



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 295 551**

51 Int. Cl.:
A23K 1/18 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03702762 .0**
86 Fecha de presentación : **12.02.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1476029**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2004**

54 Título: **Producto sometido a autólisis bacteriológica.**

30 Prioridad: **12.02.2002 GB 0203307**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73 Titular/es: **StatoilHydro ASA**
4035 Stavanger, NO

72 Inventor/es: **Moen, Einar;**
Eriksen, Henrik y
Larsen, Jan

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 295 551 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

Producto sometido a autólisis bacteriológica.

5 El invento se refiere a un procedimiento para la producción de un comestible o componente de comestible, por ejemplo un nutriente o agente de mejora del sabor agradable, desde una biomasa bacteriana, en particular de un cultivo bacteriana que comprende una bacteria metanotrófica. Este producto encuentra uso particular como nutriente o como un agente de mejora del gusto, tanto en comida animal como humana como una sustitución de derivados tradicionales de levadura.

10 Recientemente, se ha dirigido mucha atención hacia el desarrollo de nuevas fuentes de proteínas que pueden ser incorporadas en comidas para consumo humano y/o animal. Se han propuesto varios materiales que contienen tales como homogeneización y/o separación, antes de usar. El documento WO 01/60974, por ejemplo, describe la producción de un derivado homogeneizado de una biomasa bacteriana que tiene excelentes propiedades funcionales y que puede ser usada en la preparación de varios productos alimenticios, por ejemplo como un agente geloso o emulsor. 15 contienen proteínas (a las que también se hace referencia en esta memoria como “proteínas unicelulares”) tal como hongos, levaduras y bacteria.

Los materiales de proteínas unicelulares pueden ser usados directamente en comidas, por ejemplo como un producto de secado por pulverización, o la biomasa puede ser procesada adicionalmente, por ejemplo usando técnicas tales como homogeneización y/o separación, antes de usar. El documento WO 01/60974, por ejemplo, describe la producción de un derivado homogeneizado de una biomasa bacteriana que tiene excelentes propiedades funcionales y que puede ser usada en la preparación de varios productos alimenticios, por ejemplo como un agente geloso o emulsor. Larsen y otros (Appl. Microbiol. Biotechnol. (1996) 45:137-140) describe un método para reducir el contenido de ácido nucleico de la bacteria metanotrófica *Methylococcus Capsulatus* (Baño) para encontrar los estándares de seguridad 25 requeridos para el consumo humano.

En la actualidad, las proteínas unicelulares más ampliamente usadas son las derivadas de hongos o levadura. La levadura, por ejemplo, se conoce bien para usar en la fabricación de cerveza, fabricación de vino e industrias de cocción. También se conocen varios procedimientos derivados de levadura para usar en la preparación de comestibles. 30 Por ejemplo, la autólisis de levadura da lugar a una variedad de componentes celulares conocidos para el uso como condimentos o aderezos en productos alimenticios, por ejemplo en la preparación de compotas, salsas, etc. Sin embargo, generalmente se requieren relativamente grandes cantidades de productos sometidos a autólisis de levadura para obtener los efectos deseados de mejora de sabor. Además de esto, la autólisis de levadura es generalmente lenta y puede durar varios días para conseguir un grado adecuado de metabolización. Aditivos que actúan como iniciadores o estimuladores de autólisis, por ejemplo agentes de tior, son por tanto requeridos generalmente para acelerar el proceso de autólisis. Esto aumenta el coste de la producción comercial de productos sometidos a autólisis de levadura. 35

Existe la continua necesidad de materiales alternativos que sean capaces de aumentar el sabor agradable de productos alimenticios humanos y animales, especialmente materiales que puedan ser producidos en grandes cantidades y a coste relativamente bajo. Existe una necesidad particular de nuevos materiales que puedan actuar como potenciadores del sabor. 40

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que la autólisis de una biomasa que comprende una bacteria metanotrófica y una bacteria heterotrófica, o un derivado de ellas (por ejemplo un derivado homogeneizado), tiene el efecto de producir componentes efectivos de mejora del sabor agradable, que también son útiles como nutrientes, es decir comestibles o componentes de alimentos. 45

Así, de acuerdo con un aspecto, el presente invento proporciona un proceso para producir un comestible o componente de comestible, por ejemplo un agente de mejora de sabor agradable, comprendiendo dicho método someter un cultivo que comprende una bacteria metanotrófica y una bacteria heterotrófica, o un derivado de ellas (por ejemplo un derivado homogeneizado) a autólisis. Los productos sometidos a autólisis producidos por este proceso forman un aspecto adicional del invento. 50

El producto sometido a autólisis producido de acuerdo con el invento puede ser usado típicamente como un comestible o componente de comestible para peces o crustáceos, por ejemplo como se describe en el documento PCT/GB02/03795 publicado como WO 03/15534. Igualmente el producto sometido a autólisis puede ser usado ventajosamente como un potenciador de sabor para comida de mascotas, especialmente para comida de perros, por ejemplo como se describe en la Solicitud de Patente Británica número 0203907.1 publicada como GB2385767. 55

Especialmente el producto sometido a autólisis del invento se usa preferiblemente como un ingrediente para comida de peces formado por extrusión en forma de píldoras. Las píldoras de comida de peces también contendrán típicamente proteínas y lípidos, por ejemplo harina de pescado y aceite de plantas y/o peces, además de una pequeña cantidad de carbohidratos, por ejemplo almidón derivado de plantas. 60

Tal como se usa en esta memoria, el término “autólisis” está destinado a abarcar un proceso en el que encima endógenas contenidas en una celda, tal como encima nucleasas y proteasas, digieren los componentes de la celda. Este proceso de “auto-digestión” da lugar a la producción de varios productos de degradación de la celda que puede incluir péptidos, aminoácidos, nucleótidos, fosfolípidos (compuestos grasos), ácidos grasos, etc. 65

ES 2 295 551 T3

Como se usa en esta memoria, el término “buen sabor” incluye todas propiedades de un producto de comida que puede ser percibido por un humano o animal. Tales propiedades incluyen no solo aroma, sino también gusto y textura. El término “buen sabor” también está considerado para abarcar otras propiedades de un producto alimenticio, por ejemplo digestibilidad. El término “agente de mejora del buen sabor” es considerado para abarcar materiales que bien poseen las propiedades deseadas de buen sabor o que, cuando están presentes en un producto alimenticio, son efectivos para mejorar el buen sabor (por ejemplo el gusto) u otros componentes de la comida.

Tal y como se usa en esta memoria el término “derivado” cuando se usa con relación a un material de proteína unicelular, por ejemplo un cultivo microbiano, incluye cualquier producto que pueda ser derivado de tal material usando una técnica o técnicas de procesamiento aguas abajo (por ejemplo una serie de técnicas) conocidas en la técnica, tal como separación de un material de proteína unicelular desde un medio o líquido de fermentación por métodos de centrifugación y/o ultra-filtración. Un derivado preferido para usar en el proceso descrito en esta memoria es un derivado homogeneizado del material de proteína unicelular en el que las celdas son quebrantadas o desintegradas, por ejemplo como resultado de quebrantación mecánica, por lo tanto para liberar los contenidos de la celda. Tales materiales homogeneizados consistirán generalmente de una suspensión acuosa de proteína viscosa que contiene tanto componentes celulares particulares como solubles.

En el proceso del invento la autólisis será realizado generalmente por incubación del cultivo bacterial bajo condiciones controladas cuidadosamente. Condiciones adecuadas de incubación capaces de iniciar actividad de la encima endógena y que así producen un producto sometido a autólisis pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la técnica. La autólisis es realizada preferiblemente en ausencia de cualquier estimulador o iniciador de autólisis.

Las condiciones de temperatura serán tales que la autólisis sea optimizada sin no activar las encimas endógenas contenidas dentro de las celdas. Típicamente, la temperatura para autólisis estará en el intervalo de 25 a 58°C, preferiblemente de 40 a 55°C, particularmente de forma preferida de 45 a 55°C, especialmente de 50 a 55°C. Se prefieren temperaturas hacia el extremo superior de estos intervalos, por ejemplo aproximadamente 55°C. Si se emplean temperaturas inferiores (por ejemplo 20°C o menos) la autólisis ocurre muy despacio. Cuando se usa la bacteria *Methylococcus Capsulatus* la temperatura de incubación preferiblemente no debe exceder aproximadamente 58°C. A temperaturas superiores a esta, puede ocurrir la no activación de las encimas endógenas contenidas en las celdas (por ejemplo proteasas y peptidasas).

Un intervalo adecuado de PH para autólisis puede recaer en el intervalo de 6,2 a 8,5, preferiblemente de 7,0 a 8,0, particularmente de forma preferida de 7,0 a 7,5. En un pH por debajo de aproximadamente 5,5 la autólisis no puede suceder. Se prefiere especialmente un pH de aproximadamente 7,0. La naturaleza, cantidad y temporización de la adición de cualquier base requerida para mantener el pH de la biomasa dentro de los límites deseados durante la autólisis puede ser determinada fácilmente por los expertos en la técnica. Bases adecuadas para la regulación del pH incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, etc.

El producto sometido a autólisis puede ser producido en un proceso continuo o por lotes. Preferiblemente será producido continuamente. Cuando se produce por lotes, el pH de la biomasa puede disminuir rápidamente durante las etapas iniciales de la reacción, por ejemplo desde 30 minutos hasta una hora después del inicio del proceso de incubación. Esto se cree que es debido a la rotura de las uniones péptidas. Durante este periodo la cantidad de base requerida para mantener el pH dentro de los límites deseados puede, por tanto, ser necesario aumentarla. Después de este tiempo, la cantidad de base requerida generalmente disminuirá. El pH puede ser regulado durante la autólisis usando métodos estándar conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen la supervisión continuamente el pH por volumetría en combinación con la adición apropiada de ácido/base.

El tiempo de reacción para autólisis se encuentra típicamente en el intervalo de 30 minutos a 24 horas, por ejemplo de 1 a 5 horas. Un tiempo de reacción preferido es aproximadamente 4 horas. En general, la producción de producto sometido a autólisis aumenta con el tiempo de reacción. El periodo de incubación puede ser seleccionado por tanto de acuerdo a la producción deseada de producto sometido a autólisis.

El proceso de autólisis será realizado generalmente en un reactor de depósito agitado o reactor de flujo tapado.

El proceso de autólisis descrito en esta memoria se espera que produzca un producto que comprende de 40 a 75% en peso, por ejemplo aproximadamente un 50% en peso, de material insoluble (por ejemplo comprender fragmentos de pared de celda, etc) y del 25 al 60% en peso, por ejemplo alrededor del 50% en peso, de material soluble (al que en esta memoria se hace referencia también como la “fracción soluble”) que comprenderá típicamente aminoácidos libres (especialmente ácido glutamínico), peptidas y nucleotidos (principalmente 3'-nucleotidos).

La biomasa bacterial para usar en el proceso del invento puede ser formada por crecimiento de las bacterias en un substrato o medio adecuado. La naturaleza exacta del medio de crecimiento usado para producir la biomasa no es crítica para el funcionamiento del invento y se puede usar una variedad de substratos adecuados.

Convenientemente, el material unicelular para usar en el proceso del invento puede ser producido por un proceso de fermentación en el que oxígeno y un substrato adecuado tal como un hidrocarbano líquido o gaseoso, un alcohol o carbohidrato, por ejemplo metano, metanol o gas natural, juntos con una solución mineral nutriente son introducidos en un reactor tubular que contiene el microorganismo o microorganismos. Varios de dichos procesos se conocen y

ES 2 295 551 T3

describen en la técnica, por ejemplo en los documentos WO 01/60974, DK-B-170824, EP-A-418187 y EP-A-306466. Se prefiere particularmente que la biomasa que es sometida a autólisis de acuerdo con el invento sea producida como se describe en el documento PCT/GB02/003798 publicado como WO 03/016460.

5 Particularmente preferido para usar en el invento son materiales de proteínas unicelulares derivados de fermentación en fracciones de hidrocarburos o en gas natural. Se prefieren especialmente proteínas unicelulares derivadas de la fermentación de gas natural. Como la concentración de microorganismos aumenta dentro del fermentador, una parte del contenido del reactor o caldo es extraída y los microorganismos puede ser separados por técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo centrifugación y/o ultra-filtración. Convenientemente, en dicho proceso de fermentación,
10 el caldo será extraído continuamente del fermentador y tendrá una concentración de celda entre 1 y 5% en peso, por ejemplo aproximadamente 3% en peso.

Materiales unicelulares producidos de dos o más microorganismos son tratados de acuerdo con el proceso del invento. Aunque estos pueden ser producidos en los mismos fermentadores o separados, generalmente estos serán
15 producidos en el mismo fermentador bajo idénticas condiciones de fermentación. Materiales producidos por procesos de fermentación separados pueden ser mezclados juntos antes de la autólisis de acuerdo con el proceso del invento.

Bacterias preferidas para usar en el invento incluyen *Methylococcus capsulatus* (Bath), una bacteria termófila originalmente aislada de fuentes termales en Bath, Inglaterra y es depositada como NCIMB 11132 en las Colecciones Nacionales de Bacterias de Marina e Industriales, Aberdeen, Escocia. *M. Capsulatus* (Bath) tiene un crecimiento óptimo a aproximadamente 45°C, aunque el crecimiento puede ocurrir entre 37°C y 52°C. Es una celda esférica no-móvil, gram-negativa, que ocurre usualmente en parejas. Las membranas intracelulares están dispuestas en paquetes o discos vesiculares característicos de tipo I metanótrofos. *M. Capsulatus* (Bath) es generalmente un organismo muy estable sin plásmidos conocidos. Puede utilizar metano o metanol para el crecimiento y amoníaco, nitrato o nitrógeno
25 molecular como fuente de nitrógeno para la síntesis proteínica.

Un ejemplo de un proceso de fermentación que usa gas natural como la única fuente de carbono y energía es el descrito en el documento EP-A-306466 (Dansk Bioprotein). Este proceso está basado en la fermentación continua de las bacterias metanotróficas *M. Capsulatus* crecida en metano. Se usa aire u oxígeno puro para la oxigenación y se
30 usa amoníaco como fuente de nitrógeno. Además de estos sustratos, el cultivo bacteriano requerirá típicamente agua, fosfato, (por ejemplo como ácido fosfórico) y varios minerales que pueden incluir magnesio, calcio, potasio, hierro, cobre, zinc, manganeso, níquel, cobalto y molibdeno, usados típicamente como sulfatos, cloruros o nitratos. Todos los minerales usados en la producción del material unicelular debe ser de calidad de grado alimenticio.

El gas natural consiste principalmente en metano, aunque su composición variará para diferentes campos de gas. Típicamente, se espera que el gas natural contenga aproximadamente el 90% de metano, aproximadamente el 5% de etano, aproximadamente el 2% de propano y algunos hidrocarburos mayores. Durante la fermentación del gas natural, el metano es oxidado por bacterias metanotróficas para dar biomasa y dióxido de carbono. El metanol, formaldehído y ácido fórmico son intermediarios metabólicos. El formaldehído y en cierta medida dióxido de carbono son asimilados
40 en la biomasa. Sin embargo, las bacterias metanotróficas no pueden usar sustratos que comprendan uniones carbono-carbono para el crecimiento y los componentes restantes del gas natural, por ejemplo etano, propano y en cierta medida hidrocarburos mayores, son oxidados por las bacterias metanotróficas para producir los ácidos carboxílicos correspondientes (por ejemplo el etano es oxidado en ácido acético). Tales productos pueden ser inhibitorios para las bacterias metanotróficas y por tanto es importante que sus concentraciones permanezcan bajas, preferiblemente por debajo de 50 mg/l, durante la producción de la biomasa. Una solución a este problema es el uso combinado de una o
45 más bacterias heterotróficas que son capaces de utilizar metabólicos producidos por las bacterias metanotróficas. Tales bacterias también son capaces de utilizar material orgánico liberado en el caldo de fermentación por la celdalísis. Esto es importante para evitar formación de espuma y también sirve para minimizar el riesgo de que el cultivo se contamine con bacterias no deseadas. Una combinación de bacterias metanotróficas y heterotróficas da lugar a un cultivo estable
50 y altamente productivo.

Bacterias heterotróficas adecuadas para usar en el invento incluyen DB3, variedad NCIMB 13287 (*Ralstonia* sp. Conocida formalmente como *Alcaligenes acidovorans*), DB5, variedad NCIMB 13289 (*Brevibacillus agri* conocida formalmente como *Baillus firmus*) y DB4, variedad NCIMB 13288 (*Aneurinibacillus* sp. Conocida formalmente como
55 *Bacillus brevis*) que cada una tiene crecimiento óptimo a una temperatura de aproximadamente 45°C.

DB3 es una gram-negativa, aeróbica, de vástago móvil perteneciente al género *Ralstonia* que puede usar etanol, acetato, propionato y butirato para el crecimiento. DB4 es una gram-positiva, formadora de endospora, vástago aeróbico perteneciente al género *Aneurinibacillus* que puede utilizar acetato, D-fructosa, D-mannosa, ribose y D-tagatose.
60 DB5 es una gram-positiva, formadora de endospora, móvil, vástago aeróbico del género *Brevibacillus* que puede utilizar acetato, N-acetil-glucosamina, citrato, gluconato, glucosa-D, glicerol y manitol.

Particularmente de forma preferida, el material de proteína unicelular para usar en el invento será un cultivo microbiano que consiste en bacterias metanotróficas opcionalmente en combinación con una o más especies de bacterias heterotróficas, especialmente de forma preferida una combinación de bacterias metanotróficas y heterotróficas. Tal como se usa en esta memoria, el término "metanotrófico" abarca cualquier bacteria que utilice metano, metanol o formaldehído para el crecimiento. El término "heterotrófico" se usa para bacterias que utilizan sustratos orgánicos distintos del metano, metanol o formaldehído para el crecimiento.

ES 2 295 551 T3

Especialmente preferido para usar en el invento es un cultivo microbiano que comprenda una combinación de la bacteria metanotrófica *Methylococcus capsulatus* (Bath) (variedad NCIMB 11132), y las bacterias heterotróficas DB3 (variedad NCIMB 13287) y DB5 (variedad NCIMB 13289), opcionalmente en combinación con DB4 (variedad NCIMB 13288). El papel de DB3 es utilizar acetato y propionato producidos por *M. Capsulatus* (Bath) desde etano y propano en el gas natural. DB3 puede sumar hasta el 10%, por ejemplo aproximadamente 6 a 8%, de la cuenta total de celdas de la biomasa resultante. El papel de DB4 y DB5 es utilizar productos en disolución y metabólicos en el medio. Típicamente, DB4 y DB5 contarán cada uno menos del 1% de la cuenta de celdas durante la fermentación continua.

Durante la producción de material unicelular, el pH de la mezcla en fermentación será regulado generalmente a entre aproximadamente 6 y 7, por ejemplo a $6,5 \pm 0,3$. Ácidos y bases adecuados para la regulación de pH pueden ser seleccionados fácilmente por los expertos en la técnica. Particularmente adecuados para usar con relación a esto son hidróxidos de sodio y ácido sulfúrico. Durante la fermentación la temperatura dentro del fermentador debería ser mantenida preferiblemente dentro del intervalo de 40°C a 50°C, más preferiblemente $45^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Fermentadores adecuados para usar al preparar el material unicelular son los de tipo en bucle, tales como los descritos en los documentos DK 1404/92, EP-A-418187, EP-A-306466 y PCT/GB02/003798, o reactores de puente aéreo. Un fermentador de tipo de bucle que tenga mezcladores estáticos da lugar a una alta utilización de los gases (por ejemplo hasta el 95%) debido a las características de flujo tapado del fermentador. Se introducen gases en varias posiciones a lo largo del bucle y permanecen en contacto con el líquido hasta que son separados en la zona de cabecera del reactor. La fermentación continua puede ser conseguida usando el 2-3% de biomasa (en base al peso en seco) y una velocidad de dilución de $0,02$ y $0,50 \text{ h}^{-1}$, por ejemplo $0,05$ - $0,25 \text{ h}^{-1}$.

Se pueden usar otros fermentadores para preparar el material unicelular y estos incluyen fermentadores de depósito tubular agitado.

Idealmente, la biomasa producida para la fermentación de gas natural comprenderá de 60 hasta 80% en peso de proteína cruda; del 5 al 20% en peso de grasa cruda; del 3 al 10% en peso de ceniza; del 3 al 15% en peso de ácidos nucleicos (ARN y ADN); de 10 a 30 g/Kg de fósforo; hasta 350 mg/Kg de hierro; y hasta 120 mg/Kg de cobre. Particularmente de forma preferida, la biomasa comprenderá de 68 a 73%, por ejemplo aproximadamente el 70% en peso de proteína cruda, del 9 al 11%, por ejemplo aproximadamente 10% en peso de grasa cruda; del 5 al 10%, por ejemplo aproximadamente el 7% en peso de ceniza; del 8 al 12%, por ejemplo aproximadamente el 10% en peso de ácidos nucleicos (ARN y ADN); de 10 a 25 g/Kg de fósforo; hasta 310 mg/Kg de hierro; y hasta 110 mg/Kg de cobre. El perfil de aminoácido del contenido de proteína debe ser nutricionalmente favorable con una alta proporción de los aminoácidos más importantes cisteína, metionina, treonina, lisina, triptofan y arginina. Típicamente estas pueden estar presentes en cantidades de aproximadamente 0,7%, 3,1%, 5,2%, 7,2%, 2,5% y 6,9%, respectivamente (expresado como un porcentaje de la cantidad total de aminoácidos). Generalmente los ácidos grasos comprenderán principalmente el ácido palmítico saturado (aproximadamente 50%) y el ácido palmitoleico monoinsaturado (aproximadamente 36%). El contenido mineral del producto comprenderá típicamente altas cantidades de fósforo (aproximadamente el 1,5% en peso), potasio (aproximadamente el 0,8% en peso) y magnesio (aproximadamente el 0,2% en peso).

Típicamente, la biomasa resultante será producida en forma de una suspensión o pasta acuosa que fluye. Generalmente esto consistirá esencialmente de material de celda completa, aunque también puede haber presente una parte de material de celda quebrantada.

Siguiendo a la producción de biomasa, esta es concentrada generalmente del medio de fermentación, por ejemplo por métodos convencionales de centrifugación y/o filtración, por ejemplo ultra-filtración. La concentración de la biomasa puede ser efectuada solo por centrifugación. Durante la centrifugación el contenido de materia seca de la biomasa es aumentado típicamente hasta aproximadamente 5 a 18% en peso, preferiblemente de 8 a 15%, por ejemplo aproximadamente 14% en peso. Si es necesario, o ciertamente deseable, se pueden usar métodos de filtración (por ejemplo ultra-filtración) para aumentar adicionalmente los contenidos sólidos de la biomasa. La ultra-filtración, que puede ser efectuada a una temperatura entre 40 y 50°C, por ejemplo entre 42 y 46°C, concentra además la biomasa en un producto que contiene del 10 al 30%, preferiblemente del 15 al 25%, por ejemplo del 18 al 22% en peso de material unicelular. La exclusión de tamaño usado durante la ultra-filtración estará generalmente en el intervalo de aproximadamente 100.000 Dalton. La biomasa resultante será con forma de suspensión acuosa y tendrá típicamente un contenido sólido en el intervalo de 10 a 30%, preferiblemente 15 a 25%, por ejemplo aproximadamente 20% en peso.

Antes de la autólisis la biomasa puede ser sometida opcionalmente a un proceso de homogeneización en el que las paredes de celdas microbianas son rotas liberando por tanto una parte de material de proteína de dentro de la estructura de celda. Si es necesario, la homogeneización resultante puede ser sometida a métodos de filtración adicional (por ejemplo ultra-filtración).

La homogeneización da lugar a la producción de un producto que comprende material de celda quebrada y esencialmente consiste en él preferiblemente. Por ejemplo, el material de celda quebrada estará presente en una cantidad de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90% en peso. Típicamente, el producto será una suspensión de proteína relativamente viscosa que contiene componentes celulares en partículas y solubles.

ES 2 295 551 T3

La etapa de homogeneización se cree que tiene poco efecto, si tiene algo, en las características de sabor (es decir el gusto) del producto final, pero puede servir para aumentar la producción de materia seca en la fracción soluble del material sometido a autólisis. Por ejemplo, éste puede aumentar el contenido de materia seca de la fracción soluble tanto como mucho un 20 a 25%. El alcance hasta el que es aumentado del contenido de materia seca depende también de la duración del proceso de autólisis. La autólisis de un material homogeneizado durante un periodo de 24 horas se puede esperar, por ejemplo, que de lugar a un producto en el que la producción de la fracción soluble es hasta el 60% en peso. En ausencia de una etapa de homogeneización antes de la autólisis, la producción de la fracción soluble puede esperarse que sea de aproximadamente el 50% en peso.

La ruptura o desintegración de las celdas puede conseguirse, por ejemplo, por un proceso mecánico tal como por una secuencia de presurizar y despresurizar el material microbiano. Aunque la homogeneización puede ser efectuada por cualquier medio convencional, preferiblemente se realiza por un proceso de homogeneización a alta presión en el que la biomasa es sometida a un cambio de presión, preferiblemente a una caída de presión, capaz de efectuar desintegración de celda. Típicamente, el material puede ser sometido a una caída de presión en el intervalo de desde 40 MPa a 120 MPa (400 a 1200 bar), más preferiblemente de 50 MPa a 110 MPa (500 a 1100 bar), por ejemplo desde 60 MPa hasta 100 MPa (600 a 1000 bar). Se prefiere especialmente una caída de presión de aproximadamente 1000 bar. Generalmente, la caída de presión será instantánea. Típicamente el proceso será efectuado en un homogeneizador industrial, por ejemplo disponible de APV Rannie, Dinamarca, bajo condiciones de temperatura controlada, preferiblemente a una temperatura de menos de 58°C, preferiblemente de forma particular de 25 a 50°C, por ejemplo de 25 a 35°C. Un proceso de homogeneización adecuado para usar en el invento se describe, por ejemplo, en el documento WO 01/60974 (para Norferm DA).

Se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica para efectuar la homogeneización de acuerdo con el invento. Por ejemplo, la homogeneización puede ser efectuada sometiendo el material unicelular a fuerzas de cizalla capaces de quebrar las paredes de las celdas. Esto puede conseguirse usando un mezclador en el que el material se hace pasar a través de una zona en la que las fuerzas de cizalla son ejercidas tras ellas por superficies que se mueven una con relación a otra. Generalmente, las fuerzas de cizalla serán creadas entre una superficie que se mueve, por ejemplo una superficie giratoria, y una superficie estática, es decir como en un rotor-estator tal como se describe en el documento WO99/08782.

Otras técnicas conocidas para usar en métodos de desintegración mecánica de celda, por ejemplo granallado con bolas a alta velocidad, pueden ser usados para efectuar la homogeneización. También se pueden usar métodos de ultrasonidos.

En un aspecto preferido el invento proporciona un proceso para la producción de productos alimenticios o componentes de productos alimenticios, por ejemplo un material de mejora del sabor agradable (por ejemplo agente de mejora del gusto), comprendiendo dicho proceso las etapas siguientes:

- (a) preparar una suspensión acuosa de un cultivo microbiano que comprende una bacteria metanotrófica en combinación con una o más bacterias heterotrófica;
- (b) opcionalmente homogeneizar la suspensión, sometiendo preferiblemente la solución a una caída de presión capaz de efectuar desintegración de celda, por ejemplo una caída de presión en el intervalo de 40 Mpa a 120 Mpa, preferiblemente de 50 MPa a 110 MPa, especialmente de 60 MPa a 100 Mpa, produciendo por tanto un producto homogeneizado; y
- (c) someter el producto resultante a autólisis.

Siguiendo a la autólisis el producto sometido a autólisis es preferiblemente calentado, típicamente hasta una temperatura en el intervalo de desde 58 a 75°C, preferiblemente 65 a 69°C, por ejemplo 67°C.

El producto sometido a autólisis comprende una mezcla de material celular soluble e insoluble. Mientras esto puede ser usado directamente (es decir sin procesamiento adicional) como un componente o precursor en productos alimenticios (por ejemplo como un componente de condimento o mejora de sabor), es preferible separar el material celular insoluble. Esto puede ser efectuado por procesos de separación conocidos en la técnica, preferiblemente por filtración, por ejemplo ultra-filtración. La ultra-filtración, que puede ser efectuada a una temperatura de entre 40 y 75°C, por ejemplo entre 50 y 70°C, es efectiva para filtrar aminoácidos, péptidos u otras moléculas pequeñas tales como nucleótidos que son capaces de atravesar la membrana del filtro. Es esta fracción soluble o material filtrado que será usada principalmente en la producción de productos alimenticios, por ejemplo como un agente de mejora del buen sabor. La exclusión de tamaño usada durante la ultra-filtración estará generalmente en el intervalo de aproximadamente 20 kD. Sin embargo, pueden usarse filtros que tienen un corte MW en el intervalo de desde 10 a 100 kD. Para mejorar la producción de producto, el producto sometido a autólisis puede ser lavado repetidamente (por ejemplo hasta 5 veces, por ejemplo hasta 3 veces) con agua seguido por etapas adicionales de ultra-filtración.

Siguiendo a la separación del material sometido a autólisis los contenidos sólidos de la fracción soluble puede esperarse que esté aproximadamente del 3 al 8% en peso. El contenido de ácido glutámico y aminoácidos libres (en una base de materia seca) puede esperarse que esté en el intervalo de aproximadamente 5 a 11% y 40 al 50% respectivamente.

ES 2 295 551 T3

Si se desea, se puede conseguir una reducción adicional del contenido en agua por métodos de evaporación conocidos en la técnica. Por ejemplo, esto puede ser usado para producir un producto que tenga un contenido sólido en el intervalo de 20 al 70% en peso, por ejemplo aproximadamente el 30% en peso. Métodos de evaporación adecuados incluyen evaporación por caída y elevación en película, evaporación por caída en película y evaporación instantáneas. Si es necesario, la etapa de evaporación puede ser repetida varias veces, por ejemplo tres veces. En el caso de problemas por espumado durante la evaporación, se puede añadir un agente antiespumoso tal como Kirnol V39360 (disponible de Grünau Illestissen GMBH, Alemania). La cantidad de agente espumoso requerido para evitar la formación de espuma puede ser determinado fácilmente por los expertos en la técnica. Cantidades apropiadas de agente espumoso puede situarse en el intervalo de 0,01 a 0,05%, por ejemplo aproximadamente 0,02% en peso.

Inmediatamente siguiendo a la evaporación, el producto es preferiblemente enfriado, por ejemplo hasta una temperatura en el intervalo de 5 a 20°C, por ejemplo hasta una temperatura de aproximadamente 15°C.

Típicamente, el producto será procesado adicionalmente de acuerdo con técnicas de secado por pulverización bien conocidas en la técnica. Puede ser usado cualquier secador por pulverización convencional con o sin unidades de depósitos fluidos, por ejemplo el secador por pulverización Tipo 3-SPD disponible de APV Anhydro, Dinamarca. Preferiblemente la temperatura de entrada para el aire en el secador de pulverización puede ser aproximadamente 140 a 250°C y la temperatura de salida puede ser aproximadamente de 80 a 95°C. Preferiblemente el producto resultante tendrá un contenido en agua de aproximadamente 1 a 10% en peso, por ejemplo de 2 a 7% en peso.

El producto resultante es muy higroscópico y debe por tanto ser almacenado en un ambiente sin humedad (por ejemplo en bolsas secas) a temperaturas bajas.

Como resultado del proceso de autólisis descrito en esta memoria los productos producidos de acuerdo con el invento son ricos en aminoácidos libres, especialmente ácido glutámico y péptidos. Tales productos son generalmente de color pálido, de gusto neutro y altamente solubles en agua (por ejemplo totalmente solubles para producir una solución del 1% en agua caliente). Estos son especialmente útiles como un componente o precursor en productos alimenticios, particularmente cuando se usan como agente condimento o potenciador del buen sabor, por ejemplo para mejorar el sabor de alimentos animales o humanos (por ejemplo comida para animales).

Visto desde un aspecto adicional el invento proporciona un producto sometido a autólisis derivado de una biomasa que comprende una bacteria metanotrófica y una bacteria heterotrófica, o de un derivado de ellas (por ejemplo un derivado homogeneizado), teniendo dicho producto un contenido de aminoácido libre en el intervalo del 40 al 80%, por ejemplo del 50 al 60% en peso (en una base de materia seca). Un producto preferido de acuerdo con el invento es que tenga un contenido en ácido glutámico en el intervalo de 5 a 11%, por ejemplo del 8 al 10% en peso (en una base de materia seca).

Visto desde incluso un aspecto adicional el invento proporciona el uso de un material sometido a autólisis o derivado procesado de él como se describe en esta memoria, en o como un precursor para forraje, preferiblemente como un potenciador del buen sabor, por ejemplo como un componente de condimento.

Visto todavía desde incluso un aspecto adicional el invento proporciona un producto alimenticio que comprende un material sometido a autólisis o derivado procesado de él como se ha descrito en esta memoria.

Cuando se usa como un potenciador del buen sabor en productos alimenticios, el material sometido a autólisis o material sometido a autólisis procesado, se usará en una cantidad efectiva para su gusto y/u olor a observar por el consumidor. Especialmente de forma preferida, esto se empleará en una cantidad efectiva para mejorar el buen sabor de la comida. Típicamente, esto puede ser usado en una cantidad del 0,1 al 4% en peso, preferiblemente hasta el 2% en peso. La proporción exacta dependerá de varios factores, no solo de la naturaleza de la comida en la que se va a añadir el producto, la manera de aplicación o inclusión, etc. Niveles apropiados se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica.

El producto sometido a autólisis descrito en esta memoria puede ser usado como un sustituto de derivados tradicionales de levadura. Comidas en las que se puede añadir el producto incluyen tanto alimentos animales como humanos. Por ejemplo, este puede ser incorporado en los productos alimenticios para el consumo humano tales como sopas, caldos, aderezos, productos cárnicos tales como albóndigas, emulsiones tales como mayonesa, etc. El producto descrito en esta memoria encuentra uso particular como agente sazonador en alimentos de mascotas secos y húmedos. Por ejemplo, puede ser usado como aditivo en comida de perros.

Un subproducto del proceso descrito en esta memoria es el retentate (es decir la fracción insoluble) producido a continuación de la separación del material sometido a autólisis. Este producto comprende generalmente componentes tales como fragmentos de pared de celda y tiene un alto valor nutricional. Por ejemplo, este producto puede tener las siguientes características:

Contenido en agua (determinado de acuerdo a M101¹): 1-10% en peso, por ejemplo alrededor del 4%;

Contenido en ceniza (determinado de acuerdo con la Directiva de la Comisión EU número 162/67/EØF): 3-12% en peso, por ejemplo alrededor del 10% en peso;

ES 2 295 551 T3

Grasa cruda (determinada de acuerdo con la Directiva de la Comisión EU número 93/28/EØF): 10-20% en peso, por ejemplo alrededor del 15% en peso;

5 Proteínas crudas (determinada de acuerdo con la Directiva de la Comisión EU número 72/199/EØ): 40-60% en peso, por ejemplo alrededor del 54% en peso;

ARN (determinado de acuerdo a M105²); 4-10% en peso, por ejemplo alrededor del 6% en peso;

ADN (determinado de acuerdo a M105²); 2-5%, por ejemplo alrededor del 3% en peso;

10 Contenido total de aminoácido (determinado de acuerdo a M295³): 39-41% en peso;

15 Carbohidratos totales (determinados de acuerdo a M140⁴): hasta el 15% en peso; por ejemplo del 1 al 12% en peso, típicamente alrededor del 10% en peso; digestibilidad *In Vitro* (determinada de acuerdo a M150⁵): 65-85% de N, por ejemplo alrededor del 65% de N.

1: el agua en la muestra se evaporó a 105°C durante la noche. El contenido en agua se determinó pesando antes y después del secado.

20 2: véase el documento de Herbert y otros, Análisis Químico de celdas microbianas, Métodos Microbiol. 5B: 285-328, 1971.

25 3: véase el documento de Waters accQ. Tag Chemistry Package. Manual de instrucciones 052874TP, Revisión 1, y el de Wandelen y otros, revista científica de cromatografía A, 763, 11-22.

4. véase el documento de Herbert y otros, Análisis Químico de celdas Microbianas, Métodos Microbiol. 5B: 267-269, 1971.

30 5: véase el documento de Boisen, CAB internacional, p. 135-145, 1991.

Este subproducto puede ser usado en productos alimenticios, en particular como un aditivo nutricional para comida de animales. Esto también se ha encontrado que tiene buenas propiedades con efecto de emulsionar y por tanto también se encuentra uso como un agente emulsionante en productos alimenticios humanos.

35 El invento se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplo no limitativos y con referencia a las figuras que se acompañan, en las que:

La figura 1 ilustra esquemáticamente un aparato para usar al realizar un procedimiento de acuerdo con el invento;

40 La figura 2 muestra el contenido de materia seca, como una función del tiempo de incubación, en varios producto sometido a autólisis acordes con el invento a continuación de la ultra-filtración (MW punto de separación 20.000 D);

45 La figura 3 muestra el contenido en nitrógeno, como una función del tiempo de incubación, en varios productos sometidos a autólisis acordes con el invento;

La figura 4 muestra el contenido de MSG, como una función del tiempo de incubación, en varios productos sometido a autólisis acordes con el invento;

50 La figura 5 muestra el contenido de α -N, como una función del tiempo de incubación, en varios productos sometidos a autólisis acordes con el invento;

La figura 6 muestra el contenido en aminoácido libre de varios productos sometidos a autólisis acordes con el invento;

55 La figura 7 muestra el contenido en aminoácido libre como función del tiempo de incubación, en el producto sometido a autólisis acorde con el invento (Producto sometido a autólisis-3);

60 La figura 8 muestra esquemáticamente el transcurso del tiempo de un procedimiento de autólisis acorde con el invento;

La figura 9 es una gráfica del pH frente al tiempo;

La figura 10 es una gráfica del pH frente al tiempo;

65 La figura 11 es una gráfica de la viscosidad frente al tiempo; y

La figura 12 es una gráfica de la viscosidad frente al tiempo.

ES 2 295 551 T3

Ejemplo 1

Preparación de producto sometido a autólisis

5 Un cultivo microbiano que comprende *Methylococcus capsulatus* (Baño) (variedad NCIMB 11132), DB3 (variedad NCIMB 13287) y DB5 (variedad NCIMB 13289), es producido en un fermentador de tipo cíclico por fermentación aeróbica continua de gas natural en un medio de sales minerales/amonio (AMS) a 45°C, pH 6,5. el medio de AMS contiene lo siguiente por litro: 10 mg NH₃, 75 mg H₃PO₄·2H₂O, 380 mg MgSO₄·7H₂O, 100 mg CaCl₂·2H₂O, 200 mg K₂SO₄, 75 mg FeSO₄·7H₂O, 1,0 mg CuSO₄·5H₂O, 0,96 mg ZnSO₄·7H₂O, 120 µg CoCl₂·6H₂O, 48 µg MnCl₂·4H₂O,
10 36 g H₃BO₃, 24 µg NiCl₂·6H₂O y 1,20 g NaMoO₄·2H₂O.

El fermentador es rellenado con agua que ha sido precalentada a 125°C durante 10 segundos. La adición de diferentes nutrientes es regulada de acuerdo con su consumo. Con la acumulación gradual en el tiempo, la fermentación continua es accionada con 1-3% de biomasa (en una base de peso seco).

15 La biomasa está sometida a centrifugación en una centrifugadora continua industrial a 3600 rpm, seguido por una ultra-filtración usando membranas que tienen un tamaño de exclusión de 20.000 Dalton. El producto resultante, que contiene alrededor del 12-20% en peso de biomasa, es sometido después opcionalmente a homogeneización en un homogenizador industrial (caída de presión: 1000 bar (100 MPa); temperatura de entrada: 15°C) para producir una biomasa homogeneizada.

La suspensión de biomasa es calentada hasta la temperatura óptima de reacción de 55°C y el pH es ajustado a 7,0-7,5 con la adición de NaOH. El tiempo de incubación es 4 horas durante cuyo tiempo la temperatura del material es mantenido dentro del intervalo de 50 a 55°C y el pH es mantenido en el intervalo óptimo de 7,0 a 7,5.

25 Siguiendo a la incubación la biomasa es sometida a ultra-filtración a una temperatura en el intervalo de 50 a 70°C usando una membrana que tiene un corte de peso molecular de aproximadamente 20 kD. Si es necesario, se puede usar un lavado repetido de la biomasa con agua seguido de etapas adicionales de ultra-filtración para aumentar la producción deseada de material filtrado que contendrá aproximadamente 4,2% en peso de materia seca.

30 El material filtrado resultante es enfriado y almacenado en un recipiente obturado antes de un tratamiento a vapor.

La evaporación a una temperatura en el intervalo desde 60 a 70°C en la presencia de un agente anti-espumoso aumenta además el contenido sólido del material filtrado hasta aproximadamente el 35% en peso.

35

Ejemplo 2

Preparación y propiedades de producto sometido a autólisis

40

Método

Los productos sometidos a autólisis se produjeron de acuerdo al procedimiento siguiente:

- 45 1. Un cultivo microbiano (biomasa) se produce por un proceso de fermentación como se describe en el ejemplo 1. La biomasa recogida se concentró en una base sólida seca del 6-8% por centrifugación.
2. Homogeneización: caída de presión desde 1000 a 0 bar.
- 50 3. El material homogeneizado se somete a ultra-filtración.
4. La temperatura y pH son ajustados como en la tabla 1 (véase abajo).
5. Incubación durante 4 horas.
- 55 6. Después de la incubación, es separado 1,1 litro de material filtrado (20.000 MW de corte).
7. El material filtrado es esterilizado calentando a 90°C durante 10 minutos.
- 60 8. Después de la esterilización, el producto sometido a autólisis es enfriado y colocado en un refrigerador.
9. Filtración (máximo 20% sólidos secos).
- 65 10. El material concentrado es enfriado y secado por pulverización (temperatura entrada/salida: 200°C/90°C) y las muestras son marcadas como Producto sometido a autólisis 1 a 5.

ES 2 295 551 T3

TABLA 1

Parámetros de producción para producto sometido a autólisis 1-5

Parámetro	Producto sometido a autólisis 1	Producto sometido a autólisis 2	Producto sometido a autólisis 3	Producto sometido a autólisis 4	Producto sometido a autólisis 5*
Homogeneización	+	+	+	+	+
Temp. (°C)	45	45	55	55	45
PH	7	8	7	8	6,5-5,8
Tiempo de incubación (horas)	4	4	4	4	2,5
* Este es el residuo de la biomasa homogeneizada después de la filtración con un corte de MW de 20.000 D					

Durante la etapa de ultra-filtración (etapa 6), las propiedades del producto (es decir el elemento filtrado o permeado) son determinadas en varias etapas. Se toman 100 ml de material filtrado a los 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 3 horas a continuación del inicio de la incubación (para el material sometido a autólisis 5 las muestras solo son probadas hasta 1 hora). Las muestras de filtración son esterilizadas cada una como se describe en la etapa 7. Para cada muestra (además de las muestras de los productos finales, es decir después de 4 horas de incubación), el contenido de materia seca es medido y la muestra es secada por congelación. Las muestras secadas por congelación son analizadas en las siguientes propiedades:

Proteína, amino-Nitrógeno, MSG (ácido glutámico) y contenidos de aminoácidos libres.

Resultados y discusión

Ensayo de gusto

En un ensayo de gusto solo se encontraron mínimas diferencias de gusto entre los materiales sometidos a autólisis 1 a 4 con una pequeña preferencia expresada por el material sometido a autólisis 3. La intensidad de la "nota fermentada" fue comparable a levadura ligera estándar como la que se usa hoy en día. El gusto del material sometido a autólisis 5 fue desagradable.

Análisis químico

En la preparación de los materiales sometidos a autólisis 1-4, se tomaron muestras a ½, 1, 2, 3 y 4 horas para determinar como se desarrollan los productos en el tiempo.

La figura 2 muestra el aumento en el tiempo del contenido de materia seca de las varias muestras a continuación de la ultra-filtración (corte de MW de 20.000 D). Los resultados muestran que el proceso de autólisis progresa esencialmente de forma lineal cuando la temperatura de incubación está en el intervalo de 45 a 55°C y el pH se sitúa en el intervalo de 7 a 8. Después de ½ hora, aproximadamente el 30% de materia seca pasa el filtro, después de 2 horas aproximadamente el 40% y después de 4 horas aproximadamente el 48%. Experimentos anteriores habían mostrado que después de 24 horas de incubación aproximadamente el 55% de materia seca pasa el filtro. La figura 3 muestra que el contenido de hidrógeno (proteínas, péptidos y aminoácidos libres) en el producto es aproximadamente 11% en peso para tiempos de incubación entre 2 y 4 horas.

Después de 2 horas de incubación, el contenido de MSG (ácido glutámico) del material sometido a autólisis es esencialmente constante (véase la figura 4). Un contenido de ácido glutámico entre 8 y 9% en peso es particularmente favorable comparado con material sometido a autólisis de levadura convencional que típicamente tiene un contenido en MSG entre el 3 y el 7%.

La figura 5 muestra el grado de hidrólisis de proteína en los materiales sometidos a autólisis (α -N es una expresión del número de grupos de α -amino libres presentes en el producto). El grado de hidrólisis del producto es calculada así como: α -N x 100%N. Para cada material sometido a autólisis de acuerdo con el invento el grado de hidrólisis es aproximadamente el 60% que muestra que una gran proporción de producto consiste en aminoácidos libres. Esto es confirmado por el análisis de aminoácidos (véase la tabla 2) que muestra que el 50 al 60% del material sometido a autólisis está hecho de aminoácidos libres.

ES 2 295 551 T3

TABLA 2

Contenido de aminoácidos libres (en g/kg) en materiales sometidos a autólisis

5

De A-1 a A-5 se refiere a materiales sometidos a autólisis 1 a 5. A-3-½ es una muestra de A-3 extraído a la ½ hora.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Aminoácido	A-1	A-2	A-4	A-5	A-3-½	A-3-1	A-3-2	A-3-3	A-3-4
Ácido aspártico	3,6	4,5	4,0	1,9	3,7	4,3	4,2	4,5	4,0
Ácido glutámico	5,7	6,9	6,7	4,9	6,5	7,3	6,8	7,3	6,4
Serina	1,1	1,0	0,7	0,9	1,3	1,3	1,0	0,9	0,7
Asparagina	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glicina	2,6	2,9	2,8	1,6	2,3	2,7	2,7	3,0	2,6
Glutamina	0,1	0	0	0	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
Histidina	0,6	0,9	0,8	0,7	1,4	1,5	1,2	1,2	1,0
Treonina	2,6	2,4	1,8	2,1	2,6	3,0	2,8	3,0	2,6
Arginina	0,6	0,6	0,7	1,3	3,1	3,4	2,8	2,6	2,2
Alanino	4,2	5,7	5,7	3,6	5,4	5,9	5,6	6,2	5,4
Prolina	7,2	5,6	2,9	5,2	2,9	3,5	3,3	3,8	3,1
Tirosina	2,1	2,1	2,3	1,4	2,2	2,5	2,3	2,6	2,1
Cistina	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0
Valina	3,9	4,0	4,0	2,6	4,3	4,8	4,4	4,7	4,1
Metionina	1,6	1,7	1,7	1,1	1,7	1,8	1,7	1,8	1,6
Isoleucina	2,9	3,0	3,0	2,1	3,2	3,3	3,1	3,4	2,9
Leucina	5,1	5,7	6,0	3,6	5,2	5,5	5,2	5,7	5,0
Lisina	3,0	3,4	3,4	2,1	3,0	3,4	3,4	3,7	3,2
Fenil alanina	2,1	2,3	2,2	1,4	2,4	2,5	2,3	2,5	2,1
Total	49,0	52,7	48,7	36,7	51,4	56,9	52,9	57,0	49,1

La figura 6 muestra la composición de aminoácido del material sometido a autólisis después de 4 horas de incubación bajo las condiciones establecidas en la tabla 1.

60

Para la mayor parte las diferentes condiciones de autólisis liberan cantidades equivalentes de los aminoácidos. Excepcionalmente, se observa un alto contenido de arginina en el material sometido a autólisis 3 y una alta cantidad de prolina en A-1 y A-2. La comparación con A-5 indica que la liberación de prolina está asociada con una temperatura de incubación de 45°C. El contenido de ácido glutámico de A-1 es menor que para los otros productos. La glutamina solo se ve en pequeñas cantidades en A-1 y A-3 (incubación en pH 7). Las pequeñas variaciones sugieren que son las mismas encimas las que operan por todo el intervalo de las condiciones de proceso estudiadas (pH: 7-8 y temperatura de incubación: 45-55°C).

65

ES 2 295 551 T3

La figura 7 muestra el contenido de aminoácido libre de A-3 como una función del tiempo. No se puede ver una diferencia particular en el perfil de aminoácido en el periodo de incubación de ½ a 4 horas, lo que significa que el tiempo de incubación puede ser seleccionado esencialmente en base a la producción deseada post ultra-filtración (véase la figura 2).

5

Conclusiones

Es posible alterar el contenido de materia seca del material inicial (etapa 1) y el tiempo de incubación sin afectar los parámetros importantes (altos contenidos de MSG y aminoácidos libres, solubilidad total, color pálido, gusto neutral) del producto de material sometido a autólisis. Materia seca aumentada o tiempo de incubación reducido reduce la producción. Una producción óptima puede ser determinada en base al grado deseado de hidrólisis de proteína en el subproducto.

10

15 Ejemplo 3

Preparación del material sometido a autólisis

Se produce un material sometido a autólisis de acuerdo con el siguiente procedimiento:

20

1. Se produce un cultivo microbiano (biomasa) con un proceso de fermentación como se describe en el ejemplo 1. La biomasa recogida está concentrada hasta una base de sólidos secos de 12-22% por centrifugación.
2. Homogeneización: caída de presión de 1000 a 0 bar.
- 25 3. Autólisis; temperatura y pH son ajustados en el intervalo de 50 a 55°C y 7,0 a 7,5 respectivamente.
4. Incubación: hasta 4 horas.
- 30 5. El producto es esterilizado calentando hasta una temperatura en el intervalo de 70 a 90°C.
6. El producto es secado por pulverización (temperatura de entrada/salida: 180-250°C/90°C).

25

30

35 Ejemplo 4

Procedimiento de material sometido a autólisis

Se produce un material sometido a autólisis de acuerdo con el siguiente procedimiento:

40

1. Se produce un cultivo microbiano como se describe en el ejemplo 1. La biomasa recogida es concentrada hasta una base de sólidos secos del 12-22% por centrifugación y/o ultra-filtración.
2. Homogeneización: caída de presión desde 1000 a 0 bar.
- 45 3. Autólisis: temperatura y pH son ajustados en el intervalo de 50°C a 55°C y 7-7,5, respectivamente.
4. Incubación durante autólisis durante 2-6 horas.
- 50 5. homogeneización: caída de presión desde 1000 a 0 bar.
6. El producto es calentado a 65-95°C.
7. el producto es secado por pulverización (entrada/salida/alimentación) 180-300°C/70-95°C/15-70°C.

45

50

55

Un proceso de ejemplo se da en la figura 8. En el que A = calentamiento, B = autólisis, C= refrigeración.

Se obtiene análisis para materiales sometidos a autólisis de acuerdo con el procedimiento anterior. Los resultados se muestran en la tabla 3 siguiente.

60

65

ES 2 295 551 T3

TABLA 3

Análisis	Procesos: a corto plazo			
	C1	R1	C	R
Agua, % de muestra	8,3	6,7	8,8	7,0
Ceniza, % de materia seca	9,4	9,3	11,5	9,8
Grasa cruda, % de materia seca	7,5	7,1	8,6	8,9
ARN, % de materia seca	3,8	4,6	5,8	3,1
ADN, % de materia seca	1,1	1,3	2,9	2,8
Proteína cruda, % de materia seca	64,5	65,2	67,2	67,6
Digestibilidad de proteína; in vitro, % de N	89,5	85,2	85,4	83,7
Solubilidad de proteína, % de proteína total	65,0	73,8	38,3	44,3
PH	7,2	7,3	7,4	7,5
Glucosa total, % de materia seca	6,8	8,3	4,1	4,9
Glucosa libre, % de materia seca	0,2	0,4	0,0	0,0
Alfa-amino nitrógeno, % de materia seca	3,9	4,1	3,7	3,6
Aminoácidos, total % de materia seca	48,3	52,4	52,6	47,1
Aminoácidos, libres, % de materia seca	25,6	23,8	13,1	12,7
Los porcentajes son en peso				

C1: la homogeneización se realizó antes de la autólisis del material concentrado

R1: la homogeneización se realizó antes de la autólisis del material retenido

C: Autólisis de material concentrado

R: autólisis de material retenido

Los resultados de la autólisis de material después de la centrifugación y material después de centrifugación y la siguiente ultra-filtración son casi la misma. Sin embargo hay una gran diferencia cuando las muestras han sido homogeneizadas antes de la autólisis.

Ejemplo 5

Contenido de Alfa-amino de material sometido a autólisis

Un cultivo bacteriano producido según se describe en el ejemplo 1 (5°C) fue homogeneizado a 900-1000 bar, y almacenado en recipientes. Después de la homogeneización la temperatura fue aumentada a 44,5°C.

Una muestra fue almacenada sin control de temperatura, y una muestra fue almacenada a 4°C sin ningún control externo del pH. El pH fue registrado manualmente.

ES 2 295 551 T3

TABLA 4

Temperatura, pH y alfa-amino nitrógeno (α -N) como porcentaje de materia seca durante el almacenamiento de cultivos homogeneizados

	Sin control de temperatura			Muestra de referencia enfriada		
Tiempo h[]	Temp.. [°C]	pH	-N [%]	Temp [°C]	pH	-N [%]
0	44,5	6,6	1,12	44,5	6,6	1,12
0,27	44,5	6,6	1,20	10	6,7	1,02
0,50	44,5	6,5	1,35	4	6,7	1,15
0,83	41,0	6,4	1,49	4	6,7	1,16
1,25	40,5	6,3	1,54	4	6,7	1,19
2	39,0	6,1	1,64	4	6,7	1,17
3	38,5	5,8	1,75	4	6,8	1,16
4,08	35,0	5,6	1,84	4	6,8	1,18
5,77	27,0	5,4	1,82	4	6,8	1,19
24	22,0	5,1	2,0	4	6,8	1,34

El experimento sin control de temperatura mostró una temperatura de 44,5°C inicialmente y un pH de 6,6. Después de 24 h, la temperatura era de 22°C y el pH fue 5,1. Durante este almacenamiento el alfa-amino N aumentó del 1% al 2%.

El experimento con la muestra de referencia enfriada, no mostró cambio en le pH. Para obtener una reducción del pH de esta muestra fue necesario un almacenaje adicional. Durante el almacenaje el alfa-amino N aumentó del 1% al 1,34%.

La tabla 4 muestra que el contenido de alfa-amino nitrógeno del cultivo homogeneizado está entre 1-2% de la materia seca, incluso después de un almacenamiento prolongado.

El grado de hidrólisis está definido como el porcentaje de uniones péptido separadas. Para cada unión péptido hidrolizada se forma un alfa-aminoácido. Suficiente autólisis para producir productos sabrosos puede ser definida por el porcentaje de alfa-aminoácido nitrógeno de la materia seca. La autólisis para conseguir productos sabrosos dará lugar a un contenido de alfa-amino nitrógeno entre 2-6%, 3,5% o típicamente 4% en peso. Por ejemplo el cultivo básico contiene 1-1,1% de alfa-amino nitrógeno, mientras que el producto homogeneizado contiene 1-2% de alfa-amino nitrógeno dependiendo de las condiciones de almacenamiento como se ha mostrado en la tabla 4 anterior. El aumento adicional del alfa-amino nitrógeno del producto homogeneizado puede ser obtenido por titration a pH 7-7,5 y temperaturas por encima de 40°C. Por otro lado, un pH de 5-5,5 estabilizará la biomasa.

Ejemplo 6

Control de pH y viscosidad durante la fase inicial de autólisis

El material concentrado (es decir material recogido después de la centrifugación) y el retenido (es decir material recogido después de la ultra-filtración) fueron homogeneizados a 1000 bar, y se controló la temperatura por medio de intercambiadores de calor.

La tabla 5 y la tabla 6 siguientes muestran los parámetros del proceso.

ES 2 295 551 T3

TABLA 5

Temperatura y contenido de materia seca del material concentrado homogeneizado para experimentos en lotes hasta 9 horas

5

C-material concentrado.

10

Muestra	C1	C2	C3	C4
Temperatura	45°C	35°C	25°C	15°C
Materia seca	15,6%	15,6%	13,5%	13,5%

15

TABLA 6

Temperatura y contenido de materia seca de retenido homogeneizado para experimentos en lote hasta 9 horas

20

R-retenido.

25

Muestra	R1	R2	R3	R4
Temperatura	45°C	35°C	25°C	15°C
Materia seca	19,4%	19,4%	21,2%	21,2%

30

35

Se hicieron experimentos por lotes con equipo de seguimiento asociado, depósito intermedio y homogeneizador. La figura 9 muestra el aspecto general del experimento en el que A era concentrado o retenido, 1 es la temperatura de control, 2 es el electrodo Red. Ox, 3 es el electrodo pH, 4 es el homogeneizador a 1000 bar, 5 es la corriente de introducción de medio, 6 es el producto, 7 es el agitador y 8 es el reactor de autólisis.

40

La hidrólisis por lotes de biomasa homogeneizada se hizo en un conjunto de accionamiento de fermentador modelo número M1200-200 equipado con reactores Modelo FS-314 (New Brunswick Scientific Co. Inc New Jersey) con un volumen total de 14 l y de trabajo 10 l. Los reactores se sumergieron en un baño de agua a temperatura controlada ($\pm 1^\circ\text{C}$), operado con agitación controlada si no se establece de otra manera. Se registró el pH. El pH interno se comprobó externamente. Los reactores se operaron sin aireación y la velocidad de agitación fue 100-300 rpm.

45

Se tomaron muestras bombeando la biomasa bajo agitación continua si no se establece de otra manera. En este caso se midió el pH y la viscosidad. Se almacenaron muestras congeladas para un análisis posterior.

50

Muestras tomadas de un reactor con depósito agitado y medido inmediatamente a 2,5 rpm, 5 rpm, 10 rpm, 30 rpm, 50 rpm y 100 rpm por medio de un Viscosímetro Brookfield. En la sección resultante solo se dan las mediciones a 30 rpm.

Resultados y Discusión

55

Las figuras 10 y 11 muestran el pH como una función del tiempo para concentrado y retenido homogeneizados, respectivamente.

60

A 15°C después de 5-9 horas, el pH fue estable para concentrado y retenido homogeneizados, véanse las figuras 10 y 11. A temperaturas mayores, el pH fue reducido desde 6,2-6,4 a 5,2-5,4, y la velocidad de reducción de pH aumentó con la temperatura. Para el retenido homogeneizado, la velocidad de reducción de pH fue casi dos veces la velocidad del concentrado homogeneizado. La diferencias entre concentrado y retenido pueden ser explicadas por el contenido de materia seca o el estado de la biomasa en diferentes etapas de procesamiento. Sin embargo, al final todos experimentos se estabilizaron en un pH 5-5,5.

65

El pH reducido fue provocado probablemente por formación de ácido de conversión de azúcar y/o degradación limitada de péptido. La conversión de azúcar puede ser usada para reducir el contenido de azúcares reductores antes de la etapa de autólisis del material sometido a autólisis. El grado de hidrólisis (DH) está definido como el porcentaje de uniones péptido separadas. Para cada unión péptido hidrolizadas se forma un alfa-aminoácido libre. El producto puede ser definido por el porcentaje alfa-aminoácido nitrógeno de la materia seca. Autólisis para conseguir producto

ES 2 295 551 T3

sabroso (como se ha definido anteriormente) dará lugar a un contenido de alfa-amino nitrógeno entre 2-6%, 3-5% o típicamente 4%.

5 Las figuras 12 y 13 muestran la viscosidad como una función del tiempo para concentrado homogeneizado y retenido respectivamente en reactores agitados.

10 Las figuras 12 y 13 mostraron que la viscosidad fue inferior para el concentrado homogeneizado que para el retenido. Cuando se aplicó agitación, la viscosidad del concentrado homogeneizado fue menor de 10 cP. El retenido homogeneizado tenía una viscosidad por encima de 20 cP. Como una función del tiempo la viscosidad mostró cambios menores después de 1 hora excepto para el experimento de concentrado a 35°C en el que la viscosidad aumentó después de 4 h.

15 La viscosidad disminuyó con la temperatura. El aumento de materia seca dará un aumento de la viscosidad. La viscosidad como una función de la temperatura, el pH y la concentración deben ser controlados durante el proceso. Por ejemplo, el aumento de la viscosidad se ha evitado de manera que se pueda hacer una mezcla posterior (durante la volumetría).

20 Si se almacena el retenido o concentrado homogeneizados en un banco de laboratorio, la viscosidad aumenta. Estas suspensiones también se desarrollan en una sustancia similar a un gel con alta viscosidad. El retenido homogeneizado fue almacenado por tanto en reactores sin aireación y agitación bajo condiciones controladas con respecto a la temperatura. El pH no se visualizó en este caso.

25 La figura 14 muestra la viscosidad de retenido homogeneizado como una función del tiempo, en el que en el punto A la sustancia se desarrolla en una sustancia similar a una pasta con viscosidad extrema, en B las mediciones pararon y en C la pasta solubilizó.

30 Comparado con el producto agitado, la viscosidad aumenta radicalmente sin agitación. El retenido homogeneizado ganó una viscosidad aumentada como una función del tiempo, y la viscosidad aumentó más rápidamente a mayor temperatura. La viscosidad a 35°C aumentó menos de 27°C, pero la viscosidad inicial (y materia seca) de 35°C fue inferior a 27°C.

35 Las pastas no agitadas producen una sustancia similar a pasta voluminosa debido a la formación y acumulación de gas. El material homogeneizado debe por tanto ser preferiblemente agitado para evitar el aumento de viscosidad y volumen.

40 El aumento de la viscosidad fue provocado probablemente por agregación de polímeros y restos de células de la biomasa homogeneizada. La agregación dio tamaños de partícula de 10-100 μm para biomasa homogeneizada almacenada, mientras que una pasta homogeneizada fresca tenía partículas más pequeñas de 1,5 μm .

45 Las condiciones después de la homogeneización deben ser deseablemente controladas para obtener buenas condiciones de procesamiento con respecto a la viscosidad.

50 Sin volumetría el pH se reducirá. La velocidad de reducción de pH aumentó con la temperatura (15-45°C), y el pH reflejó probablemente tanto degradación de péptido y formación de ácido de la conversión de azúcar. A 15°C el pH de biomasa homogeneizada fue estable durante 5-9 horas e indicó baja velocidad de reacción, mientras 45°C dio una reducción súbita desde pH 6,2 a pH 5,2. En todos experimentos, el pH se estabilizó en 5-5,5.

50

55

60

65

ES 2 295 551 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para producir un comestible o componente de comestible, comprendiendo dicho método el someter a autólisis un cultivo microbiano que comprende una bacteria metanotrófica y una bacteria heterotrófica, o un derivado de ellas.
- 10 2. Un proceso según la reivindicación 1 para la producción de un comestible o componente de comestible, dicho proceso comprende las siguientes etapas:
- 15 (a) preparar una suspensión acuosa de un cultivo microbiano que comprende una bacteria metanotrófica en combinación con una o más bacterias heterotróficas;
- (b) homogeneizar opcionalmente la suspensión; y
- (c) someter el producto resultante a autólisis.
- 20 3. Un proceso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que durante la autólisis nucleasas y proteasas digieren los componentes de las celdas.
4. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además la etapa de separar el producto sometido a autólisis.
- 25 5. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho cultivo ha sido producido usando metano como fuente de carbono.
6. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho cultivo comprende *methylococcus capsulatus*.
- 30 7. Un proceso según la reivindicación 6, en el que dicho cultivo comprende además *Ralstonia sp.* DB3 (variedad NCIMB 13287) y *Brevibacillus agri* DB5 (variedad NCIMB 13289), opcionalmente en combinación con *Aneurinibacillus sp.* DB4 (variedad 13288).
- 35 8. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que autólisis es efectuada a una temperatura de al menos 25°C.
9. Un producto sometido a autólisis obtenible por un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 40 10. Un producto sometido a autólisis según la reivindicación 9 derivado de una biomasa que comprende una bacteria metanotrófica y una bacteria heterotrófica, o de un derivado de ellas, teniendo dicho producto un contenido de aminoácido libre en el intervalo de 40 a 80% en peso de una base de materia seca.
- 45 11. Un producto según la reivindicación 10, que tiene un contenido en aminoácido libre en el intervalo de 40 a 50% en peso en una base de materia seca.
- 50 12. Un producto según la reivindicación 10 o reivindicación 11 que tiene un contenido de ácido glutámico en el intervalo de 5 a 11% en peso en una base de materia seca.
13. El uso de un material sometido a autólisis o derivado procesado de él según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 como o en un precursor para un comestible.
- 55 14. El uso de un material sometido a autólisis o procesado derivado de él según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 como un aditivo de comida de mascotas.
15. Un producto alimenticio que comprende un material sometido a autólisis o procesado derivado de él según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12.
- 60 16. Un producto alimenticio según la reivindicación 15 que es una comida de perros o un aditivo de él.
17. Un producto alimenticio según la reivindicación 15 siendo comida de peces.
- 65 18. Un producto alimenticio según la reivindicación 17 siendo una comida de peces extruida con forma de píldora.

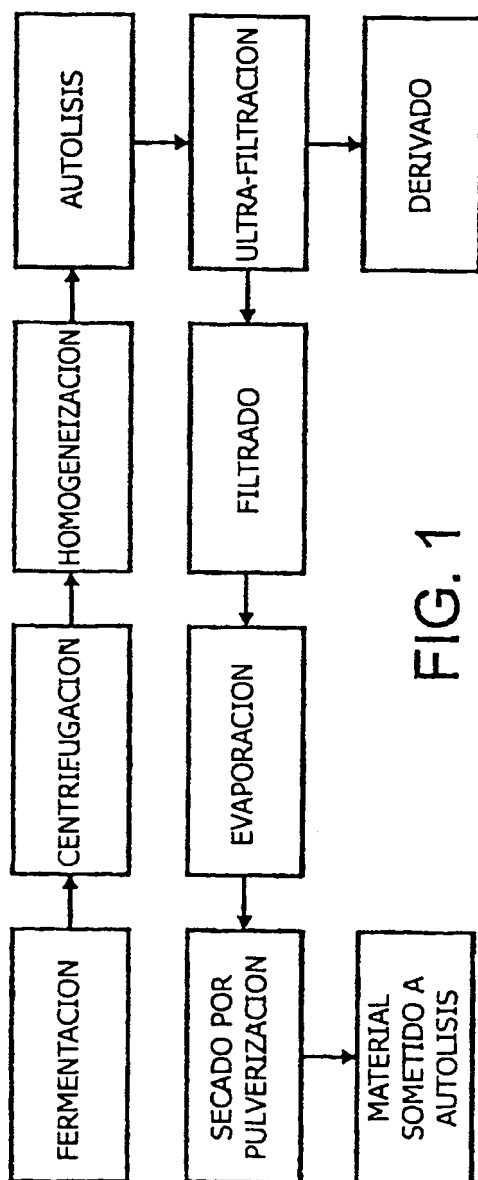


FIG. 1

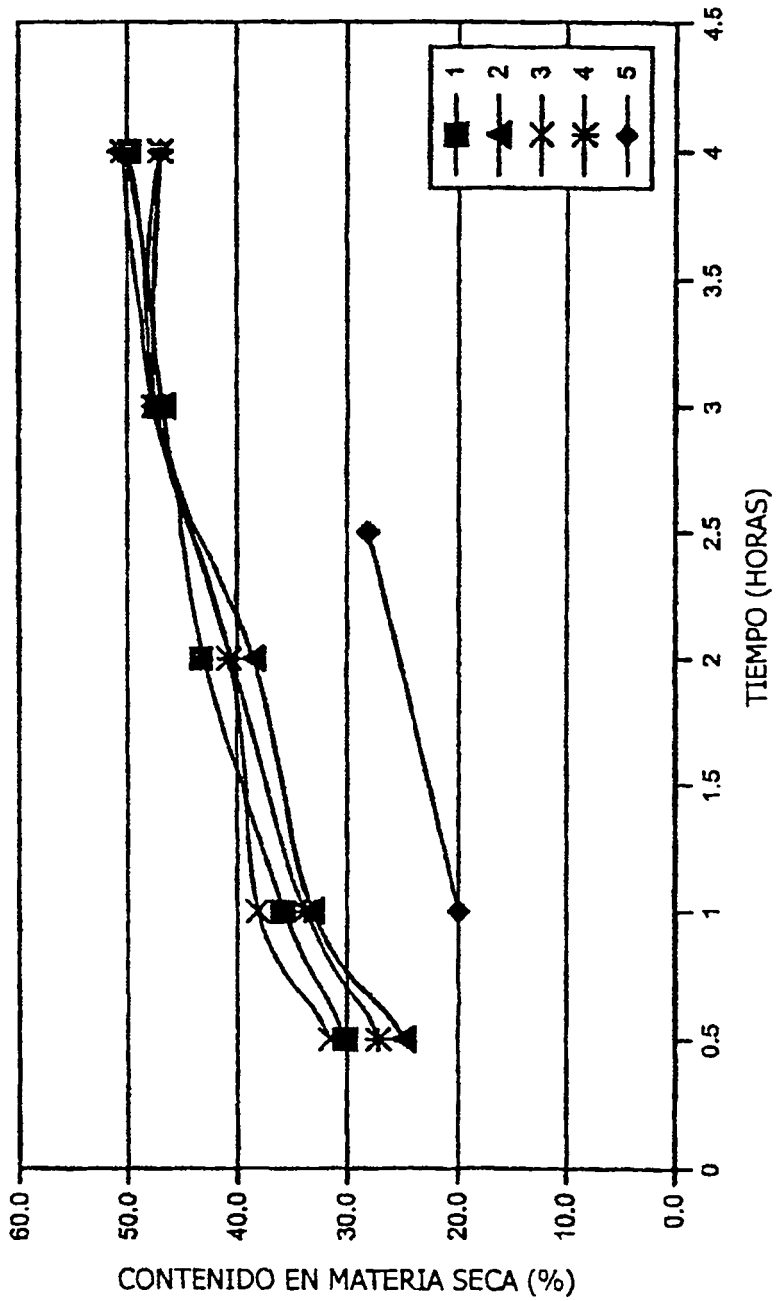


FIG. 2

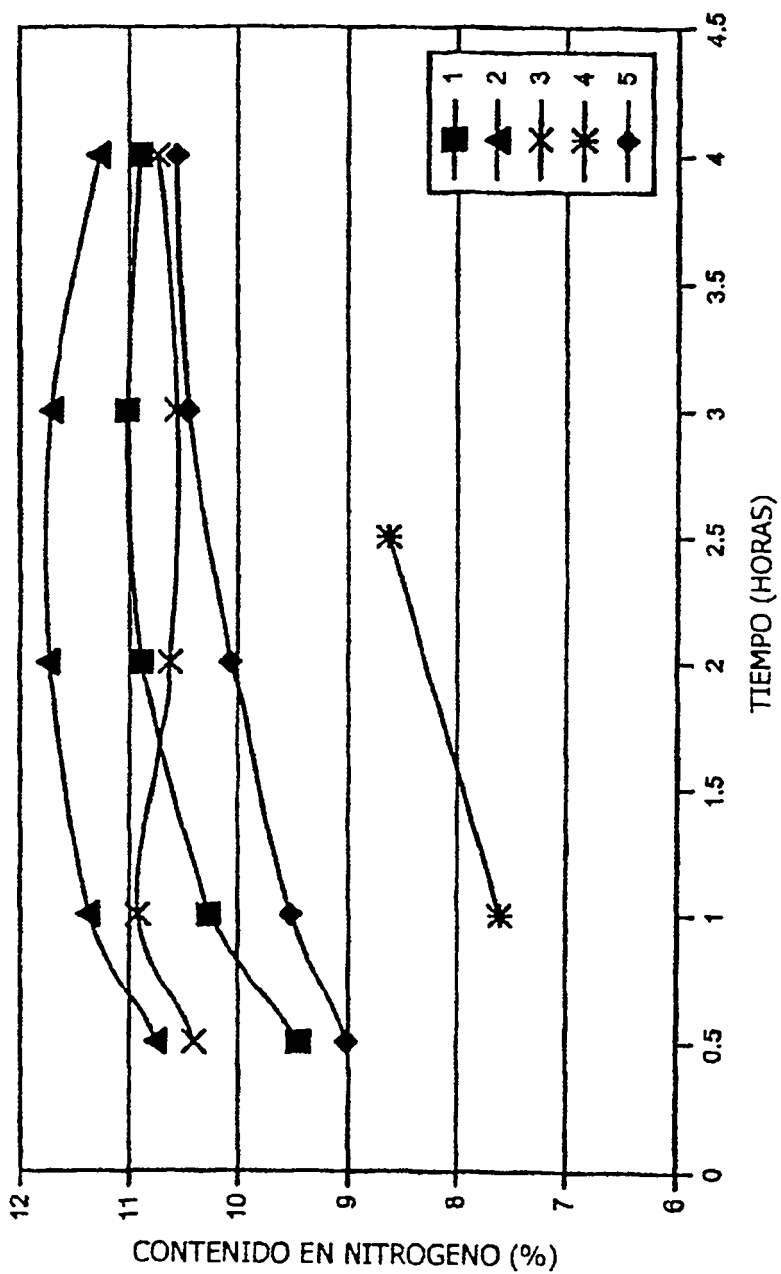


FIG. 3

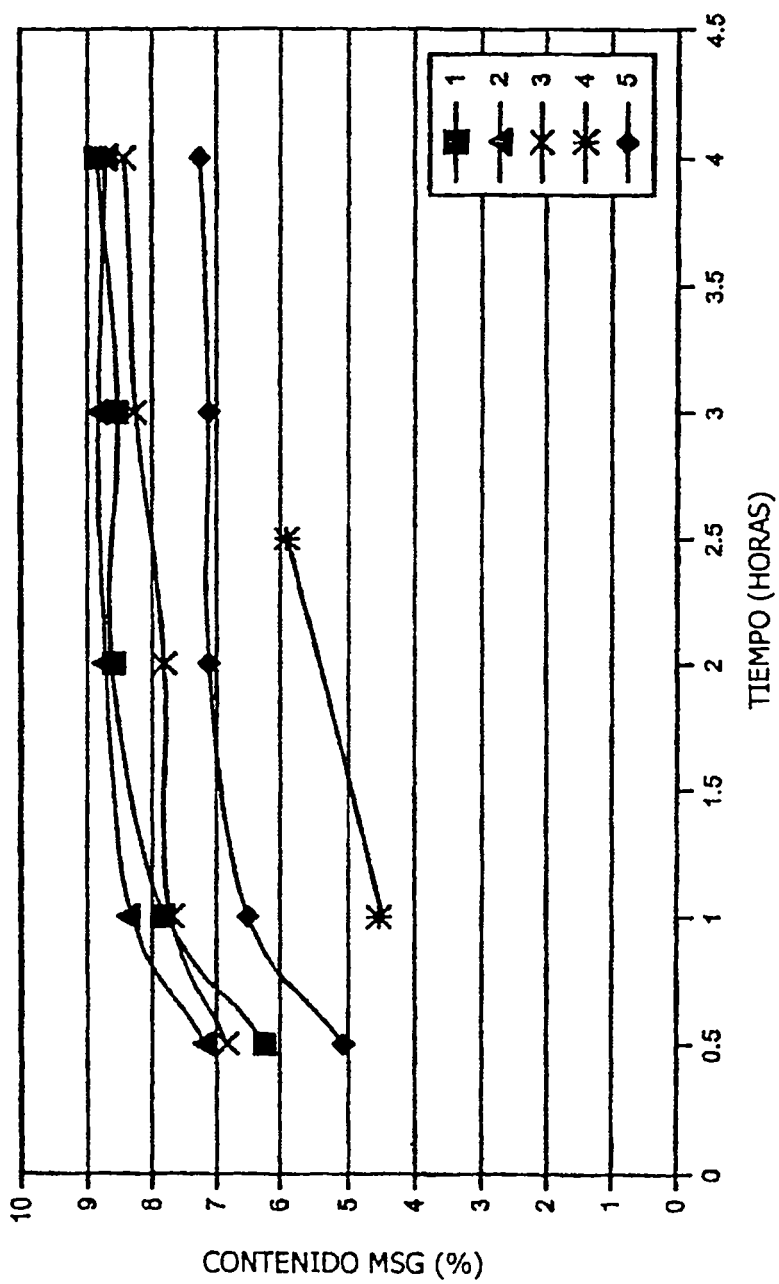


FIG. 4

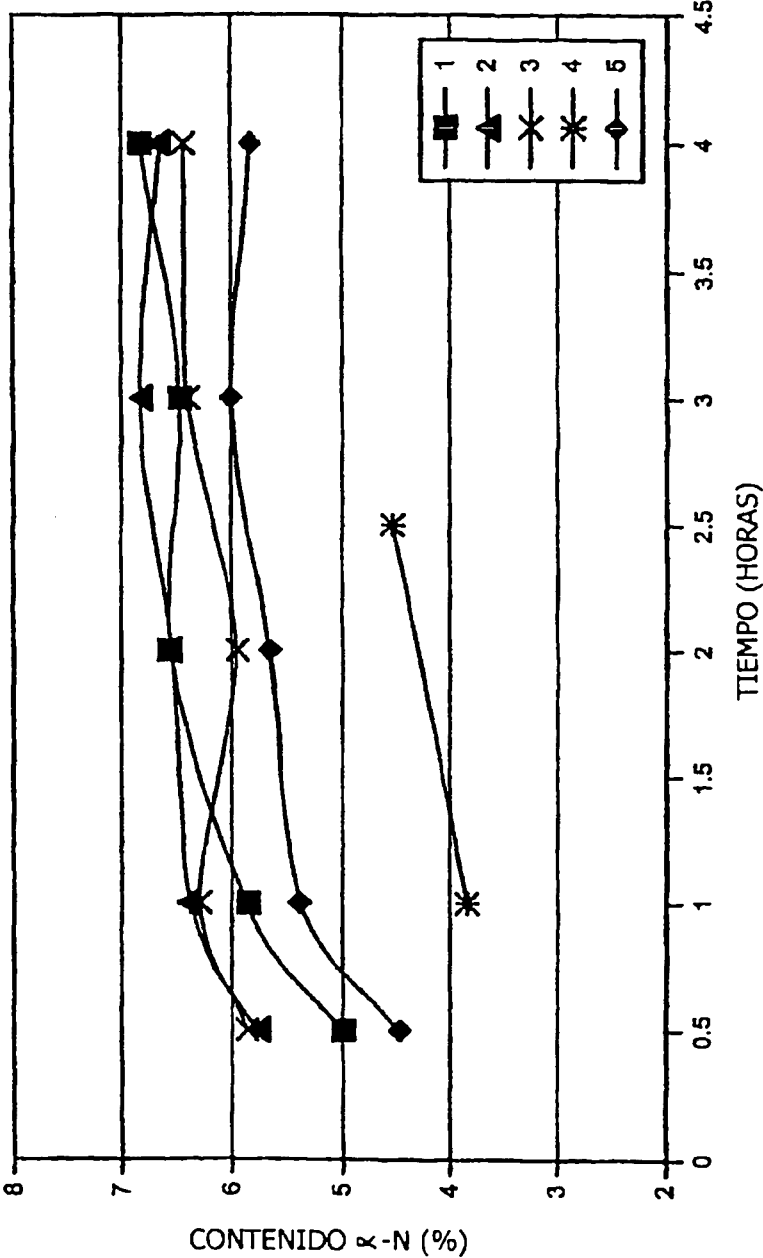


FIG. 5

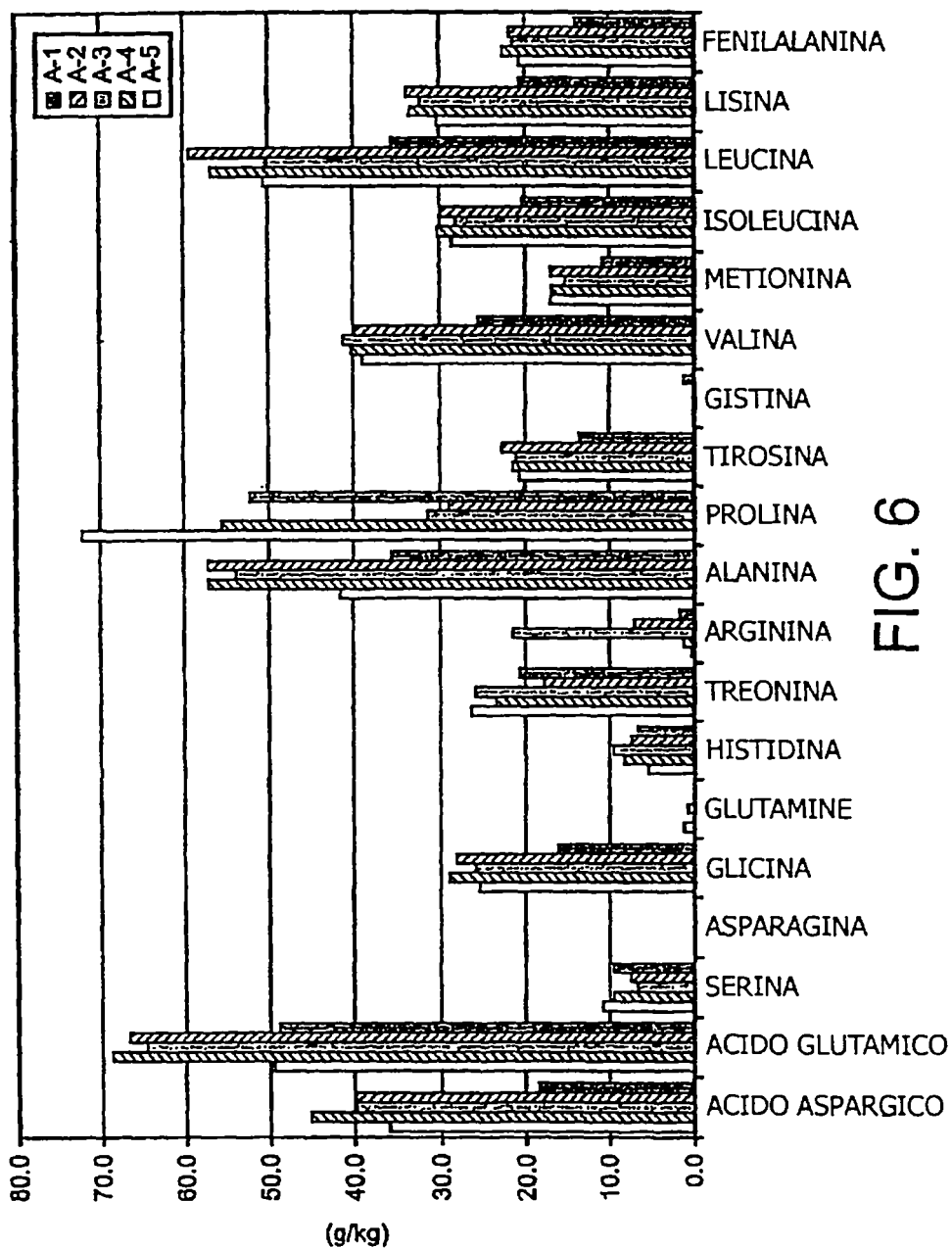


FIG. 6

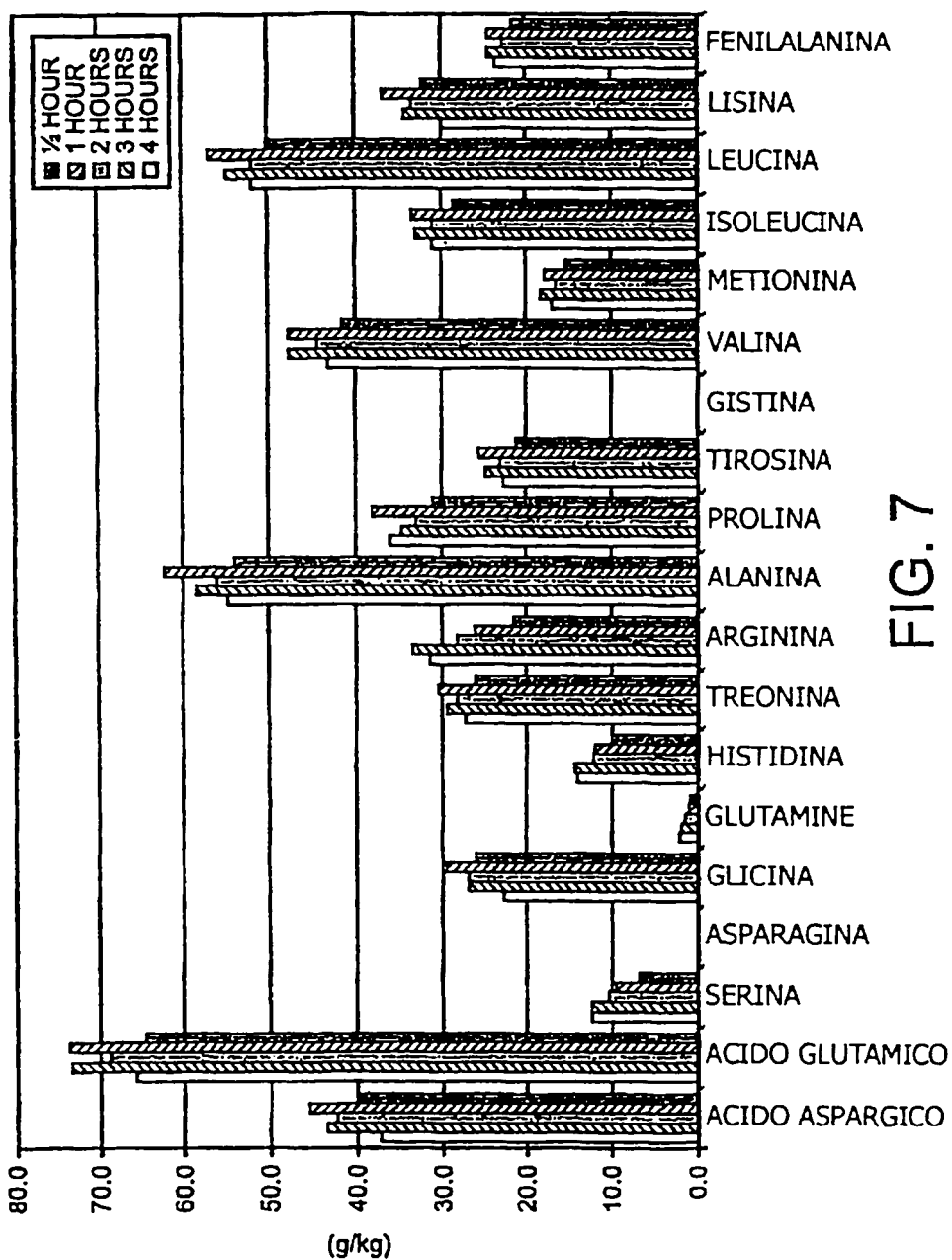


FIG. 7

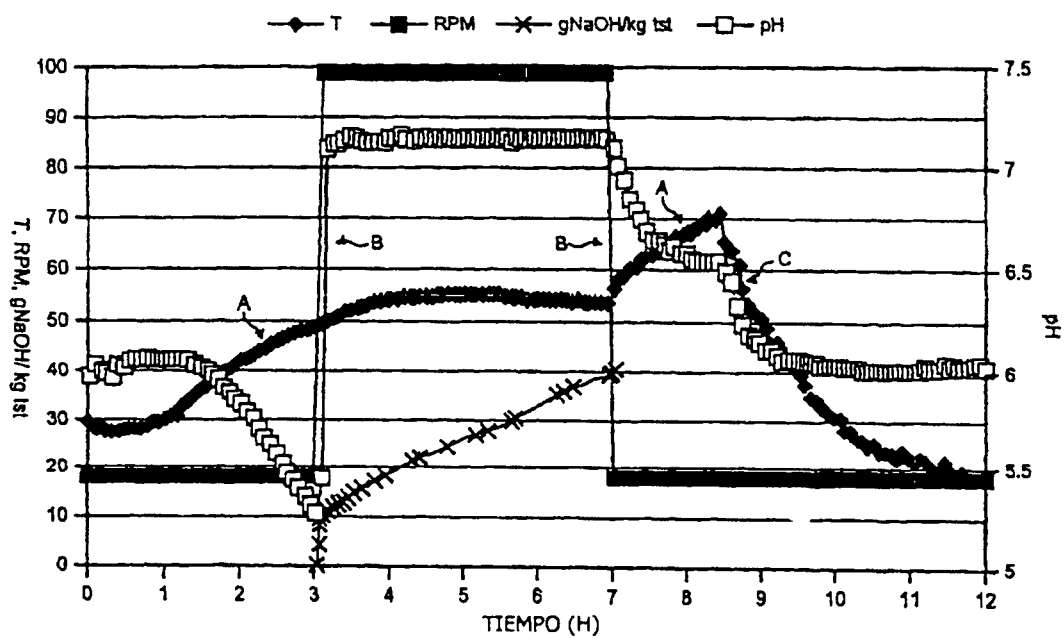


FIG. 8

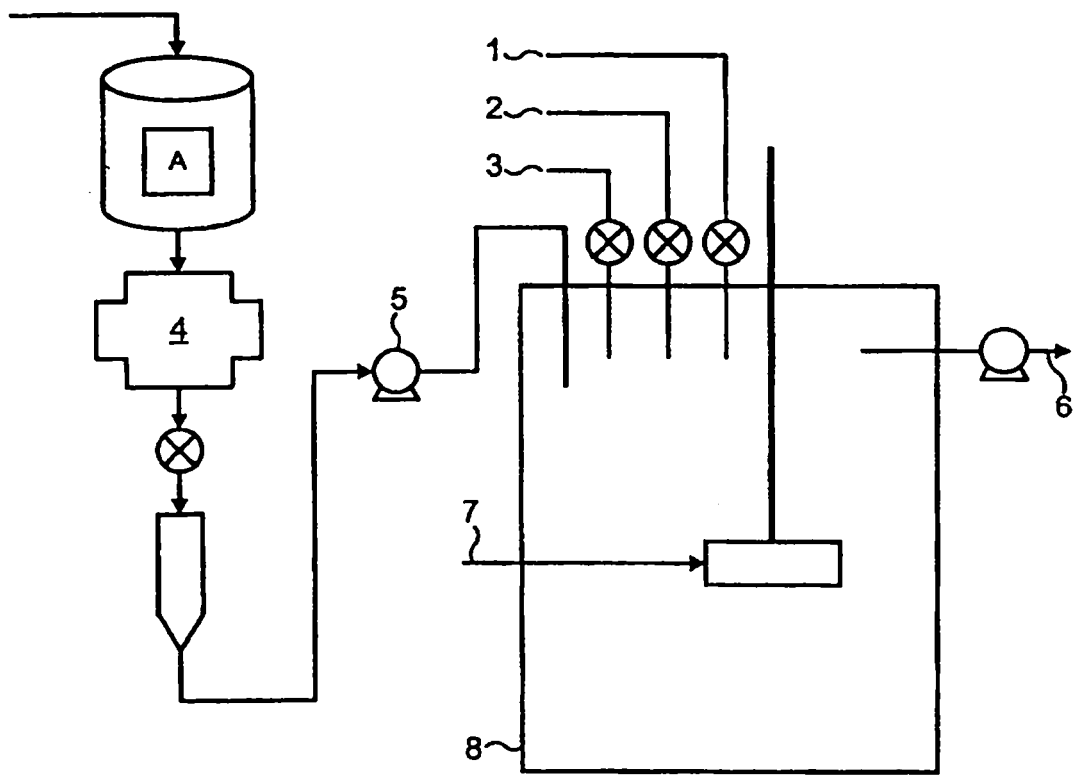


FIG. 9

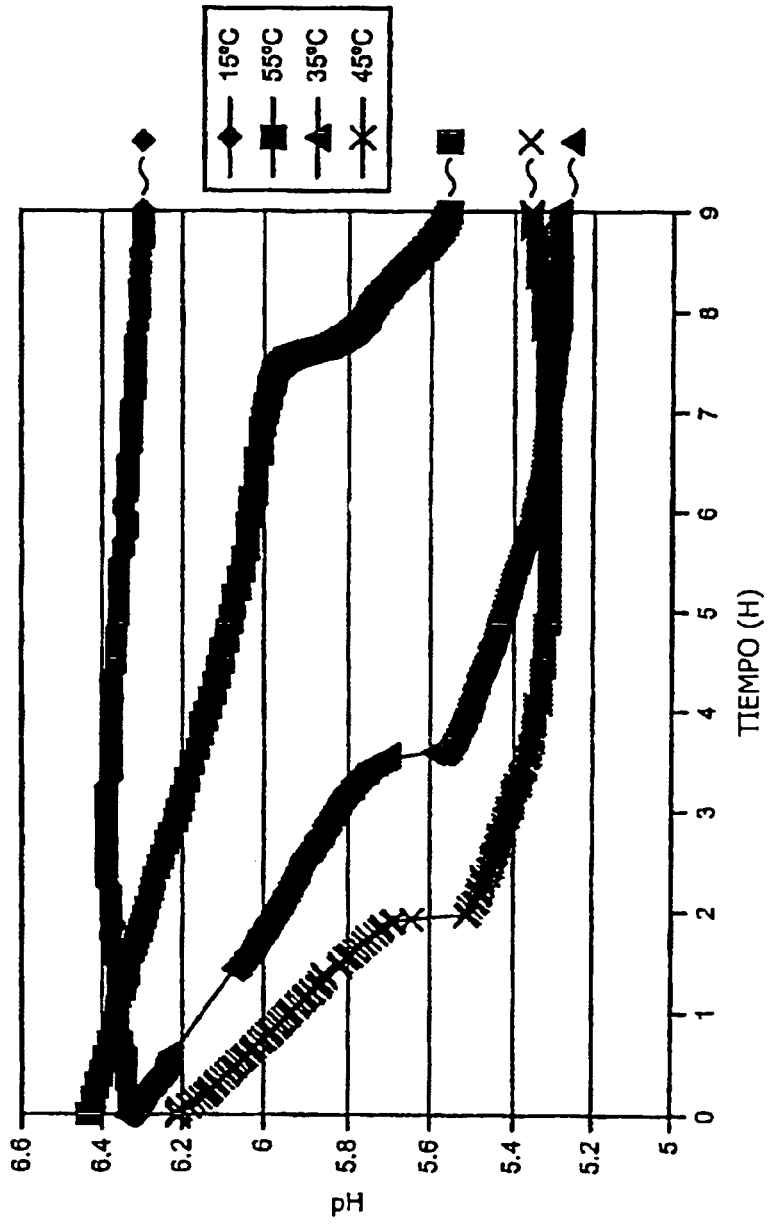


FIG. 10

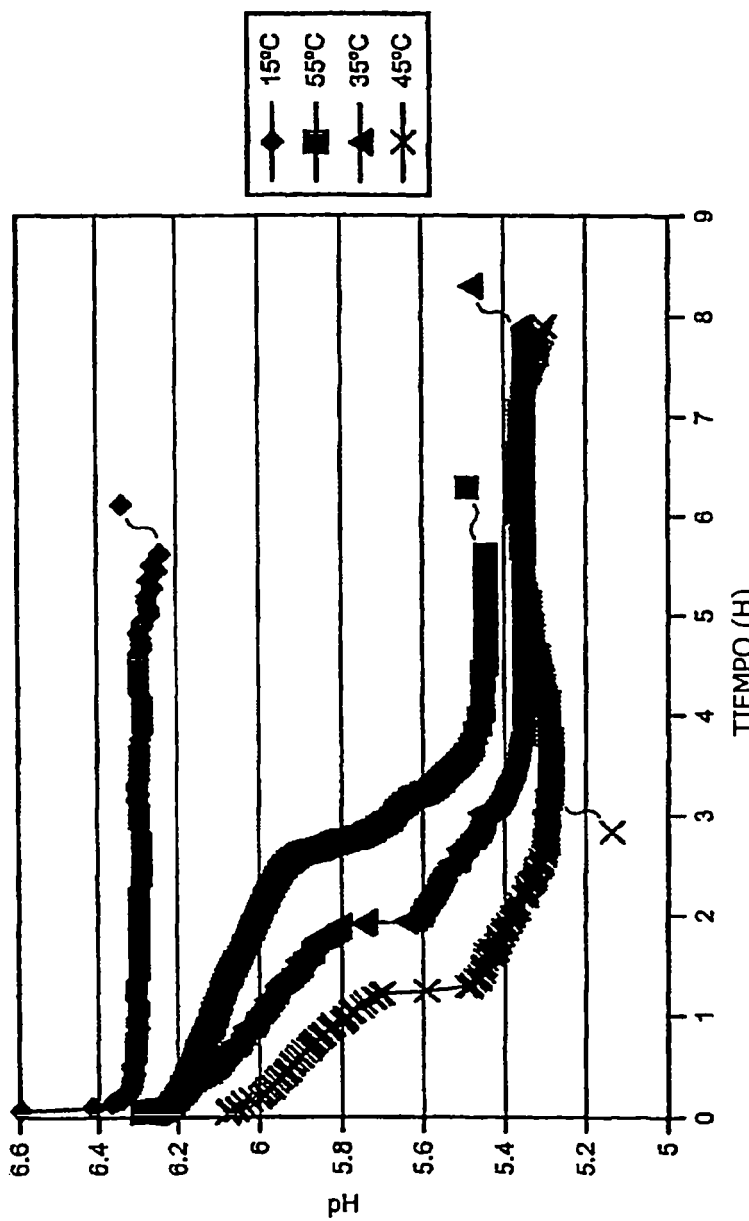


FIG. 11

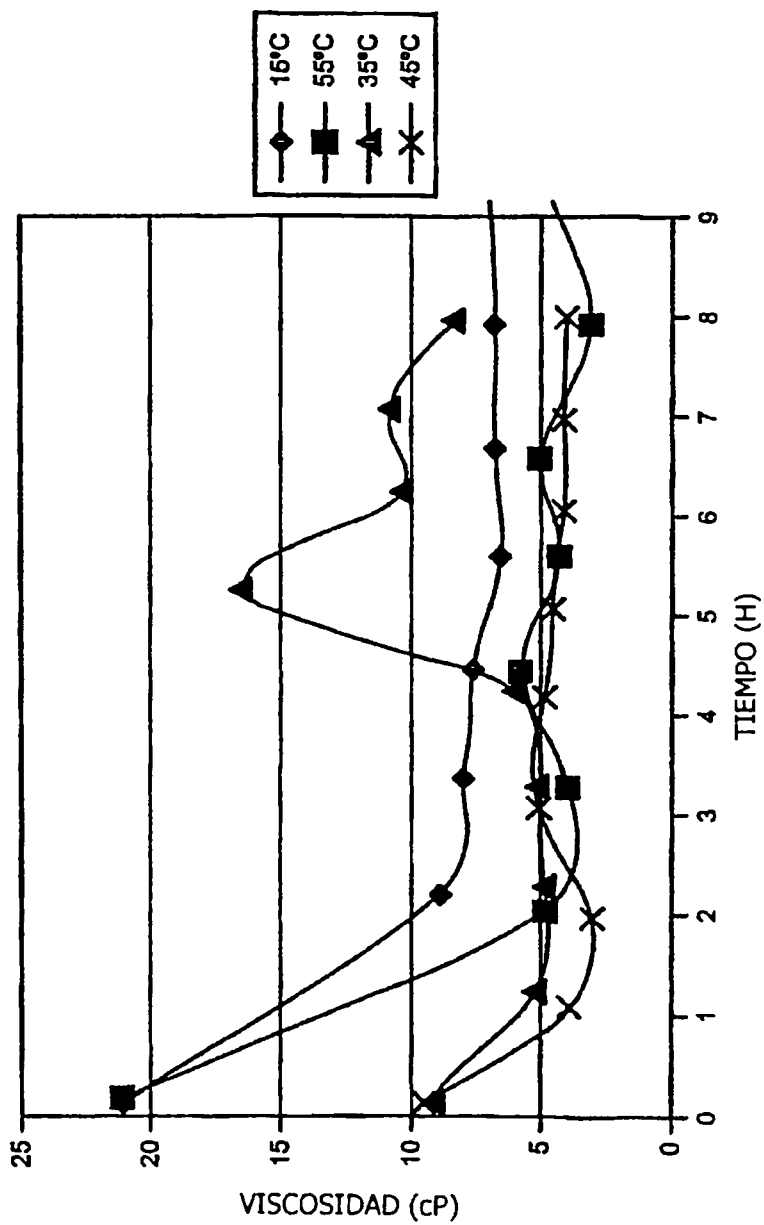


FIG. 12

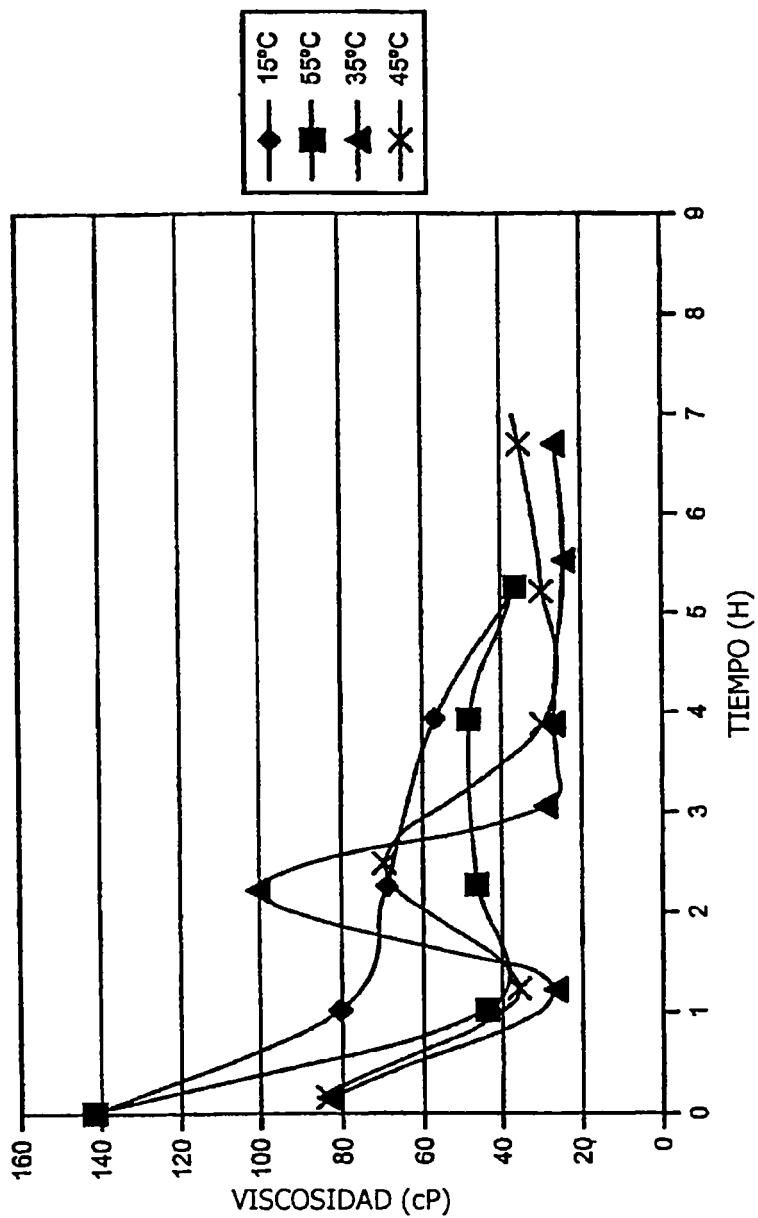


FIG. 13

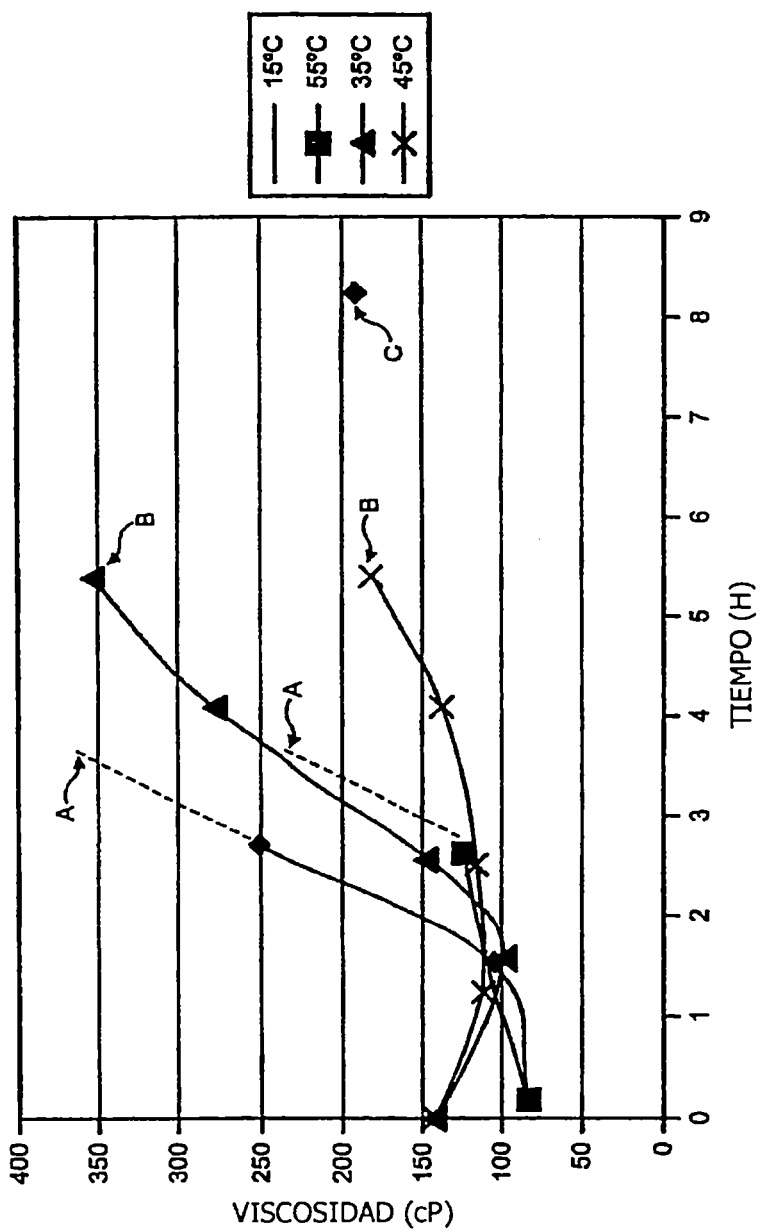


FIG. 14