

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 618**

51 Int. Cl.:

A23J 3/08 (2006.01)
A23J 3/22 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23L 1/24 (2006.01)
A23C 21/02 (2006.01)
A23C 15/16 (2006.01)
A23C 9/137 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2002 E 02787279 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 1458247**

54 Título: **Matriz de proteína maleable y usos de estas**

30 Prioridad:

20.12.2001 US 341232 P

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

28.03.2014

73 Titular/es:

**BIOLACTIS INC. (100.0%)
Caves Village Building No. 10, Office No. 4, West
Bay Street, P.O. Box N-7532
Nassau, BS**

72 Inventor/es:

**SIMARD, ERIC;
PILOTE, DOMINIQUE;
DUPONT, CLAUDE;
LAJOIE, NATHALIE;
PAQUET, MARCEL;
LEMIEUX, PIERRE y
GOYETTE, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 451 618 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

Matriz de proteína maleable y usos de estas

5 Antecedentes de la invención

(a) Campo de la invención

10 Esta invención se refiere a una matriz de proteína maleable natural y biodegradable, el método de preparación de esta, y composiciones de esta, tales como alimento, cosmético, nutracéutico, composiciones de alimento funcional y farmacéuticas.

(b) Descripción de la técnica anterior

15 La alta demanda del producto bajo en grasa lidera la industria de alimentos para desarrollar alimentos sustitutos. La alta demanda de tal producto se basa en estudios que recomiendan una disminución en el consumo diario de grasa, siendo importante que el alimento sustituto tenga características sensoriales interesantes como el alimento original (sabor, olor, textura, etc.). Otro campo que está en aumento intensivo es los alimentos nutracéuticos y funcionales. El alimento funcional es un alimento con efectos beneficiosos sobre la salud. El consumo mundial de estos nuevos
20 alimentos es de alrededor de 70 MM\$ en una base anual. La popularidad de estos productos es tan alta que se espera que las ventas mundiales sean de 500 MM\$ en 2010.

25 En la industria cosmética y farmacéutica, existe una necesidad muy sentida de materia prima para las formulaciones, protección y liberación controlada de ingredientes activos. Varios productos ya existen, pero la mayoría de ellos son muy caros. La industria está siempre en la necesidad de nuevas tecnologías y productos que producirán mejores resultados a un costo inferior.

30 La ultrafiltración, ósmosis inversa y procesos de secado son algunos de los métodos usados actualmente para la valorización de las proteínas del suero de la denominada suero de leche, un subproducto de la elaboración de queso. Estos métodos son eficientes pero extremadamente caros y no generan un producto fácilmente utilizable en una variedad de sectores industriales. El hecho de que el costo de las instalaciones de los métodos anteriormente mencionados sea alto es un problema para la industria del queso en general. Sólo los grandes fabricantes de queso con posiciones financieras fuertes y la generación de grandes volúmenes de suero de leche pueden alcanzar la rentabilidad con los métodos anteriormente mencionados a pesar de los altos costos. Ya que el suero de leche no se
35 puede desechar libremente en el medio ambiente pues constituye un contaminante *por sí mismo*, los pequeños fabricantes tienen por lo tanto, que gastar dinero para desechar el suero de leche que se usa principalmente para la alimentación animal.

40 Procesos más simples y menos costosas se desarrollaron para recuperar las proteínas de suero pero también con desventajas concomitantes. Los métodos que usan la temperatura, pH, sal, enzimas, fermentación y floculación se encuentran entre los principales parámetros usados para ayudar a la recuperación de las proteínas del suero, pero generalmente conducen a aislamientos que presentan pobre calidad y valor comercial. La patente CA 2,247,824 por Lewandoski y co-inventores describe un proceso para la producción de biomasa microbiana a partir del efluente de los productos lácteos. La biomasa resultante de ese proceso se usa solamente para la alimentación animal. Sin
45 embargo, este producto no tiene propiedades funcionales tales como propiedades emulsificantes que se necesitan para las aplicaciones en la alimentación humana.

50 Muchos procesos y métodos se ofrecen para reemplazar la grasa en los productos alimenticios. Los aglomerados de las proteínas de suero se usan para reemplazar la grasa como tal como se describe en la patente de Estados Unidos 5,358,730. El proceso consiste en un tratamiento térmico de proteínas de suero a un pH por encima de su punto isoeléctrico con la adición de sal. El proceso conduce a la formación de grumos (geles sólidos que se pueden cortar en pequeños fragmentos) que pueden usarse en el reemplazo de grasa. Las proteínas del suero se usan ampliamente en la industria alimentaria por sus propiedades funcionales. Sin embargo, este producto es un producto sólido y no maleable, que es difícil de usar en la mayoría de los alimentos, cosméticos, aplicaciones farmacéuticas y
55 nutracéuticos.

60 Las proteínas son además excelentes formadores de película, agentes acondicionadores e hidratantes para el cabello y la piel. Sin embargo, las proteínas naturales generalmente tienen uso limitado en cosméticos y artículos de tocador porque son un poco inestables y tienden a precipitar o desnaturalizar cuando se exponen a altas temperaturas o a soluciones salinas. Además frecuentemente son hidrolizadas por reactivos químicos o ácidos y bases. Incluso si se superan estas dificultades, la formulación de productos cosméticos que contienen proteínas está más cargada de dificultades, ya que cada proteína tiene un punto isoeléctrico es decir un pH al cual la proteína es neutra. Si se desea formar composiciones que tienen un pH que está por debajo del punto isoeléctrico de la proteína, la proteína posiblemente puede formar un precipitado insoluble.

65

Además, un gran número de productos alimenticios como la mayonesa, aderezos, margarina, extensores o sustitutos bajo en grasa o cero en grasa, se pueden estabilizar con polisacáridos como estabilizadores de la emulsión o agentes espesantes. Además en los campos de la medicina, farmacéutica y cosmética, los polisacáridos se usan como estabilizadores de la emulsión. Los polisacáridos bien conocidos se obtienen a partir de una variedad de semillas de plantas, por ejemplo, goma de guar de *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) o goma de algarrobbilla (LBG) de algarrobo. Otras fuentes bien conocidas son las algas, dando carragenina, alginatos o agar.

El uso de polisacáridos y proteínas en las composiciones cosméticas es bien conocido en la técnica. Los polisacáridos son conocidos por ser buenos humectantes, formadores de película, y función como hidratantes de la piel. Ciertos polisacáridos tienen además la capacidad gelificante y son útiles en la formación de composiciones líquidas o sólidas de mayor viscosidad. Sin embargo, los polisacáridos pueden tender a proporcionar una sensación pesada, pegajosa en la piel y, cuando se usa en cantidades suficientes para causar la gelificación, pueden proporcionar productos que no son estéticamente agradables.

Ciencia del alimento

El proceso descrito en la patente de Estados Unidos 4,699,793 se usa para producir aderezos. Debido al tratamiento térmico realizado antes de la fermentación, el producto resultante tiene un sabor desagradable y una pobre homogeneidad, que son los parámetros más importantes de la ciencia del alimento.

Se conoce que la presencia de ciertas bacterias se asocia con numerosos efectos beneficiosos sobre la salud (Gomes y otros (1999) *T. Food Sc. & Tech.* 10:139-157). Los microorganismos están presentes en muchos alimentos y se usan con frecuencia como probióticos para mejorar algunas funciones biológicas en el huésped. Los ensayos clínicos han demostrado que las cepas probióticas seleccionadas pueden influir en la composición de la microflora intestinal y modular el sistema inmune del huésped. Los pre-, pro- y simbióticos ofrecen tanto protección contra como cura de una variedad de enfermedades endémicas y agudas.

Más particularmente, las bacterias del ácido láctico (LAB) se conocen por sus varios efectos beneficiosos en la salud. Perdigon y otros (*Curr Issues Intest Microbiol.*, 2001, Mar 2(1):27-42), han procedido con una revisión importante de las bacterias lácticas en la salud, particularmente en el sistema inmunológico. La activación de la respuesta inmune sistémica y secretora por LAB requiere muchas interacciones complejas entre los diferentes componentes del ecosistema intestinal (microflora, células epiteliales y células inmunes). A través de diferentes mecanismos ellas envían señales para activar las células inmunes. Así el conocimiento de la microflora intestinal normal, la contribución de LAB y su papel en las numerosas funciones en el tracto digestivo, así como el funcionamiento del sistema inmune de la mucosa forman la base para el estudio y la selección de una cepa probiótica con propiedades inmunoestimulantes. En la selección de LAB por su capacidad inmunoestimulante ayuda saber no sólo el efecto que tienen sobre el sistema inmune de la mucosa, sino el uso específico para el cual están siendo puestos estos vectores de vacuna oral.

EP 0 498 506 describe un agente de fermentación láctica mixto que comprende al menos dos levaduras y al menos dos bacterias en una matriz de polisacárido. Un lactosuero se fermenta en presencia del agente de fermentación para obtener un fermento láctico que se utiliza en la preparación de productos alimenticios.

US 4,444,793 se refiere a un método para producir un producto de suero lácteo funcional que contiene un polímero espesante para uso en la industria alimentaria. Un caldo de fermentación de suero y sacarosa se forma y fermenta con el organismo *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 14935.

US 4,699,793 se refiere a un método para producir un aderezo a partir de suero. Un primer paso se describe en el que los factores de multiplicación (es decir, vitaminas, extracto de levadura, leche descremada y lactulosa) y el clorhidrato de L-cisteína se añaden al suero y a la mezcla fermentada.

Farmacéutica

La entrega de agentes terapéuticos a un huésped mamífero puede ser frecuentemente tan importante como la actividad del fármaco para proporcionar el tratamiento eficaz. En su mayoría, los fármacos se entregan por vía oral, frecuentemente al inicio de una dosificación por debajo de la dosis terapéutica y mediante la administración repetitiva del fármaco, la dosificación se aumenta a un nivel terapéutico o un nivel que excede el nivel terapéutico. En muchos casos, el hecho de tener una dosificación por encima del nivel terapéutico proporciona efectos adversos, ya que la mayoría de las drogas no sólo son eficaces en el propósito previsto, sino frecuentemente tienen efectos colaterales adversos. Varias propuestas se han hecho para evitar estos problemas, tales como cápsulas de liberación lenta, depósitos, bombas, y similares. Estos varios enfoques tienen numerosas deficiencias para las aplicaciones generales en las que se quiere mantener la presencia de un agente terapéutico a una dosificación terapéutica por un período prolongado. Los procedimientos invasivos son frecuentemente indeseables, lo que requiere la cirugía para la introducción del dispositivo de entrega, seguido de la eliminación posterior. Cuando el dispositivo de suministro se coloca sobre la piel, el agente debe ser capaz de transportarse a través de la piel a la

velocidad deseada. Las partículas de liberación lenta tienen un período de tiempo limitado y cuando se introducen en el torrente sanguíneo serán fagocitadas rápidamente.

5 La administración oral en la forma de una tableta, píldora o cápsula convencional constituye la ruta generalmente preferida para la administración de fármacos ya que esta ruta es generalmente conveniente y aceptable en los pacientes. Desafortunadamente tales composiciones pueden asociarse con ciertas desventajas, particularmente en el tratamiento de los pacientes pediátricos o geriátricos, que pueden disgustarle o tienen dificultad para tragar tales composiciones, o donde la administración de una tableta, pastilla o cápsula convencional no es duradera.

10 El campo de los polímeros biodegradables se ha desarrollado rápidamente desde que la síntesis y la biodegradabilidad del ácido poliláctico se informó por primera vez Kulkarni y otros, 1966 "Polylactic acid for surgical implants" Arch. Surg., 93:839. Muchos otros polímeros se conocen para biodegradar, que incluyen, polianhídricos y poliortoésteres, que toman ventaja de los enlaces de la cadena principal lábil, como se reporta por Heller y otros, 1990, Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems; Chasin, M. y Langer, R., Eds., Dekker, Nueva York, 121-161. Debido a que es deseable tener polímeros que se degradan en materiales de origen natural, se han sintetizado los poliaminoácidos para su uso *in vivo*. Esto fue la base para usar los poliésteres de los ácidos alfa-hidroxi (viz, ácido láctico, ácidoglicólico), que son los materiales biodegradables más ampliamente usados para las aplicaciones en el intervalo de dispositivos de cierre (suturas y hilos) en sistemas de entrega de fármacos (patente de Estados Unidos núm. 4,741,337 de Smith y otros.; Spilizewski y otros, 1985 "The effect of hydrocortisone loaded poly(dl-lactide) films on the inflammatory response, " J. Control. Rcl. 2:197-203). Debido al desarrollo de polímeros biodegradables, existe aún la necesidad de sistemas de entrega baratos y eficaces.

25 Los exopolisacáridos actúan como modificadores de la respuesta biológica como se reporta por Ruiz-Bravo A. (Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 2001, Jul; 8(4)-706-10). Las patentes de Estados Unidos 5,888,552; 5,456,924; 5,451,412; 5,290,571; 5,230,902 describen las composiciones y métodos para mejorar las respuestas inmunes en grande ya sea para pacientes con cáncer o VIH. La patente de Estados Unidos 5,888,552 describe las composiciones terapéuticas anti-cáncer que contienen proteínas del suero mientras que U.S. 5,456,924 describe un método de tratamiento del individuo VIH-seropositivo con proteínas del suero dietéticas.

30 Sería muy deseable que se proporcione con una matriz de proteínas biodegradable, maleable y no tóxica y un proceso para producir tal que puede cambiar o convertir un residuo industrial en un producto con un valor comercial y una actividad biológica.

35 Resúmen de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una matriz de proteína maleable (MPM) biodegradable y no tóxica.

40 Preferentemente, la invención se refiere a la matriz de proteínas del suero y exopolisacáridos. Además, la matriz de la presente invención se usa ventajosamente para reemplazar la grasa o para la incorporación o encapsulación de varias sustancias hidrófilas o lipófilas y particularmente sustancias usadas en alimento, cosmético, nutracéuticos y sectores farmacéuticos.

45 Otro objeto de la presente invención, es proporcionar un nuevo método para la recuperación de las proteínas del suero a partir del suero de leche que conduce a un nuevo tipo de producto a base de proteína de suero. Este nuevo producto se refiere hasta ahora como una matriz de proteína maleable (MPM), que es el producto de reacción de la aglomeración de las proteínas de suero presentes en el suero de leche después de un proceso de fermentación. Tiene la textura de una crema maleable que exhibe actividades biológicas y propiedades únicas para la incorporación (o encapsulación) de varias sustancias hidrófilas o lipófilas.

50 Es además un objeto de la invención para preparar varios tipos de MPM con diferentes propiedades, características y múltiples aplicaciones y para prepararlas directamente a partir de un residuo industrial (suero o suero de leche).

55 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un proceso para fabricar una matriz de proteína maleable, dicho proceso que comprende las etapas de:

- a) fermentar una solución de proteína de suero con bacterias en un medio;
- b) aglomerar proteínas a partir de la solución de proteínas de la etapa a); y
- c) aislar las proteínas aglomeradas a partir del sobrenadante;

60 caracterizado porque dichas bacterias comprende al menos una bacteria seleccionada de R2C2, INIX, ES 1 y K2.

65 El proceso de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicha etapa de fermentación es promovida mediante el co-cultivo de al menos dos microorganismos simultáneamente o sucesivamente.

- El proceso de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho proceso comprende además una etapa entre las etapas a) y b) por adición de un polisacárido.
- 5 El proceso de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho proceso comprende además una etapa entre las etapas b) y c) por adición de un polisacárido.
- 10 El proceso de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde la aglomeración de las proteínas fermentadas se efectúa por al menos un método seleccionado del grupo que consiste de adición de sal, modulación del pH, tratamiento térmico, adición de enzimas proteolíticas y adición de floculante.
- 15 El proceso de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, que comprende además una etapa de pasteurización de dicha solución de proteínas antes de la etapa a).
- El proceso de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicha etapa de pasteurización es seguida por una etapa de esterilización.
- 20 El proceso de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho floculante es un floculante bacteriano.
- El proceso de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho floculante bacteriano es *L. Kefirgranum*.
- 25 El proceso de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde la separación de las proteínas aglomeradas a partir del sobrenadante se realiza por un método seleccionado del grupo de centrifugación y filtración.
- De acuerdo con la presente invención, se proporciona una matriz de proteína maleable obtenible por el proceso de la presente invención.
- 30 La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, que comprende además un subproducto de fermentación de la fermentación de dicha solución que contiene dicha proteína por dicha bacteria.
- La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, que comprende además un péptido.
- 35 La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho péptido comprende al menos dos residuos de aminoácidos.
- La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho péptido comprende más de cien residuos de aminoácidos.
- 40 La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho subproducto de fermentación es un polisacárido.
- 45 La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho polisacárido se selecciona del grupo de exopolisacárido y polisacárido aniónico.
- La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho polisacárido contiene al menos cuatro porciones de sacáridos.
- 50 La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dichas porciones de sacárido se seleccionan del grupo que consiste en formas D y L de glucosa, fructosa, xilosa, arabinosa, fucosa, galactosa, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido acético, sulfato de 3,6-anhidrogalactosa, galactosa-4-sulfato, galactosa-2-sulfato, galactosa-2, 6-disulfato, manosa, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido gulurónico, ácido galactourónico, y ramnosa.
- 55 La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho polisacárido tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 15,000,000 daltons.
- 60 La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho peso molecular está en el intervalo de aproximadamente 5,000 a 6,000,000 daltons.
- La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho peso molecular está en el intervalo de aproximadamente 25,000 a 1,000,000 daltons.

La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho polisacárido se selecciona del grupo que consiste de heteropolisacárido, homopolisacárido y mezcla de estos.

5 La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho heteropolisacárido se selecciona del grupo que consiste de gelana, welana, goma arábica, goma karaya, goma okra, goma de aloe, goma de tragacanto, goma de *Anogeissus latifolia*, goma de semilla de membrillo, psyllium, galactanas, galactomananas, glucomananas, ácidos poliurónicos, sulfato de dextrano, heparina, pectina, alginato sódico y almidón arabinogalactana.

10 La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicha galactana se selecciona del grupo que consiste de agar, agarosa, kappa, carragenina, carragenina iota, carragenina lambda.

15 La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicha galactomanana se selecciona del grupo que consiste de goma de algarrobo y guar.

La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicha glucana se selecciona del grupo que consiste de celulosa y derivados de esta, almidón y derivados, dextranas, pululana, beta 1,3-glucanas, quitina, xantano y tamarindo.

20 La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicha glucomanana es konjac.

La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho ácido poliurónico se selecciona del grupo que consiste de algina, alginato y pectina.

25 La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, en donde dicho homopolisacárido es celulosa.

La matriz de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, que además comprende una a más bacterias se selecciona del grupo que consiste de *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*,
 30 *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium boum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium coryneforme*, *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium gallicum*, *Bifidobacterium gallinarum*, *Bifidobacterium indicum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium longum* DJO10A, *Bifidobacterium longum* NCC2705, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium merycicum*, *Bifidobacterium minimum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum*,
 35 *Bifidobacterium pullorum*, *Bifidobacterium ruminantium*, *Bifidobacterium saeculare*, *Bifidobacterium scardovii*, *Bifidobacterium subtile*, *Bifidobacterium suis*, *Bifidobacterium thermacidophilum*, *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *suis*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium urinalis*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Lactobacillus acidipiscis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus algidus*, *Lactobacillus alimentarius*,
 40 *Lactobacillus amyolyticus*, *Lactobacillus amyophilus*, *Lactobacillus amyovorans*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus arizonensis*, *Lactobacillus aviarius*, *Lactobacillus bifementans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coleohominis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis*, *Lactobacillus corniformis* subsp. *torquens*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus cypricasei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus durianis*,
 45 *Lactobacillus equi*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus ferintoshensis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus formicalis*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus fuchuensis*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus hamsteri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*, *Lactobacillus heterohiochii*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus homohiochii*, *Lactobacillus intestinalis*, *Lactobacillus japonicus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus keferi*, *Lactobacillus keferi*,
 50 *Lactobacillus kefirianofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus kimchii*, *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus letivazi*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus malefermentans*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus maltaromicus*, *Lactobacillus manihotivorans*, *Lactobacillus mindensis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus pantheris*,
 55 *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*, *Lactobacillus parakefri*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus psittaci*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus sakei* L45, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*, *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*,
 60 *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus sharpeae*, *Lactobacillus* sp. NGRI 0001, *Lactobacillus suebicus*, *Lactobacillus thermotolerans*, *Lactobacillus vaccinostercus*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus vermtiforme*, *Lactobacillus versmoldensis*, *Lactobacillus zaeae*, *Lactococcus gameae*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis*, *Leuconostoc argentinum*,
 65 *Leuconostoc camosum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc fallax*, *Leuconostoc ficulneum*, *Leuconostoc fructosum*,

Leuconostoc gasicomitatum, Leuconostoc gelidum, Leuconostoc inhae, Leuconostoc kimchii, Leuconostoc lactis, Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc niesenteroides subsp. cremoris, Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum, Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides, Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides ATCC 8293, Leuconostoc pseudomesenteroides, Propionibacterium acidipropionici, Propionibacterium acnes, Propionibacterium australiense, Propionobacterium avidum, Propionibacterium cyclohexanicum, Propionibacterium freudenreichii, Propionibacterium freudenreichii subsp. freudenreichii, Propionobacterium freudenreichii subsp. shermanii, Propionibacterium granulorum, Propionibacterium jensenii, Propionobacterium lumpiophilum, Propionibacterium microaerophilum, Propionibacterium propionicum y Propionibacterium thoenii.

10 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un microorganismo R2C2 aislado de un consorcio obtenido de grano de kéfir bajo el número de acceso NML 041202-3.

15 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un microorganismo K2 aislado de un consorcio obtenido de grano de kéfir bajo el número de acceso NML 041202-1.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un microorganismo ES1 aislado de un consorcio obtenido de grano de kéfir bajo el número de acceso NML 041202-2.

20 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un microorganismo INIX aislado de la cepa ATCC 43761.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición que comprende la matriz de la presente invención en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 De acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de la matriz de la presente invención para la fabricación de un producto seleccionado a partir del grupo de producto alimenticio, producto médico, producto farmacéutico, producto cosmético y nutracéutico.

30 De acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de la matriz de la presente invención para la fabricación de un producto alimenticio. Preferentemente, dicha matriz se utiliza como un estabilizador de emulsión o agente espesante. Preferentemente, dicho producto alimenticio se selecciona del grupo que consiste de mayonesa, aderezo, margarina, extensor, mantequilla, crema batida y sustituto bajo de grasa. Preferentemente, dicha matriz se usa como vehículo de entrega.

35 De acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de la matriz de la presente invención, en donde dicho uso es para el producto cosmético. Preferentemente, dicho producto cosmético se selecciona del grupo que consiste de loción para la piel, crema, protector solar, rubor, máscara, sombra de ojos, champú y acondicionador.

40 De acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de la matriz de la presente invención para la fabricación de un medicamento para aumentar la respuesta inmune en un sujeto.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de la matriz de la presente invención para la fabricación de un medicamento para reducir el nivel de triglicérido en un sujeto.

45 De acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de la matriz de la presente invención para la fabricación de un medicamento para reducir el nivel de TNF- α en un sujeto.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de la matriz de la presente invención para la fabricación de un medicamento para aumentar el nivel de glutatión en un sujeto.

50 El MPM de la presente invención además satisface una necesidad largamente sentida en diferentes sectores, a saber, en alimento (reemplazo de grasa, agente espesante), cosméticos (sistemas de entrega, efectos fisiológicos), nutracéuticos, alimentos funcionales, probióticos y farmacéuticos (sistemas de entrega oral, sistemas de entrega de fármacos modificadores de la respuesta biológica).

55 Breve descripción de las figuras

Fig. 1 ilustra un esquema general del proceso de preparación de MPM;

Fig. 2 ilustra un esquema detallado de la formación de la matriz;

Fig. 3 ilustra la formulación de la formulación de la matriz;

60 Fig. 4 ilustra un ejemplo de una implementación industrial de la presente invención; y

Las Figs. 5A-B ilustran la homología entre el gen ARN165 de las cepas INIX (sec. con núm. de ident. : 1), K2 (sec. con núm. de ident. : 2), R2C2 (sec. con núm. de ident. : 3), ES1 (sec. con núm. de ident. : 4), ATCC 43761 (sec. con núm. de ident. : 5) y ATCC 51647 (sec. con núm. de ident. : 6).

65

Descripción detallada de la invención

La invención consiste en una matriz de proteína maleable (MPM) producida a partir del suero residual fermentado obtenido de la industria del queso. El MPM se obtiene mediante la inducción de la aglomeración de proteínas del suero, que se recuperan después por varios medios. El proceso permite la producción de la matriz de proteína maleable e insoluble compuesta de 1) proteínas y/o péptidos, 2) una o varias cepas bacterianas, 3) sub-productos fermentados, 4) otros componentes obtenidos durante el proceso de aglomeración y recuperación de los aglomerados y 5) componentes presentes en la fase acuosa. Después de la aglomeración, la matriz resultante se recupera por filtración, centrifugación o con cualquier otro método que permitan dicha recuperación. La aglomeración de proteínas puede inducirse por, pero sin limitarse a, una modulación de pH, temperatura, adición de sales, adición de enzimas proteolíticas, adición de floculante o combinación de todos o algunos de esos métodos. La invención también describe varios parámetros que pueden afectar las características resultantes de la matriz como el componente bacteriano del MPM.

Esta matriz y su proceso de producción presentan grandes ventajas sobre la matriz y los procesos de producción conocidos en la técnica. El proceso de producción tal como que se describe más abajo permite la obtención de una formulación uniforme directamente a partir de lactosuero u otra fuente de proteína primaria cuando todos los componentes están presentes antes de la aglomeración. Los componentes se encuentran ya sea en el aglomerado y la fase acuosa del producto de fermentación después de la aglomeración. Una formulación que contiene MPM se produce para mezclar el MPM y otros productos que se introdujeron en la formulación con agua, aceite u otro líquido adecuado para tal formulación. Otra formulación se produce para liofilizar MPM e hidratarlas con una solución que contiene otros productos que se introducen en las formulaciones.

Los polímeros usados pueden ser de diferentes orígenes, tales como a partir de un microorganismo, de la planta y también pueden ser sintéticos. El polímero se mezcla con las proteínas antes, durante o después del proceso de aglomeración. La cantidad de polímeros atrapados en la matriz pueden variar para formar la matriz resultante. La fuente de proteínas usadas en el proceso de aglomeración puede ser de cualquier suero puro obtenido a partir de una fábrica de queso o de un concentrado de proteínas de suero (WPC, CPI) resuspendido en una solución acuosa. El proceso de aglomeración se precede por un proceso de fermentación para mejorar la calidad del producto final obtenido: sabor, color, textura, tiempo de conservación, propiedades funcionales, propiedades nutricionales, propiedades biológicas, propiedades farmacéuticas.

Fig. 1 ilustra la modalidad preferida del proceso de la presente invención que consiste en un proceso de fermentación de suero con una cepa pura de lactobacillus aislada de un consorcio obtenido a partir del grano de kéfir (número de acceso de la cepa R2C2: 041202-3 Laboratorio Nacional de Microbiología, Health Canada, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, Canadá, R3E 3R2). El primer paso es un pre-cultivo donde el cultivo de fermento liofilizado o congelado se usa para inocular el suero o medio de siembra adecuado para la especie usada como cepa pura de lactobacilo aislada de un consorcio obtenido a partir de granos de Kéfir (cepa R2C2). La fermentación se continúa para dar una concentración de bacteria de 10^8 a 10^9 bacterias por ml de pre-cultivo. El pre-cultivo se inocula después en la solución de suero o proteína en una cantidad a partir de 1 a 12,5%. El suero se puede usar como es, o suplementado con diferentes aditivos de cultivo adecuados para las especies usadas. Durante el proceso de proliferación, el lactobacilo produce un exopolisacárido (EPS), que se secreta en el medio, junto con algunas proteasas endógenas. Las proteasas endógenas presentes en el medio hidrolizan las proteínas del suero para generar péptidos con diversas longitudes e hidrofobicidad. El medio de suero se mantiene bajo condiciones de cultivo apropiadas para promover una rápida multiplicación de los microorganismos usados. Si necesario, se suministran una temperatura constante, pH, agitación, aireación y otras condiciones de cultivo. Para inducir la aglomeración de las proteínas del suero, varios medios se pueden usar para facilitar o inducir la formación de aglomerados como la modificación del pH, la adición de sales y el tratamiento térmico. Se necesita la agitación para proporcionar una buena homogeneidad de la matriz resultante que contienen microorganismos, péptidos, proteínas, y sub-productos fermentados. Se prefiere la centrifugación continua para promover una mejor homogeneidad de la matriz pero varios medios de recuperación se pueden usar además.

MPM se puede usar en una forma húmeda o seca y se puede liofilizar o secar por otros medios y una vez seca las MPM se comprimen también con una prensa Carver para formar tabletas sólidas. Las MPM liofilizadas son comprimibles sin necesidad de añadir cualquiera de los excipientes para formar las tabletas que pueden tener múltiples aplicaciones como la incorporación de probióticos o fármacos. Las tabletas se hidratan lentamente debido a su alto contenido de proteínas y se protegen de los agentes incorporados al pasar en el ambiente del estómago. La MPM puede integrar agua, aceite u otro solvente para mejorar sus propiedades generales. Las composiciones y/o formulaciones obtenidas son útiles en la ciencia de los alimentos, cosméticos, nutracéuticos, alimentos funcionales, probióticos y productos farmacéuticos.

Fig. 2 ilustra la formación de la matriz y la Fig. 3 ilustra formulaciones producidas con MPM.

El proceso descrito para producir MPM se realiza preferentemente de fuentes no concentrados de proteínas de suero como suero de leche. La exposición MPM una homogeneidad mejorada y un producto con propiedades

funcionales y organolépticas mejoradas, así como efectos beneficiosos sobre la salud debido a que el proceso de fermentación de la presente invención se lleva a cabo en una solución no concentrada. No existe por lo tanto ninguna necesidad de homogeneizar la matriz resultante con condiciones de alto cizallamiento como en los procesos conocidos en la técnica.

5 Fig. 4 ilustra un ejemplo de una implementación industrial del proceso de la presente invención. Como se muestra en la Fig. 4, se prepara un medio de precultivo con suero y extracto de levadura, seguido de la pasteurización de esta preparación. La solución pasteurizada se inocula después con fermento y se fermenta bajo el control para la obtención de un cultivo bacteriano de 10^8 - 10^9 bacterias por ml de precultivo. Una persona experta en la técnica entendería que la preparación del medio de precultivo no necesita ser parte del proceso de producción.

10 El suero se proporciona después en el fermentador al que se añade el medio de precultivo para la fermentación. Después de la terminación del proceso de fermentación, se logra la aglomeración de las proteínas fermentadas mediante uno o más de los métodos anteriormente descritos y las proteínas aglomeradas se aíslan del sobrenadante y almacenan hasta la entrega.

15 Las MPM descritos anteriormente tienen múltiples aplicaciones que se enumeran a continuación. MPM es un producto barato con una variedad de ventajas competitivas y aplicaciones. En la industria alimentaria/alimento funcional/ nutracéuticos, los MPM se puede usar como un agente de reemplazo de grasa, como un suplemento de proteína, como un producto alimenticio funcional que tiene una característica específica (estimulación del sistema inmune, disminución de los niveles de triglicéridos), como un bio-vehículo para los ingredientes, sabores, suplementos, aditivos alimentarios, vitaminas, en el cosmético y como cosmeceútico, el MPM se puede usar como agente de reemplazo de grasa y/o petróleo, como un suplemento de proteína en lociones y cremas para el cuerpo, como producto cosmeceútico que tiene características específicas (aumento *in situ* de la producción de colágeno), como un bio-vehículo del agente terapéutico, suplementos, y vitaminas. Desde el punto de vista de productos farmacéuticos, las MPM se pueden usar como un bio-vehículo para agentes terapéuticos, para aumentar formulación oral o fármacos genéricos (excipiente), para mejorar los índices terapéuticos de fármacos (sinergia), para reducir los efectos secundarios de los fármacos y aumentar la biodisponibilidad.

30 Proteínas

Aunque la fuente preferida de proteína de la invención es el suero de leche, el proceso también se puede aplicar a la solución de proteína diluida. El término "proteína" cuando se usa de acuerdo con esta invención significa una cadena de péptido que tiene al menos dos residuos de aminoácidos, preferentemente al menos cuatro, y más preferentemente más de un centenar de residuos de aminoácidos. Más preferentemente, la proteína es un polipéptido de alto peso molecular que es preferentemente soluble en agua.

35 La fuente de proteína usada en la invención es el suero. Preferido es de suero que es una mezcla de proteínas de suero obtenidas de la leche de vaca después de la elaboración de queso.

40 MPM puede convertirse en una solución a las dificultades encontradas en la formulación de proteínas. MPM se puede formular en cremas, por ejemplo bajo condiciones ya sean ácidas o alcalinas sin afectar la textura y apariencia de la crema.

45 Polímeros

Varios polímeros se pueden usar en la producción de MPM. Son ya sea sintético o natural. Sin embargo, una variedad de exopolisacáridos y polisacáridos son adecuados para la preparación de la MPM usada en las composiciones de la invención, siempre que los exopolisacáridos y polisacárido contienen un número suficiente de grupos hidrófilos para dar lugar al MPM resultante. Además, el polisacárido debe ser capaz de reaccionar con la proteína para formar un MPM que tiene una proporción de proteína/polisacárido suficiente para causar la agregación. El término "polisacárido" cuando se usa de acuerdo con la invención significa un polisacárido que contiene al menos cuatro restos sacárido. El término "porción de sacáridos" significa un aldehído o cetona polihidroxi, o producto de hidrólisis de ácido del mismo, que, preferentemente, tiene la fórmula general $C_x(H_2O)_y$. Los ejemplos de porciones de sacáridos incluyen las formas D y L de glucosa, fructosa, xilosa, arabinosa, fucosa, galactosa, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido acético, galactosa, sulfato de 3,6-anhidrogactosa, galactosa-4-sulfato, galactosa-2-sulfato, galactosa-2, 6-disulfato, manosa, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido gularónico, ácido galactourónico, ramnosa, y otros. Preferentemente los polisacáridos usados para preparar la MPM tienen pesos moleculares en el intervalo de aproximadamente 500 a 15,000,000 daltons, preferentemente 5,000 a 6,000,000, con mayor preferencia 25.000 a 1,000,000 daltons.

50 Estos polisacáridos se añaden exógenamente o producidos por un microorganismo. Los ejemplos de polisacáridos aniónicos adecuados incluyen galactanas, galactomananas, glucomananas, ácidos poliurónicos, y similares, que exhiben el número requerido de grupos hidrófilos colgantes. Las galactanas adecuadas son agar, agarosa, carragenina kappa, carragenina iota, carragenina lambda, y similares. Los ejemplos de las galactomananas

5 adecuadas son goma de algarrobo y guar; los ejemplos de glucanas son celulosa y derivados de estas, almidón y derivados, dextranas, pululana, beta 1,3-glucanas, quitina, xantano, tamarindo y similares; los ejemplos de glucomananos son konjac; los ejemplos de ácidos poliurónico son algina, alginatos, pectinas; los ejemplos de heteropolisacáridos son gelana, welana, goma arábiga, goma karaya, goma okra, goma de aloe, goma de tragacanto, goma de *Anogeissus latifolia*, goma de semilla de membrillo, psyllium, almidón arabinogalactana etcétera. Además son adecuados el sulfato de dextrano, heparina, pectina, alginato sódico, y mezclas de estos.

10 Estos polisacáridos pueden modificarse además como se enseña en Aoki, T. T.; Araki & M. Kitamikado; 1990, *Vibrio* sp. AP-2. Pat. Eur. J. Biochem, 187, 461-465, a condición de que contenga el número requerido de grupos colgantes hidrófilos. También adecuados para su uso en las composiciones de la invención son los galactanos químicamente modificados, tales como las que se enseñan en un artículo escrito por K. B. Guiseley en *Industrial Polysaccharides; Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications*, Editado por M. Yalpani, 1987, Elsevier Science Publishers. El artículo Guiseley enseña métodos para la modificación química de agar para obtener propiedades óptimas de gelificación. En general, cualquier modificación de los galactanos que no afectan a la
15 conformación helicoidal (es decir, que se obtiene a través del enlace de la O6 y O4 de galactosa al O2 de 3,6-anhidrogalactosa) preservará la capacidad de gelificación y es adecuado para su uso en las composiciones de la invención siempre que el número requerido de grupos hidrófilos están presentes. Los grupos hidrófilos proporcionan un polisacárido que es soluble en agua. Muchos otros polímeros se puede añadir antes, durante o después del proceso de fermentación. Ellos se pueden usar para cambiar 1) las propiedades funcionales de las MPM, 2) las propiedades físicas de la química de las MPM, 3) la agregación de proteínas, 4) la capacidad para formular o encapsular diversos componentes de los varios sectores, como alimentos, cosméticos, productos nutracéuticos y productos farmacéuticos y 5) la actividad biológica de las MPM. Los ejemplos de polímeros como el polietilenglicol, polietilenoimina, poliésteres, copolímeros de mono-, di-, tri-bloque o cualquiera de los polímeros que ayudan a la formación de los sistemas coloidales se podrían usar para mejorar las MPM.

25 Microorganismos

30 La bacteria usada en la invención es R2C2 (número de acceso 041202-3, Laboratorio Nacional de Microbiología, Health Canada, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, Canadá, R3E 3R2), INIX, ESI y/o K2. El proceso puede integrar además una variedad de otras bacterias solas o en combinación como *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium boum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium coryneforme*, *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium gallicum*, *Bifidobacterium gallinarum*, *Bifidobacterium indicum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*,
35 *Bifidobacterium longum* DJ010A, *Bifidobacterium longum* NCC2705, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium merycium*, *Bifidobacterium minimum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *pseudolongum*, *Bifidobacterium ifidobacterium pseudolongum subsp. globosum*, *Bifidobacterium pllorum*, *Bifidobacterium ruminantium*, *Bifidobacterium saeculare*, *Bifidobacterium scardovii*, *Bifidobacterium subtile*, *ifidobacterium suis*, *Bifidobacterium thermacidophilum*, *Bifidobacterium thermacidophilum subsp. suis*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium urinalis*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Lactobacillus acidipiscis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus algidus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus arizonensis*, *Lactobacillus aviarius*, *Lactobacillus bifementans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coleohominis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis*,
40 *Lactobacillus coryniformis subsp. torquens*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus cypricasei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus durianis*, *Lactobacillus equi*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus ferintoshensis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus formicalis*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus fuchuensis*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus hamsteri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus helveticus subsp. jugurti*, *Lactobacillus heterohiochii*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus homiohiochii*, *Lactobacillus infestinalis*, *Lactobacillus japonicus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefirii*, *Lactobacillus kefirnofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus kimchii*, *Lactobacillus kumkeei*, *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus letivazi*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus malefermentans*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus maltaromicus*,
45 *Lactobacillus manihotivorans*, *Lactobacillus mindensis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus pantheris*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *Lactobacillus paracasei subsp. tolerans*, *Lactobacillus parakefirii*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus psittaci*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus sakei* L45, *Lactobacillus salivarrus*, *Lactobacillus salivarius subsp. salicinii*, *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus sharpeae*, *Lactobacillus sp. NGRI 0001*, *Lactobacillus suebicus*, *Lactobacillus thermotolerans*, *Lactobacillus vaccinostrercus*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus vermiforme*, *Lactobacillus versmoldensis*, *Lactobacillus zaeae*,
50 *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. hordniae*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis bv. diacetylactis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus*

5 *plantarum*, *Lactococcus raffinolactis*, *Leuconostoc argenfinum*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc citreum*,
Leuconostoc fallax, *Leuconostoc ficulneum*, *Leuconostoc fructosum*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc*
gelidum, *Leuconostoc inhae*, *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc*
mesenteroides subsp. cremoris, *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides*
10 *subsp. mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides* ATCC 8293, *Leuconostoc*
pseudomesenteroides, *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium australiense*,
Propionibacterium avidum, *Propionibacterium cyclohexanicum*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium*
freudenreichii subsp. freudenreichii, *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii*, *Propionibacterium*
granulosum, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium lymphophilum*, *Propionibacterium microaerophilum*,
15 *Propionibacterium propionicum*, *Propionibacterium thoenii*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*,
Saccharomyces unisporus, *Saccharomyces globosus*, *Saccharomyces carisbergensis*, *Kluyveromyces fragilis*,
Kluyveromyces bulgaricus, *Kluyveromyces lactis*, *Torula holmii*, *Candida tenuis*. Las bacterias son preferentemente
homolácticas pero pueden ser heterolácticas.

20 Una MPM puede usar varios géneros y especies y se expondrán ejemplos para demostrar que modifican las
propiedades funcionales de las MPM como su hidratación y capacidades de emulsificación, sus efectos beneficiosos
en la salud o sus respectivos tiempos de conservación. Las MPM generadas con la cepa probiótica como
Lactobacillus plantarum permite una mejor estimulación de la flora intestinal. Las MPM generadas con *Lactococcus*
lactis permiten la producción de bacteriocina, nisina, que conduce a un tiempo de conservación mejorada de las
25 matrices. Las MPM generadas con *Lactobacillus kefiranofaciens* o *L. ramosus* 9595 permiten una mejor
estimulación positiva global del sistema inmunológico por sus EPS, Murofushi y otros 1986. Immunopharmacology.
Vol. 12. págs. 29-35. MPM puede prolongar la conservación de los productos en los que se agregó o incorporó. El
yogur que contiene MPM exhibió una mejor vida en estante que el yogur libre de MPM. Además, la MPM puede
30 ayudar a mantener la supervivencia de los microorganismos durante un período prolongado de tiempo. Además, la
MPM en el yogur sirve como un agente estabilizante y reemplaza cualquier gelatina, pectina o almidón de maíz.

En el procedimiento de la presente invención, el cultivo de una bacteria puede favorecer el crecimiento de un
segundo o más microorganismos en una fermentación secuencial. Una primera fermentación de las bacterias
lácticas permite el crecimiento de las bacterias más exigentes como las bifidobacterias y propiónibacterias.

35 El aislamiento de las cepas bacterianas (R2C2, K2, ES1) se realizó en agares RCW como se describe por Kojima, S.
y otros, 1993, Biosei. Biotech. Blochem. Vol. 57, núm. 1, págs: 119-120. Los granos de kéfir se homogeneizaron con
un mezclador en una solución isotónica y estéril (triptona 8,5 g/l + NaCl 1 g/l). Esta solución se usó para la
inoculación en agar RCW.

40 Se aislaron diferentes tipos de colonias. Las cepas seleccionadas son gram positivas, no móviles, catalasa negativas
y cepas homofermentadoras. Las cepas son opcionalmente anaeróbicas, no crecen a 15 °C y tienen una fisiología
similar que las especies descritas en Fujisawa y otros, International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 38. núm.
1. págs: 12-14. Las cepas se compararon con la cepa de referencia ATCC # 43761 para el patrón de fermentación
de azúcar, como se ilustra en la Tabla 1. Además, las cepas se compararon con las cepas de referencia ATCC
43761 y 51647 para la homología de 16S como se muestra en las Figs. 5A-B. Las cepas se compararon con la cepa
de referencia ATCC 43761 para patrón de fermentación de azúcar (como se ilustra en la Tabla 1) y con la cepa de
45 referencia ATCC 43761 y 51647 para la homología de ARN 16S (como se ilustra en la Tabla 2). Las cepas aisladas
se clasificaron en el género *Lactobacillus*, y las especies *kefiranofaciens*.

Tabla 1

Perfil de fermentación de azúcar a partir de APA 50 CH y medio API 50 CHL.				
Sustratos	R2C2	INIX	K2	ES1
Glicerol	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-
D-Arabinosa	-	-	-	-
L-Arabinosa	-	-	-	-
Ribosa	-	-	-	-
D-xilosa	-	-	-	-
L-xilosa	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-
β-Metil glicósido	-	-	-	-
Galactosa	+++	+++	+++	+++

ES 2 451 618 T3

Perfil de fermentación de azúcar a partir de APA 50 CH y medio API 50 CHL.				
Sustratos	R2C2	INIX	K2	ES1
D-Fructosa	+++	+++	+++	+++
D-Manosa	++	+++	+++	+++
L-Sorbosa	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
Manitol	+++	+++	-	+++
Sorbitol	-	-	-	-
α-Metil-D-Manosida	-	-	-	-
α-Metil-D-glucósido	-	-	-	-
N-acetilo glucosamina	++	++	++	++
Amigdalina	-	-	-	-
Arbutina	-	-	-	-
Esculina	++	-	+++	+++
Salicina	+	++	+++	-
Celobiosa	-	-	+++	-
Maltosa	++	+++	-	+++
Lactosa	+++	+++	+++	+++
Melbiosa	-	-	-	-
Sacarosa	+++	++	-	+++
Trehalosa	+++	+++	-	+++
Inulina	-	-	-	-
Melezitosa	-	-	-	-
D-Rafinosa	+	++	-	+++
Almidón	-	-	-	-
Glicógeno	-	-	-	-
xilitol	-	-	-	-
β-Gentibiosa	-	-	+++	-
D-Turanosa	-	-	-	-
D-Lixosa	-	-	-	-
D-Tagarosa	-	-	-	-
D-Fucosa	-	-	-	-
L-Fucosa	-	-	-	-
D-Arabitól	-	-	-	-
L-Arabitól	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-
2-ceto-gluconato	-	-	-	-
5-ceto-gluconato	-	-	-	-

Factores que influyen la aglomeración

5 La sal es un factor para la recuperación de la MPM. En una modalidad preferida, el CaCl_2 se usa, pero se podría reemplazar además por cualquier sal que se conoce en la técnica por tener un efecto sobre la aglomeración de proteínas como el pirofosfato de sodio. Para el mismo propósito, se pueden variar parámetros como el pH, temperatura, hidrólisis enzimática para promover la aglomeración de las proteínas para formar una matriz.

Ciencia del alimento

10 Existe una necesidad de un polisacárido producido por un microorganismo de grado alimentario, que tiene propiedades similares o incluso superiores a la goma de xantano. Tal exopolisacárido (EPS) se puede añadir ya sea al producto alimenticio y el producto resultante se tiene que etiquetar (pero el producto después es un aditivo denominado "etiquetado sin riesgo"), o se puede producir *in situ* sin la necesidad de cualquier etiquetado, porque el microorganismo es de calidad alimentaria. Se prefiere el uso de este tipo de microorganismos para la producción de MPM así el MPM producido ofrece características ya sea de proteínas y propiedades EPS. Las MPM se pueden usar como un agente de sustitución de la grasa, como un suplemento de proteína, como un producto alimenticio funcional que tiene una función específica (estimulación del sistema inmunológico, disminución de los niveles de triglicéridos), como un bio-vehículo para los ingredientes, sabores, suplementos, aditivos alimentarios, vitaminas, etc.

20 Cosméticos

25 La MPM combinada en una matriz de polisacáridos y proteínas se puede usar en una amplia variedad de composiciones, que incluyen base de maquillajes, lociones para la piel y cremas, protectores solares, rubores, máscaras, sombras de ojos, además de los productos de cuidado del cabello tales como champús, acondicionadores, y similares. Los intervalos sugeridos de MPM son 0,01-95%, preferentemente 0,05-50%, con mayor preferencia 0,1-30% en peso de la composición total. La composición en la que el MPM se incorpora puede contener al menos un surfactante, que puede ser un surfactante aniónico, anfotérico, no iónico, catiónico, o zwitteriónico.

30 Las MPM son adecuadas para el uso en bases de maquillaje o cosméticos de color tal como sombra de ojos, rubor, corrector, o composiciones delineadoras en forma de líquido, crema, sólido o barra. Las composiciones adecuadas pueden ser emulsiones agua-en-aceite o aceite-en-agua, pero son preferentemente emulsiones de aceite-en-agua. Tales composiciones generalmente comprenden: 0,01-95% MPM, 0,5-95% de agua, 0,5-25% de materia particulada, 0,01-20% surfactante, y 0,1-95% de aceite. Adicionalmente, estas composiciones pueden contener además ingredientes seleccionados a partir del grupo de humectantes, conservantes, aceites no volátiles o volátiles, agentes gelificantes, y mezclas de estos.

35 Nutracéuticos

40 La MPM de la presente invención posee la suma sinérgica de los efectos fisiológicos de los exopolisacáridos, proteínas de suero, bacterias, productos de la fermentación que son partes de la MPM, y así se puede usar en productos nutracéuticos.

45 Las MPM tienen múltiples ventajas además en el campo de los probióticos. Primero, las MPM constituyen un medio para producir probióticos a un bajo costo. Durante la recuperación de MPM, todas las bacterias en suspensión se recuperan en las MPM, lo que representa alrededor de 5% del volumen fermentado y así un factor de concentración de 20. Una solución fermentada, que contiene 1×10^9 bacterias genera una concentración de 2×10^{10} bacterias en las MPM. La producción de probióticos al mismo tiempo conducirá a la recuperación de componentes que tienen beneficios para la salud como proteínas, péptidos y subproductos de fermentación tales como exopolisacáridos, vitaminas, proteínas bacterianas, etc. Las MPM constituirán además un vehículo multifuncional para los probióticos. Las MPM permiten la incorporación de sustancias hidrofóbicas o hidrofílicas que se pueden usar para proteger, sinergizar y alimentar a los probióticos. Por ejemplo, la vitamina C, que es hidrofílica, ayuda a mantener la viabilidad de los probióticos concentrados. La presencia de ciertos exopolisacáridos (como por ejemplo oligogalactosacáridos) tiene un efecto prebiótico (sinergia) en la estimulación de la flora intestinal o la presencia de vitamina E (hidrofóbica), tiene efecto protector sobre la viabilidad del microorganismo (antioxidante) y un efecto nutritivo (vitamina). Adicionalmente, debido a su composición en proteínas, las MPM son potencialmente capaces de proteger la viabilidad de los probióticos. Finalmente, MPM puede servir como un vehículo en formas diferentes, húmedas, liofilizadas o en tabletas comprimidas. Todas las formas constituyen ventajas en el campo de los probióticos. Las MPM húmedas son fáciles de formular como se muestra en las formulaciones alimentarias, cosméticos sugiriendo así las mismas para la formulación de probióticos. Las MPM liofilizadas, ofrecen una protección potencial importante debido a su contenido en proteínas y la posibilidad de la incorporación de sustancias protectoras hidrofílicas e hidrofóbicas. Las MPM liofilizadas son compresibles sin la necesidad de añadir cualquiera de los excipientes para formar tabletas que se pueden usar para la incorporación de los probióticos o fármacos.

65

Farmacéuticos

Varios fármacos se pueden formular con la MPM y que se pueden entregar por vía oral y por vía tópica.

5 Una pluralidad de productos relacionados farmacéuticamente y fármacos o materiales bioactivos se pueden formular con MPM como pequeñas moléculas de varias clases (hidrofílicas e hidrofóbicas), proteínas, ARN, oligonucleótidos, ADN, virus, bacterias. Los ejemplos o tipos de materiales bioactivos que se usan en la MPM y métodos de la presente invención incluyen cualquier agentes farmacéuticos, que incluyen, pero sin limitarse a los fármacos anti-inflamatorios, analgésicos, fármacos anti-artríticos, antiespasmódicos, antidepressivos, antipsicóticos, tranquilizantes, 10 fármacos contra la ansiedad, narcóticos, antagonistas, agentes antiparkinsonianos, agonistas colinérgicos, fármacos quimioterapéuticos, agentes inmunosupresores, agentes antivirales, agentes antibióticos, supresores del apetito, antieméticos, anticolinérgicos, antihistamínicos, agentes antimigrañosos, vasodilatadores coronarios, cerebrales o periféricos, agentes hormonales, anticonceptivos, agentes antitrombóticos, diuréticos, agentes antihipertensivos, fármacos cardiovasculares, opioides, y similares.

15 Materiales bioactivos adecuados incluyen además agentes terapéuticos y profilácticos. Estos incluyen, pero sin limitarse a cualquier modificador biológico terapéuticamente eficaz. Tales modificadores incluyen, pero sin limitarse a lípidos, compuestos orgánicos, proteínas y péptidos (sintéticos y naturales), péptidos miméticos, hormonas (péptidos, esteroides y corticosteroides), polímeros de aminoácidos D y L, oligosacáridos, polisacáridos, nucleótidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos, que incluyen ADN y ARN, híbridos de ácidos nucleicos de proteínas, moléculas pequeñas y análogos fisiológicamente activos de estos. Además, los modificadores se pueden derivar de fuentes naturales o preparar por medios recombinantes o sintéticos e incluyen análogos, agonistas y homólogos. Como se usa en la presente "proteína" se refiere además a péptidos y polipéptidos. Tales proteínas incluyen, pero sin limitarse a 20 enzimas, biofármacos, hormonas de crecimiento, factores de crecimiento, insulina, anticuerpos monoclonales, interferones, interleuquinas y citoquinas. Los orgánicos incluyen, pero sin limitarse a los productos químicos farmacéuticamente activos con grupos amino, imino y guanidino. Las hormonas esteroides adecuadas incluyen, pero sin limitarse a estrógeno, progesterona, testosterona y análogos fisiológicamente activos de estas. Numerosos análogos de hormonas esteroides se conocen en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a estradiol, SH-135 y tamoxifeno. Como se usa en la presente, "ácidos nucleicos incluye ADN, ARN y análogos fisiológicamente activos de estos. Los nucleótidos pueden codificar genes individuales o pueden ser cualquier vector conocido en la técnica de ADN recombinante que incluyen, pero sin limitarse a, plásmidos, retrovirus y virus adeno-asociado.

35 Las MPM descritas en la presente invención tienen una ventaja sobre la píldora de tabletas convencionales en los pacientes descritos anteriormente, ya que es un vehículo no sólido biodegradable, cremoso, que se puede tragar fácilmente. Ciertos polisacáridos encontrados en las MPM, como los productos kefiran de *L.Kefiranofaciens*, se conocen por pasar a la circulación sanguínea. Estos polisacáridos, péptidos y bacterias encontrados en los diferentes MPM aumentan la absorción de algunos medicamentos.

40 Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran además la invención y no se deben contemplar en cuanto a limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Preparación de MPM

45 La preparación de una MPM típica se describe en el siguiente Ejemplo.

50 El suero obtenido a partir de la producción de queso cheddar se esteriliza por filtración (0.22 μm). El suero esterilizado está contenido en una cámara de fermentación en el momento de la inoculación con la cepa R2C2. Un pre-cultivo se prepara para obtener una concentración de bacterias de 10^8 a 10^9 por ml de medio de precultivo. La inoculación se realiza con un volumen de medio de precultivo (10^8 R2C2/ml) correspondiente al 1% y 15%, pero preferentemente 10% del volumen final de suero. El proceso de fermentación se realiza a 37 °C y a pH controlado en 5. El pH se controla por la adición de NaOH. La agitación se mantiene a un mínimo para permitir una distribución uniforme, pero sin causar una aireación excesiva. El proceso de fermentación se lleva a cabo durante un período de 55 16 a 36 horas, dependiendo de las características requeridas. Siguiendo el proceso de fermentación, se añade entre 0,1% y 1,5%, pero preferentemente 1% de CaCl_2 (p/v) y se ajusta el pH entre 6,5 y 8, pero preferentemente 7,5. Las MPM resultantes son maleables, parecen un pudín de color cremoso blanco sin sabor u olor apreciable. La recuperación de la matriz se realiza por centrifugación. Numerosas fuerzas centrífugas son adecuadas dependiendo de las características funcionales deseadas. Sin embargo, muchas pruebas indicaron que se prefiere una fuerza centrífuga de 3500 RCF (Fuerza Centrífuga Relativa) para la producción de una matriz con propiedades funcionales adecuadas y que una fuerza centrífuga entre 3500 y 7476 RCF además es adecuada.

65 Un proceso alternativo es mediante el uso de ES1, INIX, K2 o R2C2 y un proceso comparativo *Lactobacillus helveticus* ATCC 10386, *Lactobacillus kefirgranum* ATCC 51647, *Lactobacillus ramnosus* ATCC 7469, *Lactobacillus zeae* ATCC 15820 o *Lactococcus lactis* ATCC 11454 y controlando las condiciones de cultivo de pH y temperatura a

los valores de control que se muestran en la Tabla 2. Un proceso alternativo es ajustar el pH inicial al valor de control del microorganismo usado como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Parámetros para diferentes cepas		
Cepas	Temperatura (°C)	pH
ES1	37	5
INIX	37	5
K2	37	5
R2C2	37	5
ATCC10386	42	5,5
ATCC 51647	30	5,5
ATCC 7469	42	6
ATCC 15820	42	6
ATCC 11454	24	6

5 En otro proceso alternativo, el lactosuero se pasteuriza antes de la fermentación y la solución fermentada se pasteuriza de nuevo antes de la separación de las MPM de los co-productos. Esta alternativa, sin embargo no se usa cuando se necesitan las bacterias activas en el producto final.

10 En un proceso alternativo adicional, se realiza una doble inoculación con R2C2 y *Lactococcus lactis* para obtener un co-cultivo. Las dos especies se pueden cultivar además juntas para la inoculación futura.

15 En otro proceso comparativo, la cepa usada es *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875, que produce ácido propiónico. La temperatura de fermentación es 30 °C, el pH es 7, y la fermentación se realiza por un período de 96 horas. Los extractos de levadura se pueden suplementar en proporciones de 0,5 a 1% (p/v) para estimular la producción de ácido propiónico. Cuando se usan bacterias anaerobias, el proceso puede usar adición de gases como CO₂ o nitrógeno para eliminar el oxígeno y/o aumentar la presión parcial de CO₂.

20 **Ejemplo 2**

Composición de aderezo sólido para ensaladas

25 La matriz se incorpora en las proporciones como se ilustra en la Tabla 3, para producir un aderezo sólido para ensalada. De esta manera, se obtiene un sabroso, cremoso y firme aderezo similar a la mayonesa.

Así, la formulación del aderezo se caracteriza por el hecho de que el aderezo, cuando se refrigera a 4 °C, mantiene todas sus propiedades. La matriz puede sustituir a las yemas de huevo como emulsionantes y estabilizantes en las emulsiones aceite-agua y la matriz puede emulsionar tanto como su propio volumen de aceite.

30 El aderezo para ensaladas se prepara añadiendo azúcar al MPM con agitación para evitar el apelmazamiento, añadiendo vinagre y jarabe de maíz y agitando con una batidora Osterizer a la velocidad máxima por 30 segundos, añadiendo aceite de maíz rápidamente a la jarra de la batidora y manteniendo la mezcla por 1 minuto y se almacena el aderezo para ensalada a 4 °C por al menos 24 horas.

TABLA 3

Composición de aderezo sólido para ensaladas	
	%
MPM	37.6
Aceite para ensaladas (maíz)	37.3
Jarabe de maíz	3.7
Azúcar	1.5

Ejemplo 3

Composición de leche con chocolate

- 5 Una leche con chocolate se produce mezclando leche y MPM con un homogeneizador ultraturrax, añadiendo el ingrediente seco, añadiendo los ingredientes líquidos hasta que los ingredientes secos estén completamente en solución y refrigerando a 4 °C por al menos 24 horas. Los ingredientes son enumerados en la Tabla 4.

Tabla 4

Composición de leche con chocolate	
	%
Leche	53.5
MPM	40.8
Azúcar	4.7
Sabor chocolate	0.2
Cacao	0.1
Potenciador lácteo	Para satisfacer el 100%

10

Ejemplo 4

Composición de mantequilla ligera

- 15 Una mantequilla ligera se produce ablandando la mantequilla a temperatura ambiente, mezclando mantequilla y MPM, homogeneice la mezcla mediante el uso de homogeneizador ultraturrax hasta que se alcanza la mezcla suave y refrigere a 4 °C por al menos 24 horas. Los ingredientes son enumerados en la Tabla 5.

Tabla 5

Composición de mantequilla ligera	
	%
mantequilla	50-85
MPM	15-50

20

Ejemplo 5

Uso de MPM como agente espesante en yogurt

- 25 El yogurt es un producto lácteo obtenido a través de la fermentación de la leche por cepas bacterianas específicas que convierten parte de la lactosa en ácido láctico tales como *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. La leche coagula cuando se produce una cantidad suficiente de ácido láctico.

- 30 Dado que las virtudes del yogurt se asocian entre otras cosas con la acción de las bacterias en el intestino, es importante su presencia en un número suficiente. Con respecto a esto, el yogurt debe por ley, en varios países, contener al menos 10 millones de bacterias por gramo en el momento de su comercialización.

- 35 Los estándares de la composición estipulan que el yogurt no debe contener menos del 9.5% de sólidos no grasos de la leche y no menos de 3.0% de proteína. Puede contener además algunos ingredientes que provienen de la leche (ya sea leche en polvo entera o descremada o leche evaporada concentrada), frutas, jugos de frutas o extractos, mermeladas, cereales o cualquier otro aroma, edulcorantes, una cantidad que no supere el 2.0% de agentes de textura (estabilizantes, gelificantes, espesantes o emulsionantes), ácido cítrico, colorante de alimentos y, en el caso de yogurt con frutas adicionales, zumos de fruta o extractos o mermeladas, un conservante que no excedan 50 ppm.

- 40 El uso potencial de la MPM, como agente espesante en el yogurt, puede ser posible para mejorar la textura y viscosidad en la sustitución de carragenina, pectina, gelatina y almidón de maíz, entre otros. La MPM puede ser de interés como un ingrediente de la leche en un producto lácteo ya que es un ingrediente de caloría baja.

Ejemplo comparativo 6

MPM como un vehículo para preservar los microorganismos vivos

- 5 MPM puede mantener bacterias en la vida por un largo periodo de tiempo. Tres muestras de MPM R2C2 (producida con tres fuerza de centrifuga diferente: 1592, 3500 y 7476 RCF) se conservaron a 4 °C durante 11 meses. Después de ese período de tiempo, una pequeña cantidad de MPM se inoculó en agar RCW. Los geles se incubaron sin oxígeno a 37 °C por 5 días. Después de la incubación, la cepa R2C2 se aisló de las muestras. Se encontró que MPM puede mantener bacterias en vida por un período prolongado de tiempo y por lo tanto se puede usar como
- 10 vehículo probiótico.

Ejemplo comparativo 7

Producción de MPM que contiene una cepa probiótica

15

TABLA 6

Parámetros de producción	
Parámetros	Lactobacillus rhamnosus 7469
* recuento de bacterias	5,1 x 10 ⁸ b/ml
Ácido láctico; t0	0,439 g/l
Ácido láctico, Fin de la fermentación	1,67 g/l
Ácido láctico en la solución residual	0,215 g/l
MPM	15,82 g/kg
Total de glúcidos, t0	59,25 g/l
Glúcido al final	51,0 g/l
Glúcido en MPM	48,0 g/l
Lactosa a T0	45,52 g/l
Lactosa al final	39,68 g/l
Lactosa en la solución residual	42,40 g/l
Lactosa en MPM	20,70 g/kg
Rendimiento de MPM	28,69 g/l
% humedad	84,67%
% materia orgánica	9,01%
% minerales	4,95%

* a partir del cultivo antes de la recuperación de las MPM. El recuento en las MPM es 20 veces mayor.

Ejemplo 8

- 20 Producción de maquillaje

La MPM como preparado a partir del método descrito en el Ejemplo 1 se usó para preparar dos formulaciones de barras de maquillaje como sigue:

25

TABLA 7

Formulaciones de maquillaje		
Fórmula	COMPONENTES	% p/p
A	Estearato sódico	7.56
	agua	43.77
	Fenoxietanol	0.50
	Propilparabén	0.10

Formulaciones de maquillaje		
Fórmula	COMPONENTES	% p/p
	Metilparabén	0.30
	Butilenglicol	13.04
	Cloruro cálcico	0.80
	MPM	0.80
	PEG-20 sesquiostearato de metil glucosa	3.49
B	Aceite de ricino hidrogenado	2.00
	Alcohol isoestearílico	5.74
	Dióxido de titanio	0.74
	Amarillo de óxido de hierro	1.05
	Rojo de óxido de hierro	0.33
	Óxido negro de hierro	0.13
	Talco	2.23
	Dimeticona	11.63
	Dióxido de titanio/trimetiloetano	6.30

Ejemplo 9

Preparación de una loción para la piel

5

Una loción para la piel se preparó de acuerdo con la siguiente fórmula:

Tabla 8

Formulación de loción para la piel	
Componentes	% p/p
MPM	1.60
EDTA trisódico	0.10
Butilenglicol	5.00
Estearato de sorbitán/cocoato de sacarosa	6.00
Metilparabén	0.25
Etilparabén	0.15
goma xantana	0.30
Octilmetoxicinamato	7.50
Octilsalicilato	5.00
Benzofenona-3	3.00
C12-15 alquil benzoato	8.00
Alcohol cetílico	1.00
Fenoxietanol	1.00
Propilparabén	0.10
agua	csp

10

Ejemplo 9

Encapsulación de azul tripán y fluoresceína con las MPM

5 Las moléculas marcadoras como azul tripán y fluoresceína se encapsularon en las MPM a varias concentraciones. Se usaron estas formulaciones para realizar experimentos *in vitro* e *in vivo* para estudiar los parámetros farmacocinéticos como la absorción, biodisponibilidad, distribución, metabolismo y excreción de formulaciones orales basadas en MPM. La solubilidad, estabilidad, liberación se analizaron y compararon con los marcadores libres. Se encontró que las MPM tienen alta capacidad de encapsulación y permiten una mejora general de los parámetros farmacocinéticos generales.

15 Para evaluar la eficacia de una sonda fluorescente (Fluoresceína (Sigma, Canadá)) para penetrar en el torrente sanguíneo en la complejación con un potencial portador de fármaco, se usaron ratas hembras Wistar de 8 semanas. El peso promedio de la rata fue 200 g y se alimentaron *libremente*. La fluoresceína (5 mg/Kg de peso corporal) se agitó en vórtex ya sea en solución salina 0,9% o en MPM antes de la alimentación forzada. 3 ratas/grupo se alimentaron con 1 ml de solución mixta a través de agujas de alimentación en T0 (Tiempo). La fluoresceína sólo estaba presente en la primera alimentación forzada. Las ratas se alimentaron a la fuerza dos veces al día en un intervalo de 4 horas. 300 µl de muestras de sangre se recogieron en T1, T3, 5. Cuando fue posible, se recogió la orina antes del sangrado. La sangre se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos. El plasma se recogió. 20 µl de plasma se diluyeron en 2 ml de PBS pH 7,2. Las lecturas se registraron en un espectrofluorómetro Eclipse (Varian, Australia) a una longitud de onda de excitación de 490 nm y una emisión de 514 nm. Las concentraciones se determinaron contra una curva estándar de fluoresceína. Los datos más abajo se recogieron mostrando que en fluoresceína está entrando en la circulación sanguínea ligeramente mejor que cuando se formulan en solución salina y se excreta mejor en animales alimentados a la fuerza con MPM lo que sugiere una mejor absorción de fluoresceína.

25

Tabla 9
Concentración de fluoresceína en sangre en el tiempo

Tiempo (horas)	1h	3h30
	(ng/ml)	(ng/ml)
Solución salina 0,9%	336,699	99,693
MPM-R2C2	415,701	116,622
MPM-Inix	323,532	84,645

Tabla 10
Concentración de fluoresceína en la orina en el tiempo

Tiempo (horas)	1h	3h30
	(ug/ml)	(ug/ml)
Solución salina 0,9%	96,3072	125,6508
MPM-R2C2	176,49423	126,027
MPM-Inix	213,58755	125,0865

30 Ejemplo 10

Condiciones para la producción industrial de MPM

35 El medio de precultivo es un medio compuesto de permeado de suero (62,5 g/l) que contiene 10 g/l de extracto de levadura (1%). Se usa agua esterilizada para reconstituir el suero en polvo. Se añade polvo de permeado de suero junto con el extracto de levadura. El medio se pasteuriza a 90 °C por 30 minutos, evitando el fenómeno de formación de caramelo y permitiendo un crecimiento mejor del fermento.

40 El precultivo se genera en el fermentador en las siguientes condiciones: 39 °C, el pH inicial de 5 se controla a 4,3 durante la fermentación, la agitación mínima (50 RPM) por 18 a 20 horas con una relación de inoculación inicial entre 1 a 15%, pero preferentemente 10% (10^8 bacterias/ml). La inoculación se realiza a partir de fermentos congelados. Las mismas condiciones se usan para fermentar suero para producir las MPM, pero 1% de CaCl_2 se añade al suero crudo, justo antes del ajuste del pH a 5 con HCl. Esto minimiza los riesgos de contaminación y permite llevar el pH inicial cerca del crecimiento óptimo de la cepa bacteriana usada. Una vez que el pH se ajusta, el suero se pasteuriza en el fermentador a 70 °C por 40 minutos, la temperatura se lleva a 39 °C y el suero se inocula con 0,5 a 5%, pero preferentemente 2,5% de precultivo como se definió previamente. La fermentación de suero dura 16 horas con la cepa R2C2. El pH se controla añadiendo NaOH. La agitación se mantiene a un mínimo para permitir una buena distribución pero sin causar una aireación excesiva. El reajuste del pH a 7,5 y la recuperación de las

45

MPM se realiza con un clarificador industrial Westfalia modelo NA-7. Los rendimientos obtenidos dependen de la firmeza deseada y varían entre 30 a 50 g/l de solución fermentada. La recuperación de la MPM desencadena la recuperación prácticamente de todas las bacterias que se encuentran en la suspensión.

5 Ejemplo 11

Inoculación con fermento congelado en suero para la producción de MPM

10 La MPM se preparó en las mismas condiciones que en el Ejemplo 10 excepto que la fermentación se inoculó sin precultivo pero directamente en el suero con un fermento congelado. El crecimiento del fermento es más lento y requiere un tiempo de fermentación más largo (24 horas). La calidad y el rendimiento de la MPM recuperada en esas condiciones es comparable con el uso del fermento mediante la recogida en un precultivo como se describió previamente.

15 Ejemplo 12

Almacenamiento del precultivo de R2C2 para la producción de MPM

20 El precultivo de R2C2 como se describió en el Ejemplo 10 se puede refrigerar y almacenar por 2 días sin ninguna alteración apreciable. Un período de refrigeración más largo de 72 horas desencadena la aparición de la fase latente del fermento durante una fermentación posterior del suero.

Ejemplo 13

25 Pasteurización del suero fermentado

El suero fermentado se puede someter a un tratamiento térmico de 65 °C por 30 minutos para garantizar la ausencia de contaminantes viables. La pasteurización de la solución fermentada se tiene que evitar sin embargo si la misma quiere preservar los efectos beneficiosos de los probióticos cuando se usan en el proceso de fermentación.

30

Ejemplo 14

El uso de un clarificador para recuperar las MPM.

35 A continuación de una fermentación como se describió en el Ejemplo 10 de las MPM, un equipo Westfalia, modelo NA-7, se probó para recuperar continuamente por medio de la boquilla o para recuperar por descargas periódicas. La recuperación con boquilla genera un MPM menos denso y líquido. Este tipo de MPM no respondió a las necesidades de las formulaciones de alimentos. Para aumentar la densidad, se prefiere un tiempo de residencia corto en el clarificador. Esto se logró mediante el uso de descargas periódicas. La densidad deseada de MPM se puede ajustar para satisfacer las necesidades de los formuladores de alimentos para diferentes productos (mantequilla y crema, etc.). La NA-7 se usa a la velocidad máxima de rotación con un flujo de 330 L/h de solución fermentada y se descarga en intervalos cada 7 minutos. El tiempo de apertura del bol se ajusta para permitir una descarga adecuada parcial, por ejemplo no permitiendo ni la acumulación de MPM dentro de la NA -7, ni una descarga completa del bol. Los rendimientos obtenidos son 40 a 45 g/l para las MPM que tienen una medición de la extensión de 8 a 10 cm, mientras que se obtiene MPM en un rendimiento inferior de 30 a 35 g/l para una medición de la extensión de 3 cm. Se recuperan todos aglomerados y microorganismos en suspensión.

Ejemplo 15

50 Recuperación de MPM con un LAPX404

La máquina LAPX404 de Alfa Laval se utiliza además a una velocidad de flujo de 130 l/h, a una velocidad de rotación máxima de 9500 RPM que descarga cada 7 minutos. El volumen descargado con LAPX404 es parcial, pero constante. En esas condiciones, la densidad de las MPM recuperadas es adecuada para las formulaciones de alimentos. La densidad se puede ajustar variando los intervalos de las descargas y la velocidad de flujo. Se recuperan todos los aglomerados y microorganismos en suspensión.

Ejemplo 16

60 Producción de MPM a partir de suero concentrado

En las mismas condiciones que las descritas en el Ejemplo 10, suero concentrado (13% de materia sólida) se utiliza como la solución del comienzo de la fermentación. En esas condiciones, los rendimientos obtenidos para la producción de MPM fermentada con la cepa R2C2 aumentó a 85 g por litro de solución fermentada.

65

Ejemplo 17

Recuperación de proteína por fermentación con microorganismo específico

5 Este Ejemplo describe el uso de *Lactobacillus kefirgranum* para recuperar proteínas en soluciones fermentadas. *Lactobacillus kefirgranum* se inocula a partir de una biomasa liofilizada en medio salado PL como se describe: Triptona peptona (caseína) 1%, MgSO₄ 0,02%, MnSO₄ 0,005%, acetato sódico 0,2%, Tween 80 0,05%, extracto de levadura 1%, polvo de permeado de suero 62,5 g/l. Completar con agua destilada, ajustar el pH entre 5,0 y 5,5 con HCl y poner en autoclave a 121 °C, 30 minutos. Mantener a 4 °C hasta el uso. Después de la fermentación 24 a 60
10 horas, preferentemente de 40, a 30 °C, el cultivo resultante se puede filtrar o centrifugar u otro tratamiento sin ninguna adición para recuperar las proteínas y las bacterias que forman aglomerados.

Para la misma aplicación, *Lactobacillus kefirgranum* se puede cultivar en medio de Suero de Queso Rogosa (RCW) preparado como sigue: RCW se prepara a partir del Caldo Rogosa S1 (Difco # 0478-17-4) y se prepara de acuerdo con los protocolos del fabricante, excepto que el agua destilada se sustituye por permeado de suero que se prepara a partir de un polvo de permeado de suero (62.5 g/l) y las proteínas se desnaturalizan térmicamente (Esterilización 121 °C por 15 minutos) y se fraccionan por filtración antes del uso. *Lactobacillus kefirgranofaciens* se cultiva a 30 °C por 24 a 60 horas, preferentemente 40, para permitir la recuperación de las bacterias y parte de las proteínas. El cultivo se puede filtrar o centrifugar sin ningún otro tratamiento o adición para recuperar las proteínas y las bacterias que forman aglomerados.

Además, un cultivo de 400 ml en salado PL, por 24 horas de fermentación a 30 °C , se usa para inocular 10 litros de suero estéril. La fermentación se controla a pH 5,5, 30 °C por 24 horas y la solución fermentada se centrifuga sin ningún otro tratamiento o adición para recuperar las proteínas y las bacterias que forman aglomerados. El producto recuperado es un MPM a pH 5,5. Otra aplicación es ajustar el pH de la solución fermentada entre 5,5 a 8, preferentemente a 7,5, antes de la recuperación de los aglomerados. Por último, otra aplicación es ajustar CaCl₂ entre 0,1 y 1,5%, preferentemente al 1%, a la solución fermentada antes de ajustar el pH entre 5,5 y 8, preferentemente a 7,5, y recuperar los aglomerados.

30 Ejemplo 18

MPM como un agente potenciador del sabor

En un panel de degustación, la mayoría de la gente concluyó que el producto que contiene las MPM tuvo un sabor mejorado. Esto se reportó en la mantequilla (el sabor salado) y en las bebidas preparadas con chocolate (el sabor del chocolate). Así, la MPM se puede usar para ayudar a aumentar el sabor de cierto producto.

Ejemplo 19

40 Efecto antiinflamatorio de las MPM (Reducción de TNF- α en las células sanguíneas)

Ratas Wistar hembra, que pesan 150 g y se alimentan *libremente* se sometieron a 3 sesiones de alimentación forzada (cada sesión duró una semana por 7 alimentaciones forzadas repetidas) con una semana de descanso entre cada sesión. Las muestras de sangre se recogieron durante y en el curso del experimento y las ratas se sacrificaron 2 h después de la última alimentación forzada para un total de 21 alimentaciones forzadas. Las muestras se cosecharon (células sanguíneas), en hielo seco, y congelaron a -80 °C. El ARN se aisló usando el reactivo TRIZOL (Gibco) según las especificaciones de los fabricantes. Diez microgramos de ARN total se transcribió inversamente usando Superscript RT (Gibco), 500 ng de iniciadores oligodT (Gibco), y 250 ng de iniciadores al azar Hexámero (Gibco) por 20 minutos a temperatura ambiente, seguido por 2 horas a 424 °C.

50 TNF- α se amplificó a partir de 2ul de reacción de transcripción inversa usando kit de PCR Titanium (Clontech). La amplificación de los iniciadores fue como sigue: Rat TNF- α directo: CCCAACAA GGAGGAGAGTTCCC (sec. con núm. de ident.:7) Rat TNF- α reverso: ATGACTCCAAAGTAGACCTGCC (sec. con núm. de ident.:8)

55 La reacción PCR se realizó por 30 ciclos usando 100 pmol de cada iniciador, con una temperatura de hibridación de 68 °C. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa 1.5%. Los datos mostraron que las MPM pueden reducir el nivel de TNF- α en el nivel de ARN en las células sanguíneas después de 7 días en el grupo de ratas alimentadas con MPM en contraste a lo observado en los grupos alimentados con solución salina (control -), HMS90™ (un aislado de proteína de suero vendido por Immunotec), yogurt (Danone reducido en calorías) por lo tanto, sugiriendo que un efecto anti-inflamatorio está teniendo lugar en las células sanguíneas.

Ejemplo 20

Efecto inmunomodulador de las MPM (producción de IL-18)

65

Ratas Wistar hembra, que pesan 150 g y alimentan *libremente* se sometieron a 3 sesiones de alimentación forzada (cada sesión duró una semana por 7 alimentaciones forzadas repetidas) con una semana de descanso entre cada sesión. Las muestras de sangre se recogieron durante y en el curso del experimento y las ratas se sacrificaron 2 h después de la última alimentación forzada para un total de 21 alimentaciones forzadas. Las muestras se cosecharon (células sanguíneas), en hielo seco, y congelaron a -80 grados. El ARN se aisló usando el reactivo TRIZOL (Gibco) según las especificaciones de los fabricantes. Diez microgramos de ARN total se transcribió inversamente usando Superscript RT (Gibco), 500 ng de iniciadores oligodT (Gibco), y 250 ng de iniciadores al azar Hexámero (Gibco) por 20 minutos a temperatura ambiente, seguido por 2 horas a 42 °C.

10 IL-18 se amplificó a partir de 2ul de reacción de transcripción inversa, usando kit PCR Titanium (Clontech). Los iniciadores de amplificación fueron como sigue:

IL-18 directo: ATGCCTGATATCGACCGAACA GCC (sec. con núm. de ident.; 9)

15 IL-18 reverso: CAAATTCATTGTTGTGTCTCTG G (sec. con núm. de ident.: 10)

La reacción PCR se realizó por 30 ciclos usando 100 pmol de cada iniciador, con una temperatura de hibridación de 684 °C. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa 1.5%. Los datos mostraron que las MPM aumentan los niveles de IL-18 en el nivel de ARN en las células sanguíneas después de 24 horas en el grupo de ratas alimentadas con MPM en contraste a lo observado en los grupos alimentados con solución salina (control -), HMS90 (un aislado de proteína de suero vendido por Immunotec), yogurt (Danone reducida en calorías), por lo tanto sugiriendo una estimulación de la inmunidad de la mucosa.

Ejemplo 21

25 Estimulación de PBMC en ratas alimentadas con MPM

Ratas Wistar hembra, que pesan 150 g y se alimentan *libremente* se sometieron a 3 sesiones de alimentación forzada (cada sesión duró una semana por 7 alimentaciones forzadas repetidas) con una semana de descanso entre cada sesión. Las muestras de sangre se recogieron durante y en el curso del experimento y las ratas se sacrificaron 2 h después de la última alimentación forzada para un total de 21 alimentaciones forzadas. Las muestras de sangre se midieron con Unopett (BD) para contar el total de células mononucleares de sangre periférica. Los datos se muestran más abajo y sugieren que las ratas alimentadas con MPM tienen una tendencia a ver aumentar su conteo de PBMC, casi duplicado después de 4 días después de la alimentación forzada.

TABLA 11

Recuento de PBMC

Grupo prueba	Recuento de PBMC aumenta en relación la solución salina
solución salina	1
MPM	1.8
HMS 90	1.2
Yogurt	0.6
Mantequilla	1.2
Mantequilla/MPM (40% MPM)	1.6

Ejemplo 22

40 Efecto anti-trigliceridemia de las MPM

Ratas Wistar hembra, que pesan 150 g y alimentan *libremente* se sometieron a 3 sesiones de alimentación forzada (cada sesión duró una semana por 7 alimentaciones forzadas repetidas) con una semana de descanso entre cada sesión. Las muestras de sangre se recogieron durante y en el curso del experimento y las ratas se sacrificaron 2 h después de la última alimentación forzada para un total de 21 alimentaciones forzadas. Los sueros se midieron por el método de Wahlefeld (GPO-PAP) para determinar los niveles de triglicéridos circulantes. Los datos de la tabla 12 más abajo muestran que MPM afectan el nivel basal de TG.

TABLA 12

Niveles de triglicéridos después de 24 horas y 3 días		
	TG después de 24 horas mg/dl suero (SEM)	TG después de 3 días mg/dl suero (SEM)
solución salina	62 (15)	51 (4)
MPM	33 (5)	32(10)
HMS 90	31 (4)	101 (15)
Yogurt	118(38)	76 (27)
Mantequilla	64 (30)	128 (46)
Mantequilla/MPM	83 (9)	156 (22)

TABLA 13

Niveles de triglicéridos después de 24 horas, 16 días y 21 días			
Grupos de prueba	TG después de 24 horas mg/dl suero (SEM)	TG después de días mg/dl suero (SEM)	TG después de días mg/dl suero (SEM)
solución salina	71(14)	80(19)	43(14)
MPM	50(15)	52(1)	35(1)
HMS 90	56(6)	102(34)	92(21)
Yogurt	57(4)	56(13)	99(24)

5 Ejemplo 23

Análisis del contenido de aminoácidos de las MPM

10 Las MPM se analizaron por Bodycote Canadá para determinar el contenido de aminoácidos comparativo de varios productos a base de proteínas de suero. WPH917 es un hidrolizado de proteína de suero de alta calidad producido por un tratamiento enzimático controlado de proteína de suero que proporciona aminoácidos, péptidos y polipéptidos. PowerPro 80 es el concentrado de proteína de suero 80% producido por un proceso de ultrafiltración que concentra las proteínas nativas de suero.

15

Tabla 14

Análisis del contenido de aminoácidos			
Aminoácido	MPM (lote 15)	WPH 917	PowerPro 80
Ácido glutámico	22,92	18,3	10,1
Alanina	5,73	5,2	4,1
Arginina	4,01	3	1,9
Cistina	10,32	2,9	2
Glicina	13,61	2,3	1,5
Histidina	11,17	1,9	1,6
Isoleucina	6,45	5,5	5,1
Leucina	11,89	14,2	9
Serina	7,02	5	3,9
Triptófano	No determinado	2,3	1,4

Ejemplo 24

Análisis del contenido de las MPM

20

MPM se analizaron por Bodycote Canadá para determinar el contenido total de varios productos a base de proteínas de suero. WPH917 es un hidrolizado de proteína de suero de alta calidad producido por un tratamiento enzimático controlado de proteína de suero que proporciona aminoácidos, péptidos y polipéptidos.

5

Tabla 15

Análisis del contenido			
Contenido	Métodos	MPM %(g/100g)	WPH917 %(g/100g)
Humedad	AC-HUM 04	80	4
Proteínas	AC-PRO01AOAC	8	89
Cenizas	AC-CEN01AOAC	6	3.1
Carbohidratos	AC-SUB01AOAC	5	No determinado
Lactosa	AC-LAB01AOAC	2.5	0.3
Grasa	AC-GRA 01	1.3	3.5
Minerales (Na, Ca, K)	SAA	0.1, 1.8, 0.2	1.3,0.1,002

Ejemplo 25

Efecto biológico resultante de MPM - INIX pasteurizada en Glutación

10

Ratas Wistar hembra, que pesan 150 g y se alimentan *libremente* se sometieron a 3 sesiones de alimentación forzada (cada sesión duró una semana por 7 alimentaciones forzadas repetidas) con una semana de descanso entre cada sesión. Las muestras de sangre se recogieron durante y en el curso del experimento y las ratas se sacrificaron 2 h después de la última alimentación forzada para un total de 21 alimentaciones forzadas. Las muestras de sangre se midieron después de 3 semanas de acuerdo con un método modificado de Anderson diseñado para medir los niveles de glutación en el plasma.

15

TABLA 16

Niveles de GSH en ratas	
Grupos de prueba	Niveles de GSH In ug GSH/ml plasma (+/-SD)
Solución salina	0.05 (0.05)
MPM 1*	0.08 (0.08)
MPM**	1.08 (0.31)
* MPM natural producida con MPM pasteurizada R2C2 ** producida con INIX	

20 Ejemplo 26

Solubilización de pireno mediante el uso de MPM

25

50 μ M de solución concentrada de pireno en acetona se prepara y 20 μ l de la solución concentrada se pone en tubos de borosilicato (10 x 13 mm). Los tubos se mantienen parados a temperatura ambiente en una campana de extracción por 20-30 minutos hasta que se completa la evaporación de la acetona. 2.0 ml de MPM se disuelven en 0,1 M de solución salina regulada con fosfato (PBS) a pH 7,2 se insertan en los tubos de borosilicato. La concentración de MPM usada está dentro del intervalo de 0,001 a 1,0% (p/v). Deje reposar la solución a temperatura ambiente, protegida de la luz y las lecturas fluorescencia se realizan después de 24, 48 y 69 h de incubación. Las lecturas de fluorescencia se realizan en un Varian Cary Eclipse a 37 °C con una longitud de onda de excitación ajustada a 340 nm y se registran las exploraciones por emisión de 350 a 600 nm. El grado de solubilización de pireno se mide graficando la I_3/I_3 (acuoso) del compuesto estudiado como una función de la concentración del compuesto. El punto de inflexión del gráfico corresponde con el valor crítico de concentración micelar. Los datos de la Tabla 17 muestran la relación de la intensidad de fluorescencia del pico I_3 sobre la intensidad del pico I_3 de la solución PBS como una función de la concentración de MPM y P85.

35

TABLA 17

relación entre la intensidad de fluorescencia del pico I3 sobre la intensidad del pico I3 de la solución PBS		
	P85	MPM lote 78
0.001%	1,107	1,123
0.01%	1,168	1,328
0.1%	2,564	2,416
1%	8,813	3,687

5 Los datos de la Tabla 18 muestran la relación de la intensidad de la fluorescencia del pico I_e sobre la intensidad del pico I_e de la solución PBS como una función de la concentración de MPM y P85. Los datos muestran que las MPM promueven la formación de excímeros (microdominios hidrofóbicos).

Tabla 18

relación entre la intensidad de fluorescencia del pico I _e sobre la intensidad de pico I _e de la solución PBS		
	P85	MPM lote 78
0.001%	0,9619	1.567
0.01%	1,233	4,834
0.1%	2,443	30,88
1%	4,829	25,24

Ejemplo 27

10 Incorporación de MPM en la loción corporal

15 Para validar las propiedades funcionales de las MPM en una formulación cosmética, se hizo un ensayo para formular una loción corporal comercial. El producto comercial fue una loción preparada de leche de cabra que contiene 0.3% de extracto de leche de cabra. La MPM se incorporó en un 10% (p/p) . El recipiente se cerró antes de mezclar el componente y agitó a mano y almacenó a temperatura ambiente. Después de 24 horas, la mezcla resultante exhibió partículas finas en las paredes del vaso y fue más líquido que la loción corporal comercial original. Sin embargo, la mezcla resultante no mostró signos de degradación o separación de la emulsión y el olor se mantuvo similar al producto comercial. La viscosidad de MPM se evaluó usando las técnicas de extensión de acuerdo con el principio de consistometría USDA (Adams & Birdsall, 1946) permitiendo la medición, en cm, de la distancia de extensión de un alimento semi-fluido realizado en una placa equipada con una serie de círculos concéntricos en el tiempo predeterminado y estandarizado. La mezcla resultante de la loción corporal + MPM registró 13 cm en la escala de extensión, pero volviendo a su extensión original por ejemplo 8 cm en un período de 3 semanas. Los datos indican que la adición de 10% de MPM desencadenó una licuación de la matriz. En cuanto a la preservación de la vida útil de la mezcla resultante se encontró estable y no se contaminó por un período de 3 semanas con la misma partícula en suspensión con el mismo olor característico que el producto original.

Ejemplo 28

30 Mantequilla ligera

35 Se prepararon dos tipos de mantequilla ligera que contiene 25 y 40% MPM, respectivamente. Generalmente, la mantequilla con MPM es más cremosa a temperatura ambiente, se solidifica menos a 4 °C, y exhibe una textura que es más frágil que la mantequilla regular. Es importante tener en cuenta que el sabor salado de la mantequilla se potenció por las MPM que permiten una reducción de la cantidad normal de la sal (NaCl) en la mantequilla por 33 a 50%. La mantequilla que contiene 25% de MPM es utilizable para freír y se vuelve marrón como la mantequilla natural, mientras que la mantequilla 40% no permite freír y se usa solamente como una crema. Además, el tiempo de conservación de mantequilla con MPM fue aceptable por 45 días y la mantequilla que contiene MPM se podría congelar sin ningún cambio de las propiedades organolépticas.

40 Ejemplo 29

MPM en crema batida

Formulaciones de crema ligera se prepararon a partir de crema 40%, leche y MPM para obtener una crema con 21% de grasa que exhibe una textura agradable y gruesa que puede ser batida. La crema batida resultante es firme y se puede almacenar por 15 días en la nevera sin alteración. El olor y sabor son similares a la nata natural. La receta es como sigue: 200 ml de crema al 40%, 85 ml de leche, 95 g de MPM y azúcar y/o aroma.

5 Ejemplo 30

Mayonesa y aderezo para ensaladas

10 El mismo tipo de MPM usado previamente se usó para preparar Mayonesa y aderezo para ensalada de acuerdo con la siguiente fórmula:

Tabla 19

Preparación de aderezo para ensaladas	
Ingredientes :	Cantidad (gramos)
MPM	19.6
Aceite	19.4
Jarabe de maíz	1.9
azúcar	0.8
aroma	para degustar
especias	para degustar
Vinagre	10.3

15 Ejemplo 31

Bebida de Chocolate

20 El mismo tipo de MPM usado previamente se usó para preparar bebidas de chocolate de acuerdo con la siguiente fórmula:

Tabla 20

Preparación de la bebida de chocolate	
Ingrediente	Cantidad en gramos
MPM	60
leche	100 ml
cacao	0.16
azúcar	7
Aroma de chocolate	0.25
Potenciador del sabor	a ajustar

25 Esta formulación permite el enriquecimiento de la leche de 3,6 g de proteínas que se duplica prácticamente en comparación con la leche natural. La MPM ofrece una mejor viscosidad y una textura cremosa que se aprecia en la boca. Las MPM se añadieron además a una bebida para el control de peso (Slim fast™) y el producto resultante se encontró que tiene un sabor reducido de las proteínas de soja que se encuentran en esa bebida.

30 Ejemplo 32

Yogurt

35 Cuatro intentos se prepararon con la formulación de yogurt. (1) control con 3,25% de leche y (3) intentos con 1% de leche todo suplementado con 3% de leche descremada en polvo. Las etapas para la preparación de yogurt incluyen calentar la leche a 82-85 °C, agitar por 30 min, seguido de una etapa de enfriamiento a 44-45 °C. Los cultivos (yogourmet, LYO-SAN Co) que contienen *L. Bulgaricus*, *S. Thermophilus* y *L. Acidophilus* se añadieron para obtener 5 g por litro de leche, seguido por una incubación a 45 °C por 4 horas, sin agitación. Prueba de control preparada a partir de leche 3,25%.

Prueba 2: calentar simultáneamente la leche y la MPM (100 g/l) seguido por la adición del fermento.

Prueba 3: la leche se calienta primero seguido por la adición de la MPM (100 g/l) y el fermento.

Prueba 4: adición de la MPM al final de la producción, al mismo tiempo que la adición de las frutas como en una producción industrial.

5 Después de la incubación, el producto obtenido por la Prueba 2 es comparable con la prueba de control mientras que las pruebas 3 y 4 no permitieron la coagulación. Después de 6 semanas de almacenamiento, la prueba de control exhibe un drenaje significativo y se contaminó con levadura mientras que la prueba 2 no mostró ni signos de desestabilización ni deterioro microbiológico desde su preparación. Así, la MPM juega un papel de conservante en la formulación y ayuda a obtener muy buena y típica textura de un yogurt mientras que reduce la cantidad de grasa en la formulación final sin la adición de almidón u otros agentes espesantes.

Ejemplo 33

15 El uso de diferentes cepas afecta el perfil analítico de las MPM resultantes producidas en lotes de 10 litros.

La concentración de varios carbohidratos (glúcidos), ácido láctico y los rendimientos de MPM varían de acuerdo con la cepa usada. Además, la composición de la solución fermentada influye en la composición de la matriz, ya sea directamente y proporcionalmente como en el caso de los carbohidratos encontrados en la fase acuosa y fase líquida de la matriz, o de acuerdo con un efecto de concentración como en el caso del ácido láctico que precipita en parte durante la recuperación de la matriz.

Tabla 21

Perfil analítico de MPM en función de las diferentes cepas usadas para producirlas					
	INIX	Lactobacillus rhamno 7469*	Lactobacillus zeae *	Lactobacillus kefirgranum *	Lactobacillus helveticus *
*recuento de bacterias	2,47 x 10 ⁸ b/ml	5,1 x 10 ⁸ b/ml	1,34 x 10 ⁸ b/ml	No determinado	6,77 x 10 ⁷ b/ml
Ácido láctico ; t0	0,211 g/l	0,439 g/l	0,143 g/l	0,234 g/l	0,157 g/l
Ácido láctico, Fin de la fermentación	2,414 g/l	1,67 g/l	0,821 g/l	2,22 g/l	3,5 g/l
Ácido láctico en la solución residual	1,122 g/l	0,215 g/l	0,384 g/l	1,11 g/l	1,53 g/l
MPM	9,57 g/kg	15,82 g/kg	9,85 g/kg	2,94 g/kg	5,23 g/kg
Total de glúcidos, t0	45,0 g/l	59,25 g/l	41,30 g/l	54,22 g/l	47,06 g/l
Glúcido al final	41,25 g/l	51,0 g/l	55,01 g/l	51,55 g/l	42,67 g/l
Glúcido en la solución residual	42,0 g/l	48,0 g/l	53,86 g/l	46,54 g/l	54,24 g/l
Glúcido en MPM	36,50 g/kg	29,35 g/kg	39,86 g/kg	38,593 g/kg	41,197 g/kg
Lactosa a T0	47,95 g/l	45,52 g/l	53,46 g/l	50,99 g/l	52,58 g/l
Lactosa al final	42,95 g/l	39,68 g/l	51,74 g/l	47,28 g/l	42,65 g/l
Lactosa en la solución residual	42,57 g/l	42,40 q/l	47,31 g/l	44,92 g/l	41,55 g/l
* comparativo					

25 Tabla 21

Perfil analítico de MPM en función de las diferentes cepas usadas para producirlas					
	INIX	Lactobacillus rhamno 7469**	Lactobacillus zeae **	Lactobacillus kefirgranum**	Lactobacillus helveticus **
Lactosa en MPM	24,78 g/kg	20,70 g/kg	27,70 g/kg	37,02 g/kg	35,17 g/kg
GALACTOSA a T0	0	0	0	0,13 g/l	0

Perfil analítico de MPM en función de las diferentes cepas usadas para producirlas					
	INIX	Lactobacillus rhamno 7469**	Lactobacillus zeae **	Lactobacillus kefirgranum**	Lactobacillus helveticus **
<u>Galac. Al final</u>	0,75 g/l	0	0	0,75 g/l	2,51 g/l
<u>Galac. en la solución residual</u>	0,70 g/l	0	0	0,36 g/l	2,02 g/l
<u>MPM</u>	1,72 g/kg	0	0	1,55 g/kg	2,22 g/kg
GLUCOSA a T0	0	0	0	0	0
<u>Glucosa al final</u>	0	0	0	0,49 g/l	1,49 g/l
<u>Glucosa en la solución residual</u>	0	0	0	0	0,88 g/l
<u>MPM</u>	0	0	0	1,48 g/kg	1,74 g/kg
Rendimiento de MPM	41,2 g/l	28,69 g/l	27,5 g/l	40,6 g/l	40,12 g/l
<u>% humedad</u>	85,98%	84,67%	85,23%	85,11%	
<u>% materia orgánica</u>	9,49%	9,01%	8,66%	9,87%	
<u>% minerales</u>	4,53%	4,95%	6,12%	5,03%	
* a partir del cultivo antes de la recuperación de las MPM. El recuento en las MPM es 5 veces mayor. ** comparativo					

Ejemplo 34

Características de varias MPM producidas a partir de diferentes cepas

- 5 El uso de diferentes cepas durante el proceso de fermentación afecta la textura, sabor, y olor de la MPM resultante como se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22

Características de MPM producidas a partir de diferentes cepas					
Parámetros	Lactococcuslactis †	Lactobacillus helveticus †	INIX	Lactobacillus rhamnosus †	R2C2
pH	5.69	6.99	6.58	5.06	6,26
Color	7039-12	7042-22	7042-12	7039-12	salsa
sabor	Acre	Acre	Acre	ND	neutro
olor	yogurt natural	leche condensada	Algas	Suero fuerte	Coliflor cocida
Apariencia	sinéresis importante	Textura homogénea, buena	Textura viscosa y suave, buena	Aglomerados en burbujas	Aglomerados heterogéneos
%sinéresis	0.07	0.08	0.1	0	0,23
Drenaje	nul	nul	nul	nul	nul
*Extensión	1.25	2	2	5.5	0
** Actividad	Mayonesa	Vinagreta	Vinagreta	Vinagreta	Vinagreta

Características de MPM producidas a partir de diferentes cepas					
Parámetros	Lactococcuslactis †	Lactobacillus helveticus †	INIX	Lactobacillus rhamnosus †	R2C2
emulsionante					
<p>* La viscosidad de MPM se evaluó usando técnicas de extensión de acuerdo con el principio de la consistometría USDA (Adams & Birdsall, 1946) permitiendo la medición, en cm, de la distancia de extensión de un alimento semi-fluido realizado en una placa equipada con una serie de círculos concéntricos en el tiempo predeterminado y estandarizado.</p> <p>** La actividad emulsionante se evalúa por medio del sistema modelo que representa una buena capacidad para la formación de una vinagreta y de la mayonesa.</p> <p>† comparativo</p>					

Ejemplo 35

Caracterización y composición de las MPM producidas en 10 litros en fermentadores por la cepa R2C2.

5

TABLA 33

Características de las MPM varían de acuerdo a la velocidad de crecimiento de la cepa					
Parámetros	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 7 pasteurizada
pH	ND	ND	7.17	7.21	7.06
Color	7042-22	7042-22	7039-12	7039-12	7041-22
Sabor	Amargo	Amargo	Amargo	Amargo	ND
Olor	Coliflor cocida	Coliflor cocida	Coliflor cocida	Coliflor cocida	Algas
Apariencia	Firme, sin sinéresis	Sinéresis tipo yogurt	homogéneo suave	homogéneo suave	homogéneo suave tipo yogurt
%sinéresis	0	0.01	0.1	0	0
Drenaje	nulo	nulo	nulo	nulo	nulo
Extensión	ND	ND	8.25	más de 12	6.5
Actividad emulsionante	Vinagreta	Vinagreta	Vinagreta	Vinagreta	Vinagreta
Recuento de bacterias en MPM	2 x 10 ⁹ b/g	1,4x 10 ⁹ b/g	5 x 10 ⁸ b/g	6,7 x 10 ⁸ b/g	5 x 10 ⁸ b/g
Ácido láctico	16,39 mg/g	24,38 mg/g	7,02 mg/g	5,61 mg/g	7,02 mg/g
Azúcares totales	15,70 g/kg	18,30 g/kg	45,19 g/kg	43,15 g/kg	45,19 g/kg
Lactosa	0	0	49,88 g/kg	48,57 g/kg	49,88 g/kg
Galactosa	14,9 g/kg	18,1 g/kg	0,66 g/kg	0,77 g/kg	0,66 g/kg
Rendimiento	27,32 g/l	33,85 g/l	41,10 g/l	44,10 g/l	41,10 g/l
% humedad	82,26%	84,82%	86,05%	85,86%	86,05%
% materia orgánica	10,92%	9,37%	9,01%	9,86%	9,01%
% minerales	6,83%	5,82%	5,08%	4,28%	5,08%

Leyenda

Nd, no determinado

7039-12 espárrago blanco, blanquecino con tendencia verdosa.

7041-12 blanquecino y menos verde que 7039-12 (canevas)

Características de las MPM varían de acuerdo a la velocidad de crecimiento de la cepa					
Parámetros	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 7 pasteurizada
7042-12 coliflor, más beige que blanco 7042-22 blanco pero con el fondo naranja					

Ejemplo comparativo 36

Producción de las MPM que contienen proteínas de origen vegetal

5 El medio de precultivo es un medio compuesto de permeato de suero (62,5 g/l) que contiene 10 g/l de extracto de levadura (1%). Se usa agua esterilizada para reconstituir el suero en polvo. Se añade polvo de permeato de suero junto con el extracto de levadura. El medio se pasteuriza a 90 °C por 30 minutos, evitando el fenómeno de formación de caramelo y permitiendo un crecimiento mejor del fermento.

10 El precultivo se genera en el fermentador en las siguientes condiciones: 39 °C, el pH inicial de 5 se controla a 4,3 durante la fermentación, la agitación mínima (50 RPM) por 18 a 20 horas con una relación de inoculación inicial entre 1 a 15%, pero preferentemente 10% (10⁸ bacterias/ml). La inoculación se realiza a partir de fermentos congelados. Las mismas condiciones se usan para fermentar el suero (suplementado con proteínas de soja comercial 1 a 10% p/v) para producir las MPM, pero se añade 1% de CaCl₂ al suero crudo, justo antes del ajuste de pH a 5 con HCl. Esto minimiza los riesgos de contaminación y lleva el pH inicial cerca del crecimiento óptimo de la cepa bacteriana usada. Una vez el pH ajustado, el suero se pasteuriza en el fermentador a 70 °C por 40 minutos, la temperatura se lleva a 39 °C y el suero se inocula con 0.5 a 5%, pero preferentemente 2,5% de precultivo como se definió previamente. La fermentación de suero dura 16 horas con la cepa R2C2. El pH se controla añadiendo NaOH.

15 La agitación se mantiene a un mínimo para permitir una distribución uniforme sin causar una aeración excesiva. El reajuste del valor del pH a 7,5 y la recuperación de las MPM se realiza con un clarificador industrial Westfalia modelo NA-7. Los rendimientos obtenidos dependen de la firmeza deseada y varían entre 30 a 50 g/l de solución fermentada. La recuperación de la MPM desencadena la recuperación prácticamente de todas las bacterias que se encuentran en la suspensión.

25 Ejemplo 37

Formulación de 5-Fluoro Uracilo con las MPM

30 Las MPM se pueden usar para formular varios materiales bioactivos. En este ejemplo 5-Fluoro Uracilo se formuló con la MPM típica descrita en los Ejemplos anteriores y se administró por la vía oral mediante alimentación forzada a los ratones. La eficacia de esta nueva formulación se comparó con el 5FU libre y probó en modelos animales en los que se implantaron células de cáncer de colon o en los que el cáncer de colon se indujo químicamente. El hallazgo fue que la formulación 5FU/MPM mejoró el índice terapéutico de 5FU como se muestra por la reducción del crecimiento del tumor.

Ejemplo 38

Formulación básica de un yogurt firme

- 40
1. Adicionar 3 a 5% de sólidos suaves a la leche
 2. Calentar la leche a 85 °C y mantener por 30 minutos
 - 45 3. Alcanzar la ebullición y añadir 0.5% de gelatina, pectina o almidón de maíz a la leche
 4. Enfriar la leche a 44-46 °C y añadir cepas bacterianas que convierten parte de la lactosa en ácido láctico *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*
 - 50 5. Adicionar 20% de MPM
 6. Colocar en recipientes e incubar entre 40-46 °C hasta alcanzar 80 °D, por 4-6 horas
 - 55 7. Refrigerar a 4 °C por al menos 24 horas.

Ejemplo 39

Composición del pudín de vainilla

Un pudín de vainilla se produce mezclando leche y MPM, añadiendo el ingrediente seco a la mezcla de leche-MPM para mezclar bien, añadiendo lentamente el aceite a la mezcla usando un homogeneizador Ultra-Turrax, cocinando entre 60-70 °C hasta que la mezcla se espese y refrigerando a 4 °C durante al menos 24 horas. Los ingredientes se enumeran en la Tabla 34.

5

Tabla 34

Composición del pudín de vainilla	
	%
MPM	50
Leche	36.1
Azúcar	14.9
Aceite vegetal	3.3
Na ₂ HPO ₄	0.2
Vainilla	0.5

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar una matriz de proteína maleable, dicho proceso comprende las etapas de:
 - a) fermentar una solución de proteína de suero con bacterias en un medio;
 - b) aglomerar las proteínas a partir de la solución de proteína de la etapa a); y
 - c) aislar las proteínas aglomeradas del sobrenadante;

caracterizado porque dichas bacterias comprenden al menos un bacteria seleccionada de R2C2, INIX, ES1 y K2.
2. El proceso de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de fermentación se promueve por el co-cultivo de al menos dos microorganismos simultáneamente o sucesivamente.
3. El proceso de la reivindicación 1, en donde dicho proceso comprende además una etapa entre las etapas a) y b) por adición de un polisacárido.
4. El proceso de la reivindicación 1, en donde dicho proceso comprende además una etapa entre las etapas b) y c) por adición de un polisacárido.
5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la aglomeración de las proteínas fermentadas se efectúa por al menos un método seleccionado del grupo que consiste de adición de sal, modulación del pH, tratamiento térmico, adición de enzimas proteolíticas y adición de floculante.
6. El proceso de la reivindicación 2, que además comprende una etapa de pasteurización de dicha solución de proteínas antes de la etapa a).
7. El proceso de la reivindicación 6, en donde dicha etapa de pasteurización es seguida por una etapa de esterilización.
8. El proceso de la reivindicación 5, en donde dicho floculante es un floculante bacteriano.
9. El proceso de la reivindicación 8, en donde dicho floculante bacteriano es *L. Kefirgranum*.
10. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la separación de las proteínas aglomeradas del sobrenadante se efectúa por un método seleccionado del grupo de centrifugación y filtración.
11. Una matriz proteína maleable obtenible por el proceso de la reivindicación 1.
12. La matriz de la reivindicación 11, que además comprende un subproducto de fermentación de la fermentación de dicha solución que contiene dicha proteína por dicha bacteria.
13. La matriz de la reivindicación 11, que además comprende un péptido.
14. La matriz de la reivindicación 13, en donde dicho péptido comprende al menos dos residuos de aminoácidos.
15. La matriz de la reivindicación 13, en donde dicho péptido comprende más de cien residuos de aminoácidos.
16. La matriz de la reivindicación 12, en donde dicho subproducto de fermentación es un polisacárido.
17. La matriz de la reivindicación 16, en donde dicho polisacárido se selecciona del grupo de exopolisacárido y polisacárido aniónico.
18. La matriz de la reivindicación 16, en donde dicho polisacárido contiene al menos cuatro porciones de sacárido.
19. La matriz de la reivindicación 18, en donde dichas porciones de sacárido se seleccionan del grupo que consiste en formas D y L de glucosa, fructosa, xilosa, arabinosa, fucosa, galactosa, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido acético, sulfato de 3,6-anhidrogalactosa, galactosa-4-sulfato, galactosa-2-sulfato, galactosa-2, 6-disulfato, manosa, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido gularónico, ácido galactourónico, y ramnosa.

20. La matriz de la reivindicación 16, en donde dicho polisacárido tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 15,000,000 daltons.
- 5 21. La matriz de la reivindicación 16, en donde dicho peso molecular está en el intervalo de aproximadamente 5,000 a 6,000,000 daltons.
22. La matriz de la reivindicación 16, en donde dicho peso molecular está en el intervalo de aproximadamente 25,000 a 1,000,000 daltons.
- 10 23. La matriz de la reivindicación 16, en donde dicho polisacárido se selecciona del grupo que consiste en heteropolisacárido, homopolisacárido y mezcla de estos.
- 15 24. La matriz de la reivindicación 23, en donde dicho heteropolisacárido se selecciona del grupo que consiste en gelana, welana, goma arábica, goma karaya, goma okra, goma de aloe, goma de tragacanto, goma de *Anogeissus latifolia*, goma de semilla de membrillo, psyllium, galactanas, galactomananas, glucomananas, ácidos poliurónicos, sulfato de dextrano, heparina, pectina, alginato sódico y almidón arabinogalactana.
- 20 25. La matriz de la reivindicación 24, en donde dicha galactana se selecciona del grupo que consiste en agar, agarosa, kappa, carragenina, carragenina iota y carragenina lambda.
- 25 26. La matriz de la reivindicación 24, en donde dicha galactomanana se selecciona del grupo que consiste en goma de algarrobo y guar.
27. La matriz de la reivindicación 24, en donde dicha glucana se selecciona del grupo que consiste en celulosa y derivados de esta, almidón y derivados, dextranas, pululana, beta 1,3-glucanas, quitina, xantano y tamarindo.
28. La matriz de la reivindicación 24, en donde dicha glucomanana es konjac.
- 30 29. La matriz de la reivindicación 24, en donde dicho ácido poliurónico se selecciona del grupo que consiste en algina, alginato y pectina.
- 30 30. La matriz de la reivindicación 24, en donde dicho homopolisacárido es celulosa.
- 35 31. La matriz de la reivindicación 11, que además comprende una o más bacterias se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium boum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catanulatum*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium coryneforme*, *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium gallicum*, *Bifidobacterium gallinarum*, *Bifidobacterium indicum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium longum* DJOIOA, *Bifidobacterium longum* NCC2705, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium merycicum*, *Bifidobacterium minimum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum*, *Bifidobacterium pullorum*, *Bifidobacterium ruminantium*, *Bifidobacterium saeculare*, *Bifidobacterium scardovii*, *Bifidobacterium subtitle*, *Bifidobacterium suis*, *Bifidobacterium thermacidophilum*, *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *suis*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium urinalis*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Lactobacillus acidipiscis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus algidus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus animals*, *Lactobacillus arizonensis*, *Lactobacillus aviarvius*, *Lactobacillus bifermentans*; *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coleohominis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis*, *Lactobacillus corniformis* subsp. *torquens*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus cypricasei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus durianis*, *Lactobacillus equi*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus ferintoshensis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus formicis*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus fuchuensis*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasserii*, *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus hamsteri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*, *Lactobacillus heterohiochii*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus homohiochii*, *Lactobacillus intestinalis*, *Lactobacillus japonicus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus keferi*, *Lactobacillus kefirii*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus kimchii*, *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus letivazi*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus malefermentans*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus maltaromicus*, *Lactobacillus manihotivorans*, *Lactobacillus mindensis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus pantheris*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*, *Lactobacillus parakefiri*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus perolens*,

- Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pontis, Lactobacillus psittaci, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus rhamrosus, Lactobacillus ruminis, Lactobacillus sakei, Lactobacillus sakei L45, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus salivarius subsp. salicinius, Lactobacillus salivarius subsp. salivarius, Lactobacillus sanfranciscensis, Lactobacillus sharpeae, Lactobacillus sp. NGR1 0001, Lactobacillus suebicus, Lactobacillus thermotolerans, Lactobacillus vaccिनostercus, Lactobacillus vaginalis, Lactobacillus vermiforme, Lactobacillus versmoldensis, Lactobacillus zeae, Lactococcus garvieae, Lactococcus lactis, Lactococcus lactis subsp. cremoris, Lactococcus lactis subsp. hordniae, Lactococcus lactis subsp. lactis, Lactococcus lactis subsp. lactis bv. diacetylactis, Lactococcus piscium; Lactococcus plantarum, Lactococcus raffinolactis, Leuconostoc argentinum, Leuconostoc carnosum, Leuconostoc citreum, Leuconostoc fallax, Leuconostoc ficulneum, Leuconostoc fructosum, Leuconostoc gasicomitatum, Leuconostoc gelidum, Leuconostoc inhae, Leuconostoc kimchii, Leuconostoc lactis, Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris, Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum, Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides, Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides ATCC 8293, Leuconostoc pseudomesenteroides, Propionibacterium acidipropionici, Propionibacterium acnes; Propionibacterium australiense, Propionibacterium avidum; Propionibacterium cyclohexanicum, Propionibacterium freudenreichii, Propionibacterium freudenreichii subsp. freudenreichii, Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii, Propionibacterium granulosum, Propionibacterium jensenii, Propionibacterium lumphophilum; Propionibacterium microaerophilum; Propionibacterium propionicum y Propionibacterium thoenii.*
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
32. Un microorganismo R2C2 aislado de un consorcio obtenido de grano de kéfir bajo el número de acceso NML 041202-3.
33. Un microorganismo K2 aislado de un consorcio obtenido de grano de kéfir bajo el número de acceso NML 041202-1.
34. Un microorganismo ES1 aislado de un consorcio obtenido de grano de kéfir bajo el número de acceso NML 041202-2.
35. Un microorganismo INIX aislado de la cepa ATCC 43761.
36. Una composición que comprende la matriz de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 31 en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable.
37. Uso de la matriz de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 31, en donde dicho uso es para la fabricación de un producto seleccionado del grupo de producto alimenticio, producto médico, producto farmacéutico producto cosmético y nutracéutica.
38. Uso de la matriz de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 31, en donde dicho uso es para la fabricación de un producto alimenticio.
39. El uso como se reivindica en la reivindicación 38, en donde dicha matriz se usa como un estabilizador de emulsión o agente espesante.
40. El uso como se reivindica en la reivindicación 37 y 38, en donde dicho producto alimenticio se selecciona del grupo que consiste de mayonesa, aderezo, margarina, extensor, mantequilla, crema batida y sustituto bajo de grasa.
41. El uso como se reivindica en la reivindicación 37, en donde dicha matriz se usa como un vehículo de entrega.
42. Uso de la matriz de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 31, en donde dicho uso es para productos cosméticos.
43. El uso según la reivindicación 42, en donde dicho producto cosmético se selecciona del grupo consistente de loción para la piel, crema, protector solar, rubor, máscara, sombra de ojos, champú y acondicionador.
44. El uso de la matriz de cualquier una de las reivindicaciones 11 a 31 para la fabricación de un medicamento para aumentar la respuesta inmune en un sujeto.
45. El uso de la matriz de cualquier una de las reivindicaciones 11 a 31 para la fabricación de un medicamento para reducir el nivel de triglicérido en un sujeto.
46. El uso de la matriz de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 31 para la fabricación de un medicamento para reducir el nivel de TNF- α en un sujeto.

47. El uso de la matriz de cualquier una de las reivindicaciones 11 a 31 en la fabricación de un medicamento para aumentar el nivel de glutatión en un sujeto.

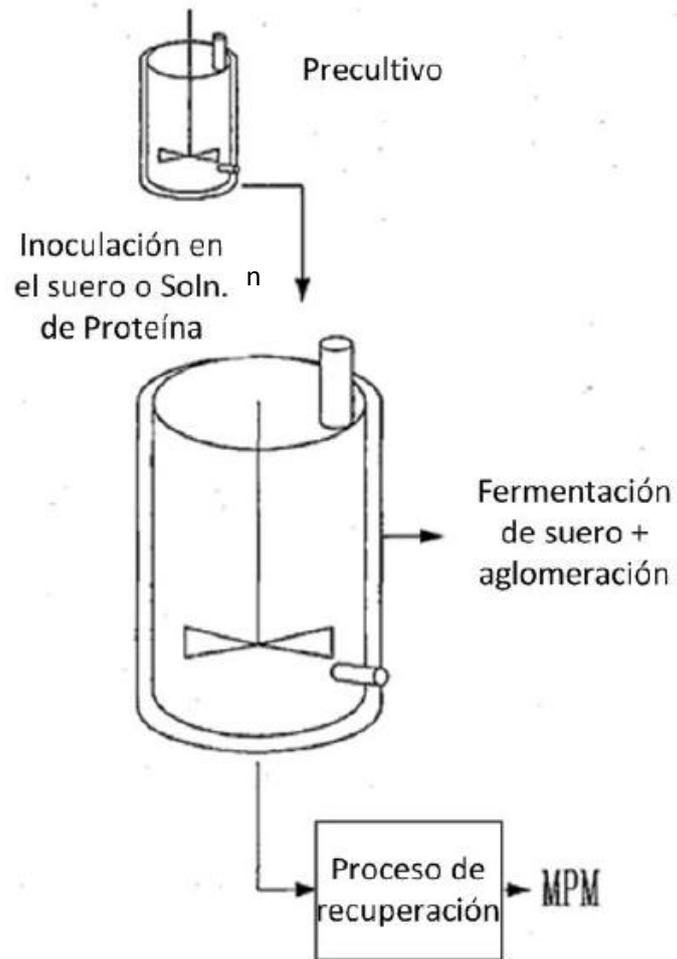


Figura 1

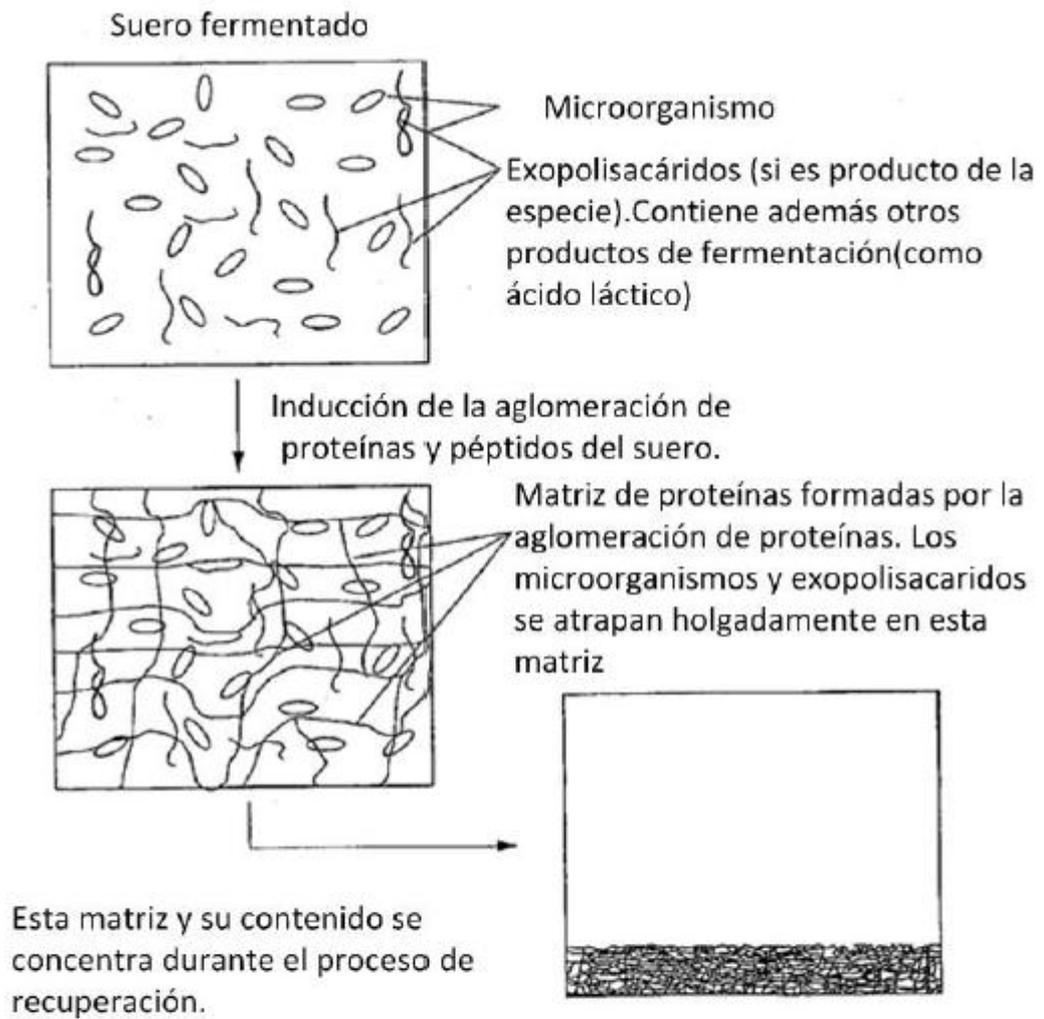


Figura 2

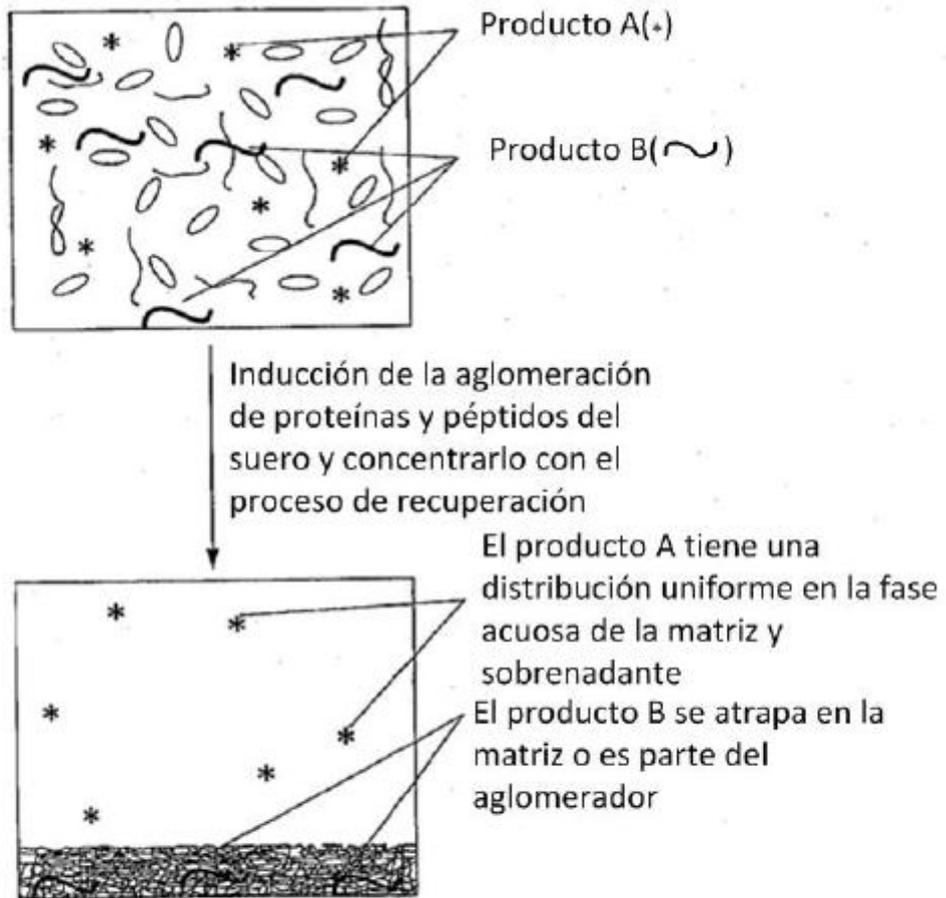


Figura 3

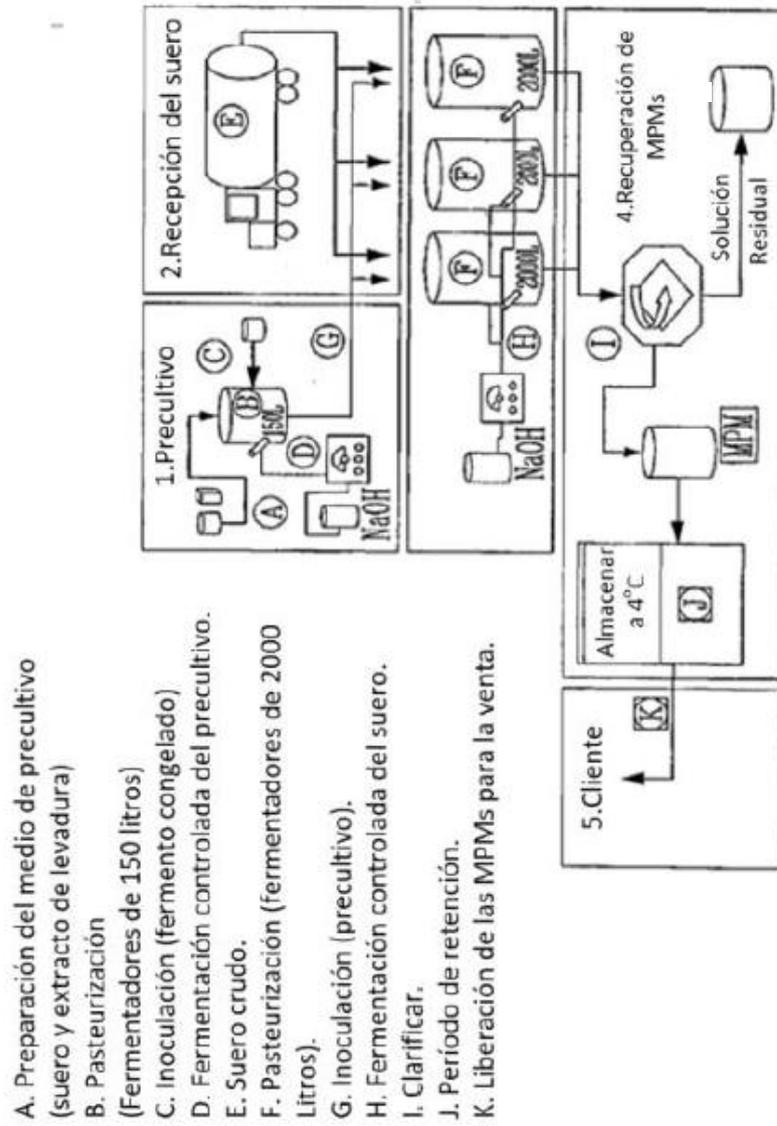


Figura 4

ES 2 451 618 T3

	1	75
INIX	(1)	GCAGAAACACTTCGGTGAGGACGCTGGGAAAGCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCTTA
K2	(1)	GCAGAAACACTTCGGTGAGGACGCTGGGAAAGCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCTTA
R2C2	(1)	GCAGAAACACTTCGGTGAGGACGCTGGGAAAGCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCTTA
ES1	(1)	--AGAATCACTTCGGTGAGGACGCTGGGAAAGCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCTTA
ATCC 43761	(1)	GCAGAAACACTTCGGTGAGGACGCTGGGAAAGCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCTTA
ATCC 51647	(1)	GCAGAAACACTTCGGTGAGGACGCTGGGAAAGCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCTTA
	76	150
INIX	(76)	AGTCTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGTTCGCATGAACAGCTTTTAAAAGGC
K2	(76)	AGTCTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGTTCGCATGAACAGCTTTTAAAAGGC
R2C2	(76)	AGTCTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGTTCGCATGAACAGCTTTTAAAAGGC
ES1	(74)	AGTCTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGTTCGCATGAACAGCTTTTAAAAGGC
ATCC 43761	(76)	AGTCTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGTTCGCATGAACAGCTTTTAAAAGGC
ATCC 51647	(76)	AGTCTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGTTCGCATGAACAGCTTTTAAAAGGC
	151	225
INIX	(151)	GGCGCAAGCTGTCGCTAAAGGATGGACCCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCCTACCAAGGCAGTG
K2	(151)	GGCGCAAGCTGTCGCTAAAGGATGGACCCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCCTACCAAGGCAGTG
R2C2	(151)	GGCGCAAGCTGTCGCTAAAGGATGGACCCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCCTACCAAGGCAGTG
ES1	(149)	GGCGCAAGCTGTCGCTAAAGGATGGACCCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCCTACCAAGGCAGTG
ATCC 43761	(151)	GGCGCAAGCTGTCGCTAAAGGATGGACCCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCCTACCAAGGCAGTG
ATCC 51647	(151)	GGCGCAAGCTGTCGCTAAAGGATGGACCCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCCTACCAAGGCAGTG
	226	300
INIX	(226)	ATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA
K2	(226)	ATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA
R2C2	(226)	ATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA
ES1	(224)	ATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA
ATCC 43761	(226)	ATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA
ATCC 51647	(226)	ATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA

Figura 5A

ES 2 451 618 T3

	301		375
INIX (301)	GTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACCCCGGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGACCGTAA		
K2 (301)	GTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACCCCGGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGACCGTAA		
R2C2 (301)	GTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACCCCGGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGACCGTAA		
ES1 (299)	GTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACCCCGGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGACCGTAA		
ATCC 43761 (301)	GTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACCCCGGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGACCGTAA		
ATCC 51647 (301)	GTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACCCCGGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGACCGTAA		
	376		450
INIX (376)	AGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATACAGGTAGTAAGTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGG		
K2 (376)	AGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATACAGGTAGTAAGTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGG		
R2C2 (376)	AGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATACAGGTAGTAAGTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGG		
ES1 (374)	AGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATACAGGTAGTAAGTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGG		
ATCC 43761 (376)	AGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATACAGGTAGTAAGTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGG		
ATCC 51647 (376)	AGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATACAGGTAGTAAGTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGG		
	451		525
INIX (451)	CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGCCGTAAGCGAGCG		
K2 (451)	CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGCCGTAAGCGAGCG		
R2C2 (451)	CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGCCGTAAGCGAGCG		
ES1 (449)	CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGCCGTAAGCGAGCG		
ATCC 43761 (451)	CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGCCGTAAGCGAGCG		
ATCC 51647 (451)	CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGCCGTAAGCGAGCG		
	526		600
INIX (526)	CAGCCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAATTGCATCGGAAACTGTTTTCTTGAG		
K2 (526)	CAGCCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAATTGCATCGGAAACTGTTTTCTTGAG		
R2C2 (526)	CAGCCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAATTGCATCGGAAACTGTTTTCTTGAG		
ES1 (524)	CAGCCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAATTGCATCGGAAACTGTTTTCTTGAG		
ATCC 43761 (526)	CAGCCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAATTGCATCGGAAACTGTTTTCTTGAG		
ATCC 51647 (526)	CAGCCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAATTGCATCGGAAACTGTTTTCTTGAG		

Figura 5B

ES 2 451 618 T3

	601		675
INIX (601)	TGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAATACCACTGGCGAAG-		
K2 (601)	TGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAATACCACTGGCGAAG-		
R2C2 (601)	TGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAATACCACTGGCGAAG-		
ES1 (599)	TGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAATACCACTGGCGAAG-		
ATCC 43761 (601)	TGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAATACCACTGGCGAAG-		
ATCC 51647 (601)	TGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAATACCACTGGCGAAG-		
	676		750
INIX (675)	CGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC		
K2 (675)	CGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC		
R2C2 (675)	CGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC		
ES1 (673)	CGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC		
ATCC 43761 (676)	CGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC		
ATCC 51647 (675)	CGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC		
	751		825
INIX (750)	ATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGCTCCGCCTCAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC		
K2 (750)	ATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGCTCCGCCTCAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC		
R2C2 (750)	ATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGCTCCGCCTCAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC		
ES1 (748)	ATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGCTCCGCCTCAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC		
ATCC 43761 (751)	ATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGCTCCGCCTCAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC		
ATCC 51647 (750)	ATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGCTCCGCCTCAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC		
	826		900
INIX (825)	GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT		
K2 (825)	GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT		
R2C2 (825)	GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT		
ES1 (823)	GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT		
ATCC 43761 (826)	GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT		
ATCC 51647 (825)	GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT		

Figura 5C

ES 2 451 618 T3

	901	975
INIX (900)	TTAATTCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCTAGTGCCATTTGTAGAGATACAAGTCCCTTC	
K2 (900)	TTAATTCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCTAGTGCCATTTGTAGAGATACAAGTCCCTTC	
R2C2 (900)	TTAATTCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCTAGTGCCATTTGTAGAGATACAAGTCCCTTC	
ES1 (898)	TTAATTCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCTAGTGCCATTTGTAGAGATACAAGTCCCTTC	
ATCC 43761 (901)	TTAATTCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCTAGTGCCATTTGTAGAGATACAAGTCCCTTC	
ATCC 51647 (900)	TTAATTCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCTAGTGCCATTTGTAGAGATACAAGTCCCTTC	
	976	1050
INIX (975)	GGGACGCTAAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG	
K2 (975)	GGGACGCTAAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG	
R2C2 (975)	GGGACGCTAAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG	
ES1 (973)	GGGACGCTAAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG	
ATCC 43761 (976)	GGGACGCTAAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG	
ATCC 51647 (975)	GGGACGCTAAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG	
	1051	1125
INIX (1050)	CGCAACCCTTGTATTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAACCCGGAGGAAGG	
K2 (1050)	CGCAACCCTTGTATTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAACCCGGAGGAAGG	
R2C2 (1050)	CGCAACCCTTGTATTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAACCCGGAGGAAGG	
ES1 (1048)	CGCAACCCTTGTATTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAACCCGGAGGAAGG	
ATCC 43761 (1051)	CGCAACCCTTGTATTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAACCCGGAGGAAGG	
ATCC 51647 (1050)	CGCAACCCTTGTATTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAACCCGGAGGAAGG	
	1126	1200
INIX (1125)	TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGCACAAACGAGCA	
K2 (1125)	TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGCACAAACGAGCA	
R2C2 (1125)	TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGCACAAACGAGCA	
ES1 (1123)	TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGCACAAACGAGCA	
ATCC 43761 (1126)	TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGCACAAACGAGCA	
ATCC 51647 (1125)	TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGCACAAACGAGCA	

Figura 5D

ES 2 451 618 T3

```

1201
INIX (1200) GCGAGCCTGCAAAGGCAAGCAAATCTCTGAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
K2 (1200) GCGAGCCTGCAAAGGCAAGCAAATCTCTGAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
R2C2 (1200) GCGAGCCTGCAAAGGCAAGCAAATCTCTGAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
ES1 (1198) GCGAGCCTGCAAAGGCAAGCAAATCTCTGAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
ATCC 43761 (1201) GCGAGCCTGCAAAGGCAAGCAAATCTCTGAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
ATCC 51647 (1200) GCGAGCCTGCAAAGGCAAGCAAATCTCTGAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
1275
INIX (1275) AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTC
K2 (1275) AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTC
R2C2 (1275) AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTC
ES1 (1273) AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTC
ATCC 43761 (1276) AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTC
ATCC 51647 (1275) AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTC
1350
INIX (1350) ACACCATGGGAGTCTGCAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCGCAAGGAAGGAGCCGCTAA
K2 (1350) ACACCATGGGAGTCTGCAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCGCAAGGAAGGAGCCGCTAA
R2C2 (1350) ACACCATGGGAGTCTGCAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCGCAAGGAAGGAGCCGCTAA
ES1 (1348) ACACCATGGGAGTCTGCAATGCCCAAAGCCGGTGGCC-----
ATCC 43761 (1351) ACACCATGGGAGTCTGCAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCGCAAGGAAGGAGCCGCTAA
ATCC 51647 (1350) ACACCATGGGAGTCTGCAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCGCAAGGAAGGAGCCGCTAA
1412

```

Figura 5E