45°C; y el tiempo de reacción se puede seleccionar como, por ejemplo, de 2 a 180 horas, tal como de 5 a 150 horas, de 7 a 120 horas, de 1 a 80 horas, de 20 a 60 horas, o de 28 a 48 horas, en cada uno de los intervalos de temperatura mencionados aquí.

55 En cualquiera de las formas de realización de la invención el producto de transformación sólido del sustrato se puede secar, opcionalmente seguido por molido.

60 En cualquiera de las formas de realización de la invención la mezcla de sustrato se puede incubar a un tiempo y una temperatura suficientes para inactivar los microorganismos, factores antinutricionales y enzima(s) si se usan parcial o totalmente, y si se desea.

65 En cualquiera de las formas de realización de la invención el tanque de incubación no agitado puede ser cerrado.

En cualquiera de las formas de realización de la invención el tanque de incubación no agitado puede ser de un tipo vertical, alargado cilíndrico o poliédrico. La ventaja de usar este tipo es que ahorra espacio y como es no agitado se evitan los costes de operación y los costes de mantenimiento para el equipo de mezclado.

5 En cualquiera de las formas de realización de la invención el área en la parte superior de dicho tanque de incubación no agitado puede ser menor que el área en la parte inferior, es decir, el tanque es de forma cónica. La ventaja de esto es que el efecto deslizante aumenta de modo que se pueden usar biomásas con una capacidad de flujo reducida.

10 En cualquiera de las formas de realización de la invención el tanque de incubación no agitado puede tener esterilla aislante o una camisa térmica con hoyuelos y medios para controlar la temperatura dentro del tanque de incubación.

El producto de transformación sólido del sustrato proporcionado por la invención se puede secar a un contenido de agua de no más del 15%, 13%, 10%, 6%, 4%, o 2% en peso y opcionalmente estar en forma molida.

15 El producto sólido de la invención puede ser un producto de la transformación de materia proteínica y/o hidratos de carbono originarios de dicha biomasa. El producto de transformación sólido puede tener contenido reducido de factores antinutricionales, tal como inhibidores de tripsina, antígenos, oligosacáridos que producen flatulencia, por ejemplo, estaquiosa y rafinosa; ácido fítico, y lectina.

20 El producto sólido de la invención puede comprender al menos el 40% de materia proteínica en peso de materia seca originaria de soja.

El producto sólido de la invención puede comprender al menos el 40% de materia proteínica en peso de materia seca originaria de colza.

25 El producto sólido de la invención puede comprender proteínas en una cantidad del 30-65% en peso en base a materia seca originaria de partes vegetales de soja, colza, o girasol, o mezclas de las mismas.

30 Por último, la invención proporciona un alimento, pienso, producto cosmético o farmacéutico o un suplemento nutricional que contiene desde el 1% al 99% en peso de un producto de transformación sólido producido según la invención.

Ejemplos

35 Proporción de densidad

Ejemplo 1:

Proporción densidad aparente húmeda/densidad aparente seca para sustratos preferidos basados en varias biomásas

40 1.1 Biomásas usadas en el procedimiento:

Soja

45 La soja usada era harina de soja (SBM) desgrasada.

Maíz

50 El maíz usado era maíz integral, molido en un molino de martillos a través de un tamiz de 3,5 mm.

Trigo

El trigo usado era trigo integral, molido en un molino de martillos a través de un tamiz de 3,5 mm.

55 Girasol

El girasol usado era harina de semilla de girasol (SSM) desgrasada.

Colza

60 La colza usada era harina de semilla de colza (RSM) desgrasada.

Habas

65 Las habas usadas eran habas enteras

ES 3 019 569 T3

Proteína de guisante

La proteína de guisante usada era un concentrado de proteína de guisante

5 1.2. Descripción del procedimiento:

Se mezclaron la(s) cantidad(es) de biomasa y agua tabuladas a continuación durante diez minutos seguido por cincuenta minutos de equilibrio en un recipiente cerrado.

10 Después este material se echó en un vaso medidor de 500 ml y se determinó su masa pesando el vaso y restando la tara del vaso.

La densidad aparente se calculó como masa/volumen sin asentar en kg/m³.

15 La densidad aparente seca usada era la densidad aparente medida de la biomasa sin adición de agua.

La densidad aparente húmeda era la densidad aparente de la biomasa con agua añadida.

Se calculó la proporción como la densidad aparente húmeda dividida por la densidad aparente seca.

20

El contenido de humedad de las biomásas se determinó secando a un peso constante.

Después de la adición de agua la humedad en la mezcla se determinó por cálculo.

25 1.3. Resultados:

Los resultados para soja al 100% y mezclas al 80% con soja se tabulan a continuación:

Soja	Maíz	Trigo	Girasol	Colza	Haba	Guisante	Agua en g	Humedad en %	Densidad aparente kg/m ³	Razón
1000 g							0	10,9	665	-
1000 g							100	19,0	638	0,96
1000 g							250	28,7	500	0,75
1000 g							450	38,6	476	0,72
1000 g							750	49,1	470	0,71
1000 g							900	53,1	572	0,86
1000 g							1100	57,6	655	0,98
1000 g							1400	62,9	715	1,07
1000 g							1900	69,3	889	1,34
800 g	200 g						0	11,4	703	-
800 g	200 g						450	38,9	617	0,88
800 g	200 g						900	53,4	634	0,90
800 g	200 g						1900	69,4	1008	1,43
800 g		200 g					0	11,7	694	-
800 g		200 g					450	39,1	580	0,84
800 g		200 g					900	53,5	623	0,90
800 g		200 g					1900	69,5	960	1,38
800 g			200 g				0	10,4	683	-
800 g			200 g				450	38,2	554	0,81
800 g			200 g				900	52,9	598	0,88
800 g			200 g				1900	69,1	926	1,36
800 g				200 g			0	11,3	711	-
800 g				200 g			100	19,4	576	0,81
800 g				200 g			250	29,0	514	0,72
800 g				200 g			450	38,8	483	0,68
800 g				200 g			750	49,3	490	0,69
800 g				200 g			900	53,3	597	0,84
800 g				200 g			1100	57,8	528	0,74
800 g				200 g			1900	69,4	908	1,28

ES 3 019 569 T3

800 g				200 g	0	11,1	691	-
800 g				200 g	450	38,7	569	0,82
800 g				200 g	900	53,2	605	0,88
800 g				200 g	1900	69,3	941	1,36
800 g				200 g	0	11,2	703	-
800 g				200 g	450	38,7	488	0,69
800 g				200 g	900	53,2	728	1,04
800 g				200 g	1900	69,4	964	1,37

Los resultados para el 60% y 40% de mezclas de soja con maíz, girasol y colza, así como colza al 100% se tabulan a continuación.

Soja	Maíz	Girasol	Colza	Agua	Humedad en %	Densidad aparente kg/m ³	Razón
600 g	400 g			0 g	11,8	703	-
600 g	400 g			250 g	29,5	651	0,93
600 g	400 g			450 g	39,2	626	0,89
600 g	400 g			750 g	49,6	631	0,90
600 g	400 g			900 g	53,6	666	0,95
600 g	400 g			1100 g	58,0	723	1,03
600 g	400 g			1400 g	63,3	796	1,13
600 g		400 g		0 g	10,0	644	-
600 g		400 g		100 g	18,2	530	0,82
600 g		400 g		250 g	28,0	435	0,68
600 g		400 g		450 g	37,9	433	0,67
600 g		400 g		750 g	48,6	436	0,68
600 g		400 g		900 g	52,6	480	0,75
600 g		400 g		1100 g	57,1	449	0,70
600 g		400 g		1400 g	62,5	616	0,96
600 g			400 g	0 g	11,7	643	-
600 g			400 g	100 g	19,7	560	0,82
600 g			400 g	250 g	29,4	502	0,78
600 g			400 g	450 g	39,1	503	0,78
600 g			400 g	750 g	49,5	492	0,77
600 g			400 g	900 g	53,5	516	0,80
600 g			400 g	1100 g	57,9	545	0,85
600 g			400 g	1400 g	63,2	655	1,02
400 g	600 g			0 g	12,3	718	-
400 g	600 g			250 g	29,9	636	0,89
400 g	600 g			450 g	39,5	638	0,89
400 g	600 g			750 g	49,9	666	0,93
400 g	600 g			900 g	53,8	721	1,00
400 g	600 g			1100 g	58,2	802	1,12
400 g	600 g			1400 g	63,5	988	1,38
400 g		600 g		0 g	9,5	654	-
400 g		600 g		100 g	17,7	535	0,82
400 g		600 g		250 g	27,6	422	0,65
400 g		600 g		450 g	37,6	487	0,74
400 g		600 g		750 g	48,3	491	0,75
400 g		600 g		900 g	52,4	512	0,78
400 g		600 g		1100 g	56,9	585	0,89
400 g		600 g		1400 g	62,3	612	0,94
400 g			600 g	0 g	12,1	658	-
400 g			600 g	100 g	20,1	556	0,84
400 g			600 g	250 g	29,7	471	0,72

ES 3 019 569 T3

400 g			600 g	450 g	39,4	458	0,70
400 g			600 g	750 g	49,8	486	0,74
400 g			600 g	900 g	53,7	486	0,74
400 g			600 g	1100 g	58,1	531	0,81
400 g			600 g	1400 g	63,4	605	0,92
0 g			1000 g	0 g	12,9	616	-
0 g			1000 g	100 g	20,8	484	0,79
0 g			1000 g	250 g	30,3	438	0,71
0 g			1000 g	450 g	39,9	457	0,74
0 g			1000 g	750 g	50,2	507	0,82
0 g			1000 g	900 g	54,1	535	0,87
0 g			1000 g	1100 g	58,5	585	0,95
0 g			1000 g	1400 g	63,7	688	1,12

Ejemplo 2

5 Proporción de densidad aparente húmeda/densidad aparente seca para sustratos basados en varias biomásas y usados en experimentos con varios microorganismos

10 La determinación de la densidad aparente se realizó echando una cantidad de material (aprox. 250 ml) en una probeta graduada de 250 ml y leyendo el volumen después de nivelar la superficie agitando suavemente la probeta. Después de esto, se determinó el peso del material. Las densidades aparentes secas y las densidades aparentes húmedas se hicieron en triplicados.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Biomasa	Materia seca en % en peso	Razón de densidad = densidad aparente húmeda/densidad aparente seca
100% SBM	35	1,13
100% SBM	40	0,95
100% SBM	42,5	0,86
100% SBM	52	0,85
100% SBM	55	0,84
80% SBM + 20% RSM	35	1,05
80% SBM + 20% RSM	42,5	0,88
80% SBM + 20% RSM	52	0,78
60% SBM + 40% RSM	35	0,94
60% SBM + 40% RSM	42,5	0,84
60% SBM + 40% RSM	52	0,73

15 Pruebas de incubación a escala de laboratorio del método de tecnología nueva

Los siguientes ejemplos 3 a 9 eran experimentos a escala de laboratorio en las siguientes condiciones:

Antecedentes:

20 Los antecedentes para las siguientes pruebas de incubación a escala de laboratorio era imitar las condiciones en el método de la presente invención.

Materiales y métodos:

Materiales

30 Biomásas: harina de soja (SBM), harina de colza (RSM) y harina de semilla de girasol (SSM) – como se describen en la sección 1.1.

Agua: Agua del grifo normal

35 Microorganismos: El/los microorganismo(s) utilizado(s) se especifican para cada ejemplo. Para todos los experimentos, a menos que se indique en el ejemplo específico, los microorganismos se dosificaron con aproximadamente 10^8 UFC/g DM. Las bacterias del ácido láctico y *Bifidobacterium* se hicieron crecer en caldo MRS, se lavaron con NaCl al 0,9%, y se dosificaron a la incubación basado en una relación entre la DO_{600} y UFC/ml. La

ES 3 019 569 T3

cantidad en ml necesaria para dosificar 10^8 UFC/g DM se restó de la cantidad de agua total indicada en cada ejemplo. Para las cepas de *Bacillus*, la mayoría de ellas se dosificaron como cultivos formulados secos, pero *Geobacillus denitrificans* y *Bacillus smithii* se hicieron crecer en Caldo Nutriente, y se lavaron de la misma manera, y dosificaron de la misma manera, que se describe para las cepas de bacterias del ácido láctico.

5

Los microorganismos y su origen usados en los ejemplos se muestran en la siguiente tabla:

Cepa	Origen
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pangoo
<i>Lactobacillus paracasei</i> 5622	DSMZ
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Bio Growing
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bio Growing
<i>Lactobacillus delbruckii bulgaricus</i>	Bio Growing
<i>Lactobacillus debruckii sunkii</i> 24966	DSMZ
<i>Lactobacillus farciminis</i>	Aislado propio
<i>Lactobacillus formosensis</i>	Aislado propio
<i>Lactobacillus salivarius</i> 20554	DSMZ
<i>Bacillus coagulans</i>	Pangoo
<i>Bacillus licheniformis</i>	BioCat
<i>Bacillus subtilis</i>	BioCat
<i>Bacillus smithii</i> 2319	DSMZ
<i>Lactococcus lactis</i>	Bio Growing
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Bio Growing
<i>Pediococcus acidolactici</i>	Pangoo
<i>Enterococcus faecium</i>	Pangoo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Pangoo
<i>Enterococcus durans</i>	Aislado propio
<i>Weisella hellenica</i>	Aislado propio
<i>Streptococcus thermophiles</i>	Bio Growing
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> 466	DSMZ

DSMZ: Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares

10 Ayuda de procesamiento: α -galactosidasa de Bio-Cat (12.500 U/g). La α -galactosidasa se dosificó en 1 ml de agua, que se restó de la adición total de agua indicada en la tabla de cada ejemplo.

Método experimental usado

15 Tanque de incubación:

Para imitar las condiciones de bioconversión donde el oxígeno se vuelve no disponible, la bioconversión se realizó en bolsas de plástico fuerte, estrujadas a mano para eliminar aire y cerradas herméticamente con una correa, que aun permite que el CO₂ escape.

20

Incubación:

Las muestras se incubaron a diferentes temperaturas, diferentes contenidos de agua y a diferentes duraciones en tiempo, especificados para cada ejemplo. La incubación se paró calentando a 100°C durante 30 min.

25

Métodos analíticos:

Análisis de ácidos:

30 El análisis fue realizado por LUFA Oldenburg, Alemania, usando una digestión acuosa con filtración en membrana y posterior medida por un cromatógrafo iónico.

Sacarosa y galactosa (azúcares):

35 El contenido de sacarosa y galactosa se determinó por cromatografía en capa fina.

Fase estacionaria – gel de sílice 60 (Merck 1.05553.0001)

Fase móvil – 120 ml de n-butanol, 80 ml de piridina y 60 ml de agua desmineralizada.

40

Las manchas se visualizan con un líquido compuesto de 8 g de difenilamina, 335 ml de acetona, 8 ml de anilina y 60 ml de ácido fosfórico.

ES 3 019 569 T3

Las concentraciones de azúcar se determinaron por comparación con estándares conocidos.

pH:

5 El pH se midió en diluciones del 10% DM con un HQ 411d de HACH.

UFC:

10 Las UFC se determinaron por extensión en placa, usando placas de agar MRS para bacterias del ácido láctico, y agar Nutriente para las cepas de *Bacillus*.

Ejemplo 3

15 Ensayo de diferentes organismos de producción (LAB) a 20°C, a diferentes proporciones de materia seca

Configuración experimental:

Cepa	Materia seca % de peso	Nivel de inoculación UFC/g DM	SBM (88% DM) g	α -galactosidasa mg	Agua ml
<i>Lactobacillus salivarius</i>	42,5	$1 \cdot 10^8$	113,6	120	122
<i>Lactobacillus debruckii sunkii</i>	42,5	$1 \cdot 10^8$	113,6	120	122
<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	$1 \cdot 10^8$	113,6	120	172
<i>Lactobacillus plantarum</i>	42,5	$1 \cdot 10^8$	113,6	120	122
<i>Lactobacillus plantarum</i>	52	$1 \cdot 10^8$	113,6	120	79
<i>Lactobacillus paracasei</i>	35	$1 \cdot 10^8$	113,6	120	172
<i>Lactobacillus paracasei</i>	42,5	$1 \cdot 10^8$	113,6	120	122

20 Las muestras se incubaron en un baño de agua termostático a 20°C.

Resultados:

25 Después de 44 horas de incubación se obtuvieron los siguientes resultados, que muestran crecimiento, conversión de azúcar y producción de ácido:

Cepa	DM %	Ácido láctico % de DM	Ácido acético % de DM	Ácidos totales % de DM	pH	Nivel de inoculación UFC/g DM	Sacarosa % de DM	Galactosa % de DM
<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	4,9	1,2	6,1	4,9	$3 \cdot 10^{10}$	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	42,5	3,7	1,3	5,0	5,2	$2 \cdot 10^{10}$	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	52	3,2	0,9	4,1	5,2	$2 \cdot 10^{10}$	0	0

Después de 116 horas de incubación se obtuvieron los siguientes resultados, que muestran crecimiento, conversión de azúcar y producción de ácido:

30

Cepa	DM %	Ácido láctico % de DM	Ácido acético % de DM	Ácidos totales % de DM	pH	Nivel de inoculación UFC/g DM	Sacarosa % de DM	Galactosa % de DM
<i>Lactobacillus salivarius</i>	42,5	3,4	1,0	4,4	4,9	$9,5 \cdot 10^9$	0,5	1,6
<i>Lactobacillus debruckii sunkii</i>	42,5	3,7	0,5	4,2	4,9	$3,9 \cdot 10^9$	0	1,6
<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	7,3	1,1	8,4	4,5	$2,0 \cdot 10^{10}$	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	42,5	5,7	1,1	6,8	4,7	$2,3 \cdot 10^{10}$	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	52	5,1	1,2	6,3	4,8	$2,2 \cdot 10^{10}$	0	0
<i>Lactobacillus paracasei</i>	35	4,7	0,8	5,5	4,8	$1,9 \cdot 10^{10}$	6	0

ES 3 019 569 T3

<i>Lactobacillus paracasei</i>	42,5	3,2	0,6	3,8	4,8	1,8*10 ¹⁰	6	0
--------------------------------	------	-----	-----	-----	-----	----------------------	---	---

Parte de los azúcares todavía estaba unida en oligosacáridos en este experimento, incluso después de 166 horas. El potencial para producción de ácidos es por tanto mayor que el obtenido en esta prueba.

5 Ejemplo 4

Ensayo de diferentes organismos de producción (LAB) a 30°C, al 40% DM

Configuración experimental:

10

Cepa	Materia seca % de peso	Nivel de inoculación UFC/g DM	SBM (88% DM) g	α-galactosidasa mg	Agua ml
<i>Lactobacillus plantarum</i>	40	1*10 ⁸	68,2	72	82
<i>Lactococcus lactis</i>	40	1*10 ⁸	68,2	72	82
<i>Enterococcus faecium</i>	40	1*10 ⁸	68,2	72	82

Las muestras se incubaron en un baño de agua termostático a 30°C.

Resultados:

15

Después de 45 horas de incubación se obtuvieron los siguientes resultados, que muestran crecimiento, conversión de azúcar y producción de ácido:

Cepa	DM %	Ácido láctico % de DM	Ácido acético % de DM	Ácidos totales % de DM	pH	Nivel de inoculación UFC/g DM	Sacarosa % de DM	Galactosa % de DM
<i>Lactobacillus plantarum</i>	40	6,2	1,1	7,3	4,6	1*10 ¹⁰	0	1,4
<i>Lactococcus lactis</i>	40	3,7	0,9	4,6	4,8	1*10 ¹⁰	1,8	1,8
<i>Enterococcus faecium</i>	40	5,1	1,4	6,5	4,8	2*10 ¹⁰	0,4	1,4

20

Después de 69 horas de incubación se obtuvieron los siguientes resultados, que muestran conversión de azúcar y producción de ácido (las UFC no se determinaron):

Cepa	DM %	Ácido láctico % de DM	Ácido acético % de DM	Ácidos totales % de DM	pH	Nivel de inoculación UFC/g DM	Sacarosa % de DM	Galactosa % de DM
<i>Lactobacillus plantarum</i>	40	7,0	1,0	8,0	4,5		0	0,5
<i>Lactococcus lactis</i>	40	4,3	1,2	5,5	4,6		1,8	1,2
<i>Enterococcus faecium</i>	40	5,8	1,3	7,1	4,6		0	0,6

25 Ejemplo 5

Ensayo de diferentes organismos de producción a 37°C, a diferentes proporciones de materia seca

Configuración experimental:

Cepa	No. Experimento	Materia seca % de peso	Nivel de inoculación UFC/g DM	SBM (88% DM) g	α-galactosidasa mg	Agua ml
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	35	1*10 ⁸	113,6	120	172
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	42,5	1*10 ⁸	113,6	120	122
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	42,5	1*10 ⁸	113,6	No añadida	122
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4	42,5	1*10 ⁷	68,2	72	73

ES 3 019 569 T3

<i>Lactobacillus plantarum</i>	5	42,5	1*10 ⁹	68,2	72	73
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6	52	1*10 ⁸	113,6	120	79
<i>Lactobacillus paracasei</i>	7	35	1*10 ⁸	113,6	120	172
<i>Lactobacillus paracasei</i>	8	42,5	1*10 ⁸	113,6	120	122
<i>Lactobacillus paracasei</i>	9	52	1*10 ⁸	113,6	120	79
<i>Bacillus coagulans</i>	10	35	1*10 ⁸	68,2	72	103
<i>Bacillus coagulans</i>	11	42,5	1*10 ⁸	68,2	72	73
<i>Bacillus coagulans</i>	12	42,5	1*10 ⁸	113,6	No añadida	122
<i>Bacillus coagulans</i>	13	42,5	1*10 ⁷	68,2	72	73
<i>Bacillus coagulans</i>	14	55	1*10 ⁸	68,2	72	41
<i>Bacillus licheniformis</i>	15	35	1*10 ⁸	68,2	72	103
<i>Bacillus licheniformis</i>	16	42,5	1*10 ⁸	68,2	72	73
<i>Bacillus licheniformis</i>	17	55	1*10 ⁸	68,2	72	41
<i>Bacillus subtilis</i>	18	35	1*10 ⁸	68,2	72	103
<i>Bacillus subtilis</i>	19	42,5	1*10 ⁸	113,6	120	122
<i>Bacillus subtilis</i>	20	55	1*10 ⁸	68,2	72	41
<i>Lactobacillus fermentum</i>	21	42,5	1*10 ⁸	68,2	72	73
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	22	42,5	6*10 ⁷	68,2	72	73
<i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i>	23	42,5	2*10 ⁷	68,2	72	73
<i>Lactobacillus farciminis</i>	24	42,5	6*10 ⁶	68,2	72	73
<i>Lactobacillus formosensis</i>	25	42,5	1*10 ⁸	113,6	120	122
<i>Lactococcus lactis</i>	26	42,5	4*10 ⁷	68,2	72	73
<i>Bifidobacterium animalis</i>	27	42,5	1*10 ⁸	68,2	72	73
<i>Pediococcus acidolactici</i>	28	42,5	1*10 ⁸	68,2	72	73
<i>Enterococcus faecium</i>	29	42,5	1*10 ⁸	68,2	72	73
<i>Enterococcus faecalis</i>	30	42,5	1*10 ⁸	68,2	72	73
<i>Enterococcus durans</i>	31	42,5	1*10 ⁸	113,6	120	122
<i>Weisella hellenica</i>	32	42,5	1*10 ⁸	113,6	120	122
<i>Lactobacillus salivarius</i> + <i>Lactobacillus paracasei</i>	33	42,5	1*10 ⁸ y 3*10 ⁷	113,6	120	122
<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Bifidobacterium animalis</i>	34	42,5	5*10 ⁷ y 5*10 ⁷	113,6	120	122
<i>Pediococcus acidolactici</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i>	35	42,5	5*10 ⁷ y 5*10 ⁷	113,6	120	122
<i>Lactobacillus farciminis</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i>	36	42,5	5*10 ⁷ y 5*10 ⁷	113,6	120	122
<i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>saccharosa</i> (5% DM)	37	42,5	1*10 ⁸	113,6	120	122

Resultados:

5 Después de 18,5 a 20 h de incubación se obtuvieron los siguientes resultados, que muestran crecimiento, conversión de azúcar y producción de ácido.

ES 3 019 569 T3

Cepa	No. Exp.	DM %	Ácido láctico % de DM	Ácido acético % de DM	Ácidos totales % de DM	pH	Nivel de inoculación UFC/g DM	Sacarosa % de DM	Galactosa % de DM
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	35	6,1	1,2	7,3	4,6	nd	1	2
<i>Lactobacillus plantarum</i> Inoc: 10 ⁸ UFC/g	2	42,5	5,3	1,2	6,5	4,7	nd	1	2
<i>Lactobacillus plantarum</i> Inoc: 10 ⁷ UFC/g	4	42,5	5,5	1,2	6,7	5,0	nd	2	2
<i>Lactobacillus plantarum</i> Inoc: 10 ⁹ UFC/g	5	42,5	6,5	1,2	7,7	4,8	nd	1	2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6	52	4,7	1,1	5,8	4,8	nd	2	2
<i>Lactobacillus paracasei</i>	7	35	5,3	0,1	5,4	4,4	nd	2	2
<i>Lactobacillus paracasei</i>	8	42,5	4,5	0,1	4,6	4,5	nd	2,6	2
<i>Bacillus coagulans</i> Inoc: 10 ⁸ UFC/g	11	42,5	4,5	1,4	5,9	5,3	8*10 ⁹	2,5	2
<i>Bacillus coagulans</i> Inoc: 10 ⁷ UFC/g	13	42,5	3,6	1,4	5,0	5,4	7*10 ⁹	2,5	2
<i>Lactobacillus farciminis</i> (no 1)	24	42,5	4,2	0,1	4,3	4,8	nd	4	3,5
<i>Lactococcus lactis</i>	26	42,5	3,0	2,0	5,0	5,0	nd	2	2
<i>Bifidobacterium animalis</i>	27	42,5	4,1	2,0	6,1	5,0	nd	2	2
<i>Pediococcus acidolactici</i>	28	42,5	3,7	1,5	5,2	5,1	nd	2	2
<i>Enterococcus faecium</i>	29	42,5	5,4	1,4	6,8	5,1	nd	2	2
<i>Lactobacillus salivarius</i> + <i>Lactobacillus paracasei</i>	33	42,5	5,1	0,1	5,2	4,4	nd	2	2
<i>Streptococcus thermophiles</i> + <i>Bifidobacterium animalis</i>	34	42,5	4,1	1,9	6,0	4,9	nd	2	2
<i>Pediococcus acidolactici</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i>	35	42,5	5,4	1,2	6,6	4,7	nd	1	2
<i>Lactobacillus farciminis</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i>	36	42,5	6,0	0,9	6,9	4,5	nd	1	2
<i>Lactobacillus plantarum</i> + sacarosa	37	42,5	5,3	1,1	6,4	4,7	nd	6	2

nd: no determinado

Después de 42,5 y 44 h de incubación se obtuvieron los siguientes resultados, que muestran crecimiento, conversión de azúcar y producción de ácido.

5

ES 3 019 569 T3

Cepa	No. Exp.	DM %	Ácido láctico % de DM	Ácido acético % de DM	Ácidos totales % de DM	pH	Nivel de inoculación UFC/g DM	Sacarosa % de DM	Galactosa % de DM
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	35	7,3	1,0	8,3	4,4	1*10 ¹⁰	0	1,4
<i>Lactobacillus plantarum</i> Inoc: 10 ⁸ UFC/g	2	42,5	6,8	1,2	8,0	4,4	1*10 ¹⁰	0	1,8
<i>Lactobacillus plantarum</i> (no α-gal)	3	42,5	3,6	1,2	4,8	5,1	5*10 ⁹	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> Inoc: 10 ⁷ UFC/g	4	42,5	7,3	1,5	8,8	4,6	nd	0	1,1
<i>Lactobacillus plantarum</i> Inoc: 10 ⁹ UFC/g	5	42,5	7,9	1,1	9,0	4,6	nd	0	1,25
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6	52	6,6	1,2	7,8	4,5	1*10 ¹⁰	0	1,8
<i>Lactobacillus paracasei</i>	7	35	7,2	0,1	7,3	4,1	3*10 ¹⁰	0	2,4
<i>Lactobacillus paracasei</i>	8	42,5	6,6	0,1	6,7	4,2	2*10 ¹⁰	0,5	2,6
<i>Lactobacillus paracasei</i>	9	52	5,3	0,1	5,4	4,4	2*10 ¹⁰	3	3
<i>Bacillus coagulans</i>	10	35	6,9	1,2	8,1	4,5	nd	0	1,3
<i>Bacillus coagulans</i> Inoc: 10 ⁸ UFC/g	11	42,5	8,2	1,3	9,5	4,6	4*10 ⁹	0,4	1
<i>Bacillus coagulans</i> (no α-gal)	12	42,5	5,5	1,2	6,7	4,7	2*10 ⁹	0	0
<i>Bacillus coagulans</i> Inoc: 10 ⁷ UFC/g	13	42,5	7,3	1,3	8,6	4,7	3*10 ⁹	0,5	1
<i>Bacillus coagulans</i>	14	55	3,7	0,8	4,5	5,1	nd	2	2
<i>Bacillus licheniformis</i>	15	35	2,7	0,0	2,7	5,1	nd	2,5	4
<i>Bacillus licheniformis</i>	16	42,5	0,8	0,0	0,8	6,0	nd	2,5	4
<i>Bacillus licheniformis</i>	17	55	0,2	0,0	0,2	6,4	nd	2,7	3,3
<i>Bacillus subtilis</i>	18	35	2,4	0,1	2,5	5,1	nd	3	4
<i>Bacillus subtilis</i>	19	42,5	2,5	0,9	3,4	5,3	3*10 ⁹	3,6	2,6
<i>Bacillus subtilis</i>	20	55	0,5	0,1	0,6	6,0	nd	5	2
<i>Lactobacillus fermentum</i>	21	42,5	4,6	2,1	6,7	4,9	5*10 ¹⁰	1	1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	22	42,5	4,2	0,2	4,4	4,7	4*10 ⁹	1	1
<i>Lactobacillus delbruckii bulgaricus</i>	23	42,5	3,7	1,7	5,4	5,2	8*10 ⁹	3,3	2,5
<i>Lactobacillus farciminis</i>	24	42,5	7,9	0,3	8,2	4,2	5*10 ⁹	0,8	2,8
<i>Lactobacillus formosensis</i>	25	42,5	6,5	0,2	6,7	4,2	3*10 ⁹	0,5	2
<i>Lactococcus lactis</i>	26	42,5	4,0	2,3	6,3	4,8	8*10 ⁹	0,8	1
<i>Bifidobacterium animalis</i>	27	42,5	4,5	2,1	6,6	4,9	6*10 ⁹	1	0,8

ES 3 019 569 T3

<i>Pediococcus acidolactici</i>	28	42,5	6,9	1,5	8,4	4,6	9*10 ⁹	0,5	0,7
<i>Enterococcus faecium</i>	29	42,5	7,6	1,5	9,1	4,6	7*10 ⁹	0,5	0,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	30	42,5	5,8	1,5	7,3	4,7	9*10 ⁹	0,3	0,3
<i>Enterococcus durans</i>	31	42,5	2,7	0,2	2,9	4,9	2*10 ⁹	3	2
<i>Weisella hellenica</i>	32	42,5	4,1	1,6	5,7	4,9	3*10 ⁹	1	1
<i>Lactobacillus salivarius</i> + <i>Lactobacillus paracasei</i>	33	42,5	6,2	0,1	6,3	4,2	1*10 ¹⁰	1	1,9
<i>Streptococcus thermophiles</i> + <i>Bifidobacterium animalis</i>	34	42,5	5,1	2,0	7,1	4,8	8*10 ¹⁰	0,2	1
<i>Pediococcus acidolactici</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i>	35	42,5	6,9	1,2	8,1	4,4	1*10 ¹⁰	0	1
<i>Lactobacillus farciminis</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i>	36	42,5	7,4	1,0	8,4	4,4	9*10 ⁹	0	1,4
<i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>saccharosa</i>	37	42,5	6,5	1,0	7,5	4,4	1*10 ¹⁰	4	2,2

nd: no determinado

Después de 116 h de incubación se obtuvieron los siguientes resultados, que muestran conversión de azúcar y producción de ácido.

5

Cepa	No Exp.	DM %	Ácido láctico % de DM	Ácido acético % de DM	Ácidos totales % de DM	pH	Sacarosa % de DM	Galactosa % de DM
<i>Bacillus coagulans</i>	10	35	7,7	1,2	8,9	4,3	0	0
<i>Bacillus coagulans</i>	11	42,5	7,7	1,2	8,9	4,3	0,1	0,5
<i>Bacillus coagulans</i>	14	55	4,8	0,7	5,5	4,8	1,2	1,6
<i>Bacillus licheniformis</i>	15	35	2,5	0,1	2,6	4,8	0,3	3,5
<i>Bacillus licheniformis</i>	16	42,5	1,7	0,1	1,8	5,5	2	3,3
<i>Bacillus licheniformis</i>	17	55	0,4	0,1	0,5	6,3	2,9	3,3
<i>Bacillus subtilis</i>	18	35	1,6	0,1	1,7	4,9	0	3,5
<i>Bacillus subtilis</i>	19	42,5	1,4	0,1	1,5	5,1	1,5	3,5
<i>Bacillus subtilis</i>	20	55	0,8	0,2	1,0	5,9	5	3

Ejemplo 6

Ensayo de diferentes organismos de producción a 44°C, al 40% DM

10

Configuración experimental:

Cepa	Materia seca % de peso	Nivel de inoculación UFC/g DM	SBM (88% DM) g	α-galactosidasa mg	Agua ml
<i>Lactobacillus plantarum</i>	40	1*10 ⁸	68,2	72	73
<i>Pediococcus acidolactici</i>	40	1*10 ⁸	68,2	72	73
<i>Bacillus coagulans</i>	40	1*10 ⁸	68,2	72	73
<i>Bacillus licheniformis</i>	40	1*10 ⁸	68,2	72	73
<i>Bacillus subtilis</i>	40	1*10 ⁸	68,2	72	73

ES 3 019 569 T3

Las muestras se incubaron en un baño de agua termostático a 44°C.

Resultados:

- 5 Después de 20 horas de incubación se obtuvieron los siguientes resultados, que muestran crecimiento, conversión de azúcar y producción de ácido:

Cepa	DM %	Ácido láctico % de DM	Ácido acético % de DM	Ácidos totales % de DM	pH	Nivel de inoculación UFC/g DM	Sacarosa % de DM	Galactosa % de DM
<i>Lactobacillus plantarum</i>	40	5,1	0,2	5,3	4,8	Nd	3	2,5
<i>Pediococcus acidolactici</i>	40	4,7	0,2	4,9	4,8	Nd	3	3
<i>Bacillus coagulans</i>	40	4,4	0,1	4,5	5,0	2*10 ¹⁰	2	2,5
<i>Bacillus licheniformis</i>	40	1,1	0,0	1,1	6,0	2*10 ⁸	2,5	3,6
<i>Bacillus subtilis</i>	40	0,7	0,2	0,9	6,0	1*10 ⁹	6,5	3,8

nd: no determinado

- 10 Después de 44 horas de incubación se obtuvieron los siguientes resultados, que muestran conversión de azúcar y producción de ácido (las UFC no se determinaron):

Cepa	DM %	Ácido láctico % de DM	Ácido acético % de DM	Ácidos totales % de DM	pH	Sacarosa % de DM	Galactosa % de DM
<i>Lactobacillus plantarum</i>	40	6,8	0,3	7,1	4,4	3	2,2
<i>Pediococcus acidolactici</i>	40	6,6	0,3	6,9	4,4	2	1,5
<i>Bacillus coagulans</i>	40	7,2	0,2	7,4	4,4	0,5	1,0
<i>Bacillus licheniformis</i>	40	1,5	0,1	1,6	5,9	1	2,9
<i>Bacillus subtilis</i>	40	1,3	0,1	1,4	5,7	4,5	2,9

15 Ejemplo 7

Ensayo de diferentes organismos de producción a 52°C, al 52% DM

Configuración experimental:

Cepa	Materia seca % de peso	Nivel de inoculación UFC/g DM	SBM (88% DM) g	α-galactosidasa mg	Agua ml
<i>Bacillus smithii</i>	42,5	1*10 ⁸	113,6	120	172
<i>Bacillus smithii</i>	42,5	1*10 ⁸	113,6	Sin adición	172
<i>Bacillus licheniformis</i>	42,5	1*10 ⁸	113,6	120	172
<i>Bacillus licheniformis</i>	42,5	1*10 ⁸	113,6	Sin adición	172
<i>Bacillus coagulans</i>	42,5	1*10 ⁸	113,6	120	172

Las muestras se incubaron en un baño de agua termostático a 52°C.

Resultados:

- 25 Después de 116,5 horas de incubación se obtuvieron los siguientes resultados, que muestran crecimiento, conversión de azúcar y producción de ácido:

Cepa	DM %	Ácido láctico % de DM	Ácido acético % de DM	Ácidos totales % de DM	pH	Nivel de inoculación UFC/g DM	Sacarosa % de DM	Galactosa % de DM
<i>Bacillus smithii</i>	42,5	3,3	0,1	3,4	5,2	1*10 ⁶	4	2
<i>Bacillus smithii</i> (no α-gal)	42,5	2,2	0,1	2,3	5,3	Nd	2	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	42,5	3,8	0	3,8	5,4	5*10 ⁷	3	2

ES 3 019 569 T3

<i>Bacillus licheniformis</i> (no α -gal)	42,5	2,7	0	2,7	5,5	Nd	0,5	0
<i>Bacillus coagulans</i>	42,5	1,8	0,2	2,0	4,9	$4 \cdot 10^8$	1,5	1,5

nd: no determinado

Ejemplo 8

5 Ensayo de diferentes organismos de producción a 60°C

Configuración experimental:

Cepa	Materia seca % de peso	Nivel de inoculación UFC/g DM	SBM (88% DM) g	α -galactosidasa mg	Agua ml
<i>Bacillus coagulans</i>	42,5	$1 \cdot 10^8$	113,6	120	122
<i>Bacillus smithii</i>	42,5	$1 \cdot 10^8$	113,6	120	122
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	35	$1 \cdot 10^8$	113,6	120	122

10 Las muestras se incubaron en un incubador a 60°C.

Resultados:

15 Después de 44,5 y 116,5 horas de incubación se obtuvieron los siguientes resultados, que muestran crecimiento, conversión de azúcar y producción de ácido:

Cepa	Tiempo de incubación Horas	DM %	Ácido láctico % de DM	Ácido acético % de DM	Ácidos totales % de DM	pH	Nivel de inoculación UFC/g DM	Sacarosa % de DM	Galactosa % de DM
<i>Bacillus coagulans</i>	116,5	42,5	1,3	0,2	1,5	5,3	$6 \cdot 10^6$	7	4
<i>Bacillus smithii</i>	116,5	42,5	0,8	0,4	1,2	5,7	$5 \cdot 10^6$	7	4
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	44,5	35	2,0	0,2	2,2	5,2	$9 \cdot 10^7$	8	4

Ejemplo 9

20 Bioconversión con biomásas alternativas

Incubación a 37°C durante 42,5 a 45,5 horas

Cepa	Materia seca % de peso	Nivel de inoculación UFC/g DM	SBM (88% DM) g	RSM (88% DM) g	SSM (88% DM) g	α -galactosidasa mg	Agua ml
<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	$1 \cdot 10^8$	113,6	-	-	120	172
<i>Lactobacillus plantarum</i>	42,5	$1 \cdot 10^8$	113,6	-	-	120	122
<i>Lactobacillus plantarum</i>	52	$1 \cdot 10^8$	113,6	-	-	120	79
<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	$1 \cdot 10^8$	90,1	22,8	-	120	172
<i>Lactobacillus plantarum</i>	42,5	$1 \cdot 10^8$	90,1	22,8	-	120	122
<i>Lactobacillus plantarum</i>	52	$1 \cdot 10^8$	90,1	22,8	-	120	79
<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	$1 \cdot 10^8$	67,8	-	43,8	120	174
<i>Lactobacillus plantarum</i>	42,5	$1 \cdot 10^8$	67,8	-	43,8	120	124
<i>Lactobacillus plantarum</i>	52	$1 \cdot 10^8$	67,8	-	43,8	120	81

ES 3 019 569 T3

<i>Bacillus coagulans</i>	35	1*10 ⁸	68,2	-	-	72	103
<i>Bacillus coagulans</i>	42,5	1*10 ⁸	113,6	-	-	120	122
<i>Bacillus coagulans</i>	55	1*10 ⁸	68,2	-	-	72	41
<i>Bacillus coagulans</i>	35	1*10 ⁸	90,1	22,8	-	120	172
<i>Bacillus coagulans</i>	42,5	1*10 ⁸	90,1	22,8	-	120	122
<i>Bacillus coagulans</i>	52	1*10 ⁸	90,1	22,8	-	120	79
<i>Bacillus coagulans</i>	35	1*10 ⁸	67,8	-	43,8	120	174
<i>Bacillus coagulans</i>	42,5	1*10 ⁸	67,8	-	43,8	120	124
<i>Bacillus coagulans</i>	52	1*10 ⁸	67,8	-	43,8	120	81

Resultados:

- 5 Después de 42,5 a 45,5 horas de incubación se obtuvieron los siguientes resultados, que muestran crecimiento, conversión de azúcar y producción de ácido:

Cepa	DM %	Biomasa	Ácido láctico % de DM	Ácido acético % de DM	Ácidos totales % de DM	pH	Nivel de inoculación UFC/g DM	Sacarosa % de DM	Galactosa % de DM
<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	SBM	7,2	0,1	7,3	4,1	3*10 ¹⁰	0	2,4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	42,5	SBM	6,8	1,2	8,0	4,4	1*10 ¹⁰	0	1,8
<i>Lactobacillus plantarum</i>	52	SBM	6,6	1,2	7,8	4,5	1*10 ¹⁰	0	1,8
<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	SBM/RSM	7,3	0,9	8,2	4,4	5*10 ⁹	0	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	42,5	SBM/RSM	6,8	1,0	7,8	4,4	5*10 ⁹	0	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	52	SBM/RSM	5,9	0,9	6,8	4,5	7*10 ⁹	0,8	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	SBM/SSM	6,5	0,7	7,2	4,4	4*10 ⁹	0	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	42,5	SBM/SSM	6,3	0,7	7,0	4,4	4*10 ⁹	0	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	52	SBM/SSM	5,7	0,7	6,4	4,4	4*10 ⁹	0,8	1
<i>Bacillus coagulans</i>	35	SBM	6,9	1,2	8,1	4,5	nd	0	1,3
<i>Bacillus coagulans</i>	42,5	SBM	6,5	1,3	7,8	4,5	7*10 ⁹	0	0,5
<i>Bacillus coagulans</i>	55	SBM	3,7	0,8	4,5	5,1	nd	2	2
<i>Bacillus coagulans</i>	35	SBM/RSM	7,2	0,9	8,1	4,4	2*10 ⁹	0	0,5
<i>Bacillus coagulans</i>	42,5	SBM/RSM	6,3	1,0	7,3	4,4	3*10 ⁹	0,3	0,8
<i>Bacillus coagulans</i>	52	SBM/RSM	5,6	0,9	6,5	4,5	2*10 ⁹	1	1
<i>Bacillus coagulans</i>	35	SBM/SSM	6,1	0,7	6,8	4,4	2*10 ⁹	0	0
<i>Bacillus coagulans</i>	42,5	SBM/SSM	5,8	0,7	6,5	4,4	5*10 ⁹	0,3	0,5
<i>Bacillus coagulans</i>	52	SBM/SSM	4,7	0,7	5,4	4,6	3*10 ⁹	1	1

Ejemplo 10

- 10 Bioconversión a escala piloto

Incubador:

- 15 El incubador era un reactor vertical a escala piloto con un volumen total de 2,0 m². El incubador estaba equipado con una sonda de temperatura en la entrada, así como en la salida.

Mezcla de incubación:

5 El incubador se incubó con una mezcla precalentada de 250 kg de harina de soja (88% DM); 264 g de α -galactosidasa de Bio-Cat (12.500 U/g), formulación seca de *Bacillus coagulans* para alcanzar un nivel de inoculación final de $1 \cdot 10^7$ células/g DM, y 268 litros de agua del grifo. La proporción densidad aparente húmeda/densidad aparente seca de la mezcla de incubación era 0,88. Esto produjo una DM del 42,5% de la mezcla de incubación.

Procedimiento de prueba:

10 Después de llenar el reactor, se purgó con gas N_2 , para eliminar el O_2 . La biomasa se incubó a 60 horas a 37°C.

Resultados:

15 Después de 60 horas se obtuvo un producto que comprende el 7,5% de DM de ácido láctico y el 1,3% de DM de ácido acético.

El pH había caído a 4,6.

20 **Ejemplo 11**

Bioconversión a gran escala

Incubador:

25 El reactor usado era un cilindro vertical con una altura eficiente de 7,3 m y un diámetro de 4,3 m.

30 En la parte superior del reactor vertical, la mezcla de alimentación cae en posición cerca del centro del reactor. Para una distribución uniforme, una hoja raspadora o brazo de nivel distribuye la mezcla de alimentación de entrada sobre el perímetro del reactor.

En el fondo del reactor, el producto se extrajo por medios para alcanzar un tiempo de residencia uniforme para cualquier partícula extendida en la parte superior del reactor.

35 Ensayo de flujo de pistón uniforme

Los medios de entrada y salida del reactor se ajustaron para lograr un tiempo de residencia esperado de 12 horas. Para proporcionar el tiempo de distribución uniforme, una sustancia marcadora inerte se añadió a la mezcla de alimentación. La mezcla de alimentación usada en el experimento tenía un contenido natural de hierro de aproximadamente 143 mg/kg de materia seca (= concentración compensada); por tanto, se usó sulfato de hierro ($FeSO_4$) como un marcador en una concentración de 1167 mg de $FeSO_4$ /kg de materia seca de mezcla de alimentación igual a un contenido de hierro total de 572 mg de Fe/kg de materia seca total. Al tiempo 0 horas, el $FeSO_4$ se añadió a la mezcla de alimentación dosificada al reactor durante un periodo de 60 minutos. Se sacaron muestras cada 20 minutos, se secaron, y analizaron para el contenido de hierro, y se encontró que el producto enriquecido en $FeSO_4$ 40
45
deja el reactor 12-13 horas después de dosificar el $FeSO_4$ a la mezcla de alimentación de entrada, y se encontró una concentración máxima de 355 mg/Kg de Fe a 12,5 horas después del inicio.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un producto de transformación sólido de un sustrato, en donde el producto de transformación sólido es un producto de la transformación de materia proteínacea y/o hidratos de carbono originarios de una biomasa, que comprende las siguientes etapas:
- preparar un sustrato de biomasa que comprende hidratos de carbono y materia proteínacea originarios de semilla de soja, semilla de colza, o mezclas de las mismas, en donde al menos el 20% en peso de dicha biomasa comprende hidratos de carbono y materia proteínacea originarios de semillas de soja o semilla de colza, o mezclas de las mismas, opcionalmente en mezcla adicional con hidratos de carbono y materia proteínacea originarios de semillas de habas, semillas de guisantes, semilla de girasol, semilla de altramuz, y/o semillas de cereales;
 - mezclar dicho sustrato con un microorganismo vivo o una combinación de microorganismos vivos, microorganismo vivo o combinación de microorganismos vivos que no es, o no comprende, levadura viva, y añadir agua en una cantidad que proporciona una mezcla de incubación inicial que tiene un contenido de agua desde el 30% al 70% en peso, y una proporción de densidad aparente húmeda respecto a densidad aparente seca desde 0,60 a 1,45, en donde la densidad aparente seca es la densidad aparente (peso/volumen) medida de la biomasa sin el agua añadida, y la densidad aparente húmeda es la densidad aparente (peso/volumen) medida de la biomasa con la cantidad añadida de agua;
 - incubar dicha mezcla de incubación inicial durante 1-240 horas a una temperatura de 15-70°C, y recuperar el producto de transformación sólido de la mezcla incubada;
- que además comprende que la etapa de incubación se realice como un proceso de flujo de pistón continuo, uniforme en un tanque de incubación no agitado, vertical con medio de entrada para dicha mezcla y aditivos y medio de salida para dicho producto de transformación sólido, en donde el transporte de la biomasa en el tanque de incubación no agitado, vertical está mediado por fuerza gravitacional.
2. Método según la reivindicación 1, que además comprende el pretratamiento de dicho sustrato de biomasa antes de mezclarlo con dicho microorganismo vivo o dicha combinación de microorganismos vivos, tal como un pretratamiento químico o físico, por ejemplo, por medio de disgregación, molido, descamación, tratamiento con calor, tratamiento con presión, tratamiento ultrasónico, tratamiento hidrotérmico, o tratamiento ácido o alcalino.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde al menos el 30% en peso de dicha biomasa, tal como al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, o al menos el 90% en peso de dicha biomasa, comprende hidratos de carbono y materia proteínacea originarios de semillas de soja opcionalmente desgrasa y/u opcionalmente descascarillada, semillas de colza opcionalmente desgrasadas, o mezclas de las mismas.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha biomasa comprende oligosacáridos y/o polisacáridos y opcionalmente además comprende aceites y grasas, por ejemplo, de semillas de plantas oleaginosas.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho producto de transformación sólido del sustrato de biomasa es un producto de la transformación de materia proteínacea, o de la transformación de hidratos de carbono, o de la transformación de materia proteínacea e hidratos de carbono originarios de legumbres, y/o cereales, y/o semillas de plantas oleaginosas.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho producto de transformación sólido del sustrato de biomasa es un producto de la transformación de materia proteínacea, o de la transformación de hidratos de carbono, o de la transformación de materia proteínacea e hidratos de carbono originarios de semillas de soja, guisante, altramuz, girasol, trigo, maíz, o colza.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el microorganismo vivo o la combinación de microorganismos vivos es uno o más microorganismos que pueden producir uno o más compuestos orgánicos, tal como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido láctico, y ácido succínico, de hidratos de carbono, y/o en donde el microorganismo vivo o la combinación de microorganismos vivos es uno o más microorganismos que pueden producir uno o más alcoholes, por ejemplo, etanol, de hidratos de carbono.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el microorganismo vivo o la combinación de microorganismos vivos es uno o más microorganismo(s) productor(es) de ácidos orgánicos.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el microorganismo vivo o la combinación de microorganismos vivos se selecciona de la siguiente lista de géneros:
- *Lactobacillus*

- *Lactococcus*
 - *Streptococcus*
 - *Pediococcus*
 - *Enterococcus*
 - 5 • *Leuconostoc*
 - *Weisella*
 - *Bifidobacterium*
 - *Bacillus*
 - 10 • *Brevibacillus*
 - *Propionibacterium*
 - *Clostridium*
 - *Trichoderma*
 - *Candida*
 - *Aspergillus*
- 15
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el microorganismo vivo o la combinación de microorganismos vivos se selecciona de cepas de *Lactobacillus*, y en donde la mezcla de incubación inicial se incuba a una temperatura de 15-50°C, o en donde el microorganismo vivo o la combinación de microorganismos vivos se selecciona de cepas de *Pediococcus*, y en donde la mezcla de incubación inicial se incuba a una temperatura de 15-50°C, o en donde el microorganismo vivo o la combinación de microorganismos vivos se selecciona de cepas de *Enterococcus*, y en donde la mezcla de incubación inicial se incuba a una temperatura de 15-50°C, o en donde el microorganismo vivo o la combinación de microorganismos vivos se selecciona de cepas de *Lactococcus*, y en donde la mezcla de incubación inicial se incuba a una temperatura de 15-50°C, o en donde el microorganismo vivo o la combinación de microorganismos vivos se selecciona de cepas de *Streptococcus*, y en donde la mezcla de incubación inicial se incuba a una temperatura de 15-50°C, o en donde el microorganismo vivo o la combinación de microorganismos vivos se selecciona de cepas de *Weisella*, y en donde la mezcla de incubación inicial se incuba a una temperatura de 15-50°C, o en donde el microorganismo vivo o la combinación de microorganismos vivos se selecciona de cepas de *Bacillus*, y en donde la mezcla de incubación inicial se incuba a una temperatura de 20-60°C, o en donde el microorganismo vivo o la combinación de microorganismos vivos se selecciona de cepas de *Bifidobacterium*, y en donde la mezcla de incubación inicial se incuba a una temperatura de 20-45°C.
- 20
- 25
- 30
- 35
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha mezcla de incubación inicial se incuba durante 2 a 180 horas, tal como de 5 a 150 horas, de 7 a 120 horas, de 10 a 80 horas, de 20 a 60 horas, o de 28 a 48 horas.
- 40
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se añade agua a dicho sustrato de biomasa en una cantidad que proporciona una mezcla de incubación inicial que tiene una proporción de densidad aparente húmeda respecto a densidad aparente seca desde 0,65 a 1,40, tal como 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,00, 1,10, 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, o 1,35.
- 45
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el contenido de agua en dicha mezcla de incubación inicial es desde el 35% al 70% en peso, tal como el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, o 65%.
- 50
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho microorganismo vivo o combinación de microorganismos vivos se usa en una cantidad de 10^3 a 10^{11} UFC (unidades formadoras de colonias) por g de dicho sustrato de biomasa, tal como 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o 10^{10} UFC/g de sustrato de biomasa.
- 55
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde una o más ayudas de procesamiento seleccionadas de enzimas, componentes vegetales, y agentes de procesamiento orgánicos e inorgánicos, tal como α -galactosidasa, se añaden al sustrato de biomasa y/o a la mezcla de incubación inicial.
- 60
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde una preparación de α -galactosidasa se añade al sustrato de biomasa y/o a la mezcla de incubación inicial en una cantidad de desde 0,05 a 50 unidades de α -galactosidasa por g de materia seca de sustrato de biomasa, tal como desde 0,5 a 25 unidades de α -galactosidasa por g de materia seca de sustrato de biomasa, por ejemplo, desde 1 a 10, desde 2 a 8, desde 3 a 6, o desde 4 a 5 unidades de α -galactosidasa por g de materia seca de sustrato de biomasa.
- 65
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende que el tanque de incubación no agitado vertical sea cerrado.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha incubación se lleva a cabo en condiciones anaerobias.

ES 3 019 569 T3

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho tanque de incubación no agitado es de un tipo vertical, alargado cilíndrico o poliédrico, opcionalmente en donde el área en la parte superior de dicho tanque de incubación no agitado es menor que el área en la parte inferior, es decir, el tanque es de forma cónica.

5

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho tanque de incubación no agitado tiene esterilla aislante o una camisa térmica con hoyuelos para controlar la temperatura en el tanque, opcionalmente en donde el grado de llenado de dicho tanque de incubación se mantiene constante.