

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 537**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/28** (2006.01)

**A01H 4/00** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2001 E 01945690 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 1407678**

54 Título: **Cápsulas que contienen células o tejidos vivos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.09.2015**

73 Titular/es:

**MORISHITA JINTAN CO., LTD. (100.0%)  
2-40, Tamatsukuri 1-chome Chuo-ku Osaka-shi  
Osaka 540-8566, JP**

72 Inventor/es:

**ASADA, MASANORI;  
HATANO, YUMI;  
KAMAGUCHI, RYOSEI y  
SUNOHARA, HIDEKI**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Carlos**

ES 2 546 537 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**

Cápsulas que contienen células o tejidos vivos

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a cápsulas que contienen células o tejidos vivos (vitales) y a aplicaciones de las mismas. Más específicamente, la presente invención se refiere a cápsulas que contienen células o tejidos vivos derivados de microorganismos, plantas o animales como inclusión y en las que estas células o tejidos pueden cultivarse. La presente invención se refiere a alimentos que incorporan dichas cápsulas.

Antecedentes técnicos

15 Los alimentos fermentados obtenidos permitiendo a microorganismos actuar sobre alimentos, han sido consumidos desde la antigüedad. El yogur, que es un alimento fermentado típico, se obtiene permitiendo que bacterias lácticas, *bifidus bacillus* o similares (en lo sucesivo, a menos que se indique lo contrario, se abrevian colectivamente como "bacterias lácticas") actúen sobre la leche. Cuando se ingiere el yogur, las bacterias lácticas son suministradas a los intestinos, actúan activamente en los mismos y mejoran activamente trastornos intestinales. Sin embargo, dado que la mayoría de las bacterias lácticas mueren en el estómago debido a su fuerte acidez, solamente unas pocas bacterias lácticas vivas pueden alcanzar el intestino.

25 Para resolver este problema, se ha intentado contener bacterias lácticas en una cápsula entérica para suministrar las bacterias lácticas a los intestinos (por ejemplo, la publicación de patente japonesa abierta a inspección pública N° 8-242763). Sin embargo, las bacterias lácticas contenidas en la cápsula son liofilizadas y se requiere mucho tiempo hasta que las bacterias lácticas liofilizadas absorben agua y muestran sus actividades de nuevo.

Si se pueden suministrar células vivas a los intestinos, las células vivas pueden mostrar sus actividades inmediata y suficientemente. Por lo tanto, existe una demanda de una técnica para suministrar células vivas a los intestinos.

30 Por otro lado, el notable avance de la biotecnología ha afectado a diversos sectores tales como el desarrollo de productos farmacéuticos o la mejora de plantas. En el sector de las plantas, se han producido intentos de producir semillas artificiales a partir de tejidos de células vegetales rediferenciables (en lo sucesivo, denominados simplemente como "tejidos de células"). En general, para producir semillas artificiales, en primer lugar, tejidos de células se dispersan o suspenden en una solución de polisacáridos, sustancia polimérica de bajo peso molecular o polímero reticulable. A continuación, esta dispersión o suspensión se gelifica de modo que los tejidos de células están comprendidos en geles, seguido por ser moldeados en forma de una perla, una placa, una barra o una fibra.

40 Sin embargo, las semillas artificiales en las que tejidos de células están comprendidos en geles tal como se ha descrito anteriormente no tienen tolerancia con respecto a sequedad cuando se dejan a temperatura ambiente. Por lo tanto, dichas semillas artificiales tienen que sembrarse en el plazo de cuatro días después de que son preparadas. Además, estas semillas artificiales no se pueden almacenar ni siquiera durante un mes, a menos que se almacenen en un frigorífico o en un líquido para impedir que se sequen. Por lo tanto, es difícil almacenarlas en un lugar seco, tal como un granero de una granja o un almacén, sin una instalación refrigerante especial.

45 Para mejorar este problema de sequedad, se ha intentado recubrir la superficie de los geles con parafina, cera o similares. Es posible mejorar la estabilidad en almacenamiento cubriendo la superficie de los geles. Sin embargo, dado que la parafina o la cera es estable y apenas se degrada, las semillas artificiales cubiertas con parafina o cera no pueden germinar cuando son sembradas en tierra. Por lo tanto, es necesario realizar una abertura para cada semilla artificial cuando se siembra, lo que es incómodo. Por lo tanto, dichas semillas artificiales no pueden utilizarse de forma práctica.

50 La solicitud de patente francesa FR 2650758 da a conocer un gránulo multicapa que comprende un núcleo que incorpora una semilla vegetal natural o artificial; una capa más cercana al núcleo, una "primera capa" que incorpora bacterias y/o hongos que son beneficiosos para las plantas, para proporcionar fertilizantes microbiológicos, o sustancias que estimulan o retardan la germinación; y una capa situada inmediatamente después, o "segunda capa" que es una capa de protección.

60 Tal como se ha descrito anteriormente, existe demanda de una técnica para comprender células vivas y cultivar las células vivas. Dicha técnica puede aplicarse no solamente en un sector de química alimentaria, sino también en una amplia gama de sectores, por ejemplo, sector farmacéutico o agrícola. En particular, en el sector de las semillas artificiales, existe una demanda de semillas artificiales que puedan almacenarse durante, como mínimo, tres meses en un lugar seco sin una instalación de refrigeración especial, y que puedan germinar en unos pocos días cuando son sembradas en tierra. Si dichas semillas artificiales se pudieran obtener, esta técnica podría aplicarse realmente a una amplia gama de sectores, por ejemplo, agricultura, silvicultura, horticultura y floricultura, en combinación con una técnica para cultivar tejidos de células vegetales, una técnica de clonación o una técnica libre de virus.

65

Características de la invención

5 Los inventores de la presente invención llevaron a cabo investigación en profundidad para resolver el problema anterior. En consecuencia, los inventores de la presente invención descubrieron que se pueden producir cápsulas que contienen células o tejidos vivos suspendidos en un líquido, y que esto puede aplicarse a los sectores de alimentos y agricultura (para este último ninguna protección es reivindicada mediante la presente solicitud) y, de este modo, han conseguido la presente invención.

10 La presente invención da a conocer una cápsula que contiene un líquido en el que están suspendida una célula o tejido vivo, en la que la célula o tejido puede crecer en el líquido con las características de la reivindicación 1.

En una realización preferente, la cápsula es una cápsula blanda sin costuras.

15 En una realización preferente, la célula o el tejido es una célula o un tejido vegetal utilizado para alimentos.

20 En una realización preferente, la célula o el tejido es una o dos o más células o tejidos seleccionados entre el grupo que consiste en bacterias del ácido láctico (incluyendo bifidus bacillus), Bacillus natto, levadura de panadería, levadura de cervecera, hongos filamentosos para destilación, algas unicelulares, algas pluricelulares, plantas comestibles, tejidos vegetales comestibles y sus bacterias o tejidos liofilizados.

25 La presente invención también se refiere a un alimento que incorpora las cápsulas descritas anteriormente y, preferentemente, los alimentos que incorporan las cápsulas son bebidas de zumo de frutas, zumo de verduras, bebidas saludables, leche procesada, leche de soja, mermelada, yogur, bebidas con bacterias del ácido láctico, leche fermentada, bebidas carbonatadas, agua mineral saborizada y pudín.

30 En una realización para la que no se reivindica protección mediante la presente solicitud, la membrana externa es seca.

35 En una realización para la que no se reivindica protección mediante la presente solicitud, el tejido de células vegetales rediferenciables se selecciona entre el grupo que comprende embriones adventicios, yemas adventicias, brotes múltiples, ápices de brotes, puntos de crecimiento, cuerpos similares a protocormo, raíces adventicias y raíces capilares.

40 En una realización para la que no se reivindica protección mediante la presente solicitud, la membrana interna es aceite endurecido microbiológicamente degradable que es sólido a temperatura ambiente.

45 En otra realización para la que no se reivindica protección mediante la presente solicitud, la membrana externa es una membrana externa microbiológicamente degradable seleccionada entre el grupo que comprende proteínas, polisacáridos y plásticos biodegradables.

Breve descripción de los dibujos

50 La figura 1 es una vista de sección transversal esquemática de una semilla artificial para la que no se reivindica protección mediante la presente solicitud.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

55 Dado que era difícil encapsular sustancias acuosas, solamente se encapsulaban células secas. Se creía que era imposible cultivar las células o los tejidos que estén comprendidos en una cápsula y, por lo tanto, no se realizaron intentos de contener y cultivar las células o tejidos en una cápsula. Sin embargo, los inventores de la presente invención tuvieron éxito en encapsular sustancias acuosas por primera vez, y descubrieron que las células o los tejidos no mueren y pueden crecer incluso si están comprendidos en la sustancia acuosa en la cápsula y, por lo tanto, consiguieron la presente invención.

60 Por ejemplo, la presente invención puede proporcionar el siguiente efecto. Convencionalmente, solamente se podían suministrar bacterias lácticas, bifidus bacillus o similares liofilizadas, de modo que solamente se obtenía un efecto moderado de mejoría de trastornos intestinales. Por el contrario, mediante la presente invención, un efecto inmediato y potente de mejoría de trastornos intestinales se puede provocar suministrando bacterias lácticas, bifidus bacillus o similares vivos. Además, dado que las células o tejidos pueden crecer en las cápsulas, se pueden obtener cápsulas que tienen una densidad de bacterias más elevada (por ejemplo, aproximadamente de  $10^{10}$  a  $10^{11}$ /g de la cápsula). Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar en una amplia gama de aplicaciones tales como biorreactores, productos farmacéuticos, medicina, y semillas artificiales, además de aplicación alimentaria tal como se ha descrito anteriormente.

65 En una realización preferente, la proporción del líquido comprendido en la cápsula (líquido interno) es aproximadamente el 30% en peso con respecto al peso total de la cápsula. En este caso, la densidad de células

bacterianas del líquido interno pasa a ser de hasta  $3,3 \times 10^{11}$ /ml. A menos que las células bacterianas estén contenidas en la cápsula, no es posible cultivar las células bacterianas a una densidad tan elevada. Además, cuando las células bacterianas se cultivan y se concentran a una densidad tan elevada, la viscosidad de la suspensión de células bacterianas pasa a ser muy elevada. Por lo tanto, es muy difícil contener una densidad tan elevada de suspensión de células bacterianas en la cápsula desde el exterior con técnicas actuales, lo que demuestra la utilidad de la presente invención más claramente.

“Cápsula” en la presente memoria descriptiva se refiere a una estructura que tiene una membrana externa y es capaz de comprender o contener un líquido, una suspensión o una solución de cultivo que incorpora células o tejidos dentro de la membrana externa. La cápsula generalmente tiene una forma esférica, pero no están limitadas a la forma esférica.

Como membrana externa de la cápsula, se puede utilizar cualquier membrana, siempre que se utilice convencionalmente para cápsulas. Como membrana, puede utilizarse una membrana hecha de polímero natural o un polímero sintético. Cuando se utiliza para aplicaciones alimentarias, una membrana hecha de polímero natural es preferente.

Para la forma de la cápsula, se puede utilizar una estructura de dos capas, y se puede utilizar una estructura de tres capas o una estructura que tiene más capas. Una estructura de tres capas es preferente.

En el caso de una estructura de tres capas, una capa más interna es un líquido que incorpora células o tejidos vivos, una capa intermedia que cubre el líquido de la capa más interna es una membrana lipófila, y una capa más externa es una membrana externa. Es preferente que la membrana externa tenga una o más propiedades de comestibilidad, fácil de descomponer (por ejemplo, biodegradable), propiedades entéricas, insolubilidad en agua y biocompatibilidad, según la aplicación.

La capa más interna (inclusión) es un líquido tal como agua, una solución fisiológica salina, un tampón, un medio de cultivo e incorpora componentes necesarios para cultivar o mantener las vidas de las células o tejidos.

A continuación, se describirán, en primer lugar, cápsulas utilizadas en aplicaciones alimentarias, y a continuación se describirán semillas artificiales.

Para utilización en aplicaciones alimentarias, diversos aceites y grasas, ácidos grasos o éster de ácido graso de sacáridos que son comestibles pueden utilizarse como membrana lipófila de la capa intermedia. Preferentemente, pueden utilizarse aceites y grasas animales, aceites y grasas vegetales, aceites y grasas de los mismos tratados biológica o químicamente. Los ejemplos de aceites y grasas comestibles incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, diversos aceites de fritura por inmersión, aceite para ensalada, aceite endurecido que tiene un punto de fusión de  $35^{\circ}\text{C}$  o menos, vitamina E, aceite de germen de trigo, aceite de sésamo, manteca de cacao, mantequilla, margarina, manteca, y éster de ácido graso de sacarosa. Utilizando estos materiales lipófilos, pueden obtenerse cápsulas que comprenden sustancias acuosas.

Cuando las cápsulas de la presente invención se utilizan para aplicaciones alimentarias, como membrana externa comestible, se pueden utilizar membranas poliméricas naturales tales como gelatina, agar, pectina, ácido alginico, carragenano, curdlano, almidón, gima de gelano, glucomanano, o mezclas de los mismos. Además, si se desea, una membrana polimérica comestible obtenida añadiendo una proteína, una glucoproteína, un mucopolisacárido, un sacárido, un alcohol de azúcar, un polialcohol o similares a la membrana externa comestible anterior también es preferente como membrana externa. Los ejemplos específicos de polímero natural incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, goma arábiga, pululano, dextrano, goma xantana, goma de algarrobo, colágeno y caseína.

Además, se pueden seleccionar membranas externas que son solubles en la boca, el estómago, el intestino delgado o el intestino grueso o membranas externas que son insolubles y se descargan, si se desea. La membrana externa que es soluble en los intestinos, por ejemplo, puede obtenerse combinando gelatina o agar y pectina. Para la membrana externa, puede añadirse glicerina teniendo en cuenta la moldeabilidad.

En el caso de una estructura de tres capas, se muestran ejemplos de combinaciones preferentes, en el orden de la capa intermedia (membrana interna) - la capa más externa, por ejemplo, aceite de vitamina E - agar, aceite de germen de trigo - alginato sódico, un éster de ácido graso de sacarosa - gelatina, éster de ácido graso medio de glicerina - carragenano. Entre estos, aceite de vitamina E - del 2 al 4% de agar y aceite de germen de trigo - del 2 al 4% de alginato sódico son preferentes en términos de las propiedades de la cápsula obtenida.

La proporción de constitución de la inclusión (la capa más interna), la capa intermedia y la capa más externa depende del tamaño de la cápsula, pero es preferentemente de 10 a 70:10 a 50:5 a 50 en peso, y más preferentemente de 30 a 50:25 a 40:25 a 40.

La cápsula de la presente invención es preferentemente una cápsula blanda sin costuras. Si la cápsula sin costuras tiene una estructura de capas múltiples, cada una de las capas intermedias y la capa más externa pueden hacerse

delgadas. De este modo, parece que una sustancia que es necesaria para el crecimiento de las células o los tejidos puede moverse más fácilmente entre el interior y el exterior de la cápsula, permitiendo de este modo que crezcan las células o los tejidos en la cápsula. Además, las células cultivadas no pueden escapar al exterior de la cápsula.

5 Además, dependiendo de la aplicación, la capa más externa puede ser una membrana que tiene un gran tamaño de poro, buena permeabilidad y una baja resistencia a la transferencia de masa, o una membrana que tiene un pequeño tamaño de poro, propiedades de barrera elevadas y una elevada resistencia a la transferencia de masa. Además, una cápsula que tiene diversas funciones puede prepararse, por ejemplo, añadiendo una sustancia cargada a la membrana externa, de modo que la membrana externa tenga selectividad para dejar pasar un material  
10 cargado.

No existe ninguna limitación respecto a las células o los tejidos a contener en la cápsula. Pueden utilizarse bacterias, levaduras, mohos, algas, células vegetales, tejidos vegetales o animales, dependiendo de la aplicación.

15 Los ejemplos de células o tejidos vegetales utilizados en aplicaciones alimentarias incluyen bacterias lácticas (incluyendo *bifidus bacillus*), *Bacillus natto*, levaduras de panadería, levaduras de cervecería (por ejemplo, levaduras de vino, levaduras de sake, levaduras de soja, o levaduras de salsa de soja), hongos filamentosos para destilación (por ejemplo, *Aspergillus oryzae*), algas unicelulares (por ejemplo, *Chlorella pyrenoidosa*, *Spirulina*), algas pluricelulares (por ejemplo, *Undaria pinnatifida*, enredadera marina), plantas comestibles y tejidos de plantas comestibles (por ejemplo, ginseng).  
20

Las cápsulas que contienen estas células o tejidos pueden producirse mediante un procedimiento utilizado habitualmente por los expertos en la materia. Cuando la cápsula tiene una estructura de tres capas, lo más preferente es realizar una cápsula blanda sin costuras. Un procedimiento para producir una cápsula blanda sin  
25 costuras se da a conocer en, por ejemplo, la publicación de patente japonesa abierta a inspección pública No. 5-31352, los documentos *Food Processing Technology* vol. 15, págs. 28-33, 1995, o *Bioscience and Industry*, vol. 58, No. 7, págs. 31-34 (2000). En particular, es más preferente producir una cápsula blanda sin costuras con una sustancia oleosa (por ejemplo, aceite endurecido) como capa intermedia (membrana interna) utilizando un procedimiento de goteo con una tobera tubular triple.  
30

La cantidad de las células o tejidos contenidos en la cápsula puede variar desde la cantidad mínima que permite la superficie o el crecimiento hasta una densidad celular que se puede alcanzar cultivando y recogiendo células o tejidos por filtración o centrifugado. Sin embargo, en la presente invención, dado que es posible incrementar el número de células o tejidos en la cápsula a una alta densidad, que es una característica de la presente invención, la  
35 concentración de las células o tejidos a inocular en la cápsula es suficiente a tan solo la del nivel de subcultivo.

El tamaño de partícula promedio de la cápsula blanda sin costuras depende de la aplicación de la cápsula. En general, el tamaño medio de partícula es de 0,1 mm a 10 mm, más preferentemente de 0,2 a 8 mm. Cuando la cápsula se utiliza para alimentos, el tamaño de partícula promedio es, preferentemente, 4 mm o menos, y más preferentemente de 0,1 mm a 2 mm. Dicha cápsula blanda sin costuras se puede beber fácilmente como tal, sin embargo, para comer más fácilmente, la superficie de la cápsula puede estar revestida con una pasta o un  
40 espesante tal como almidón, un almidón hidrolizado o pectina.

Las células o tejidos vivos contenidos en la cápsula blanda sin costuras pueden crecer incluso en la cápsula preferentemente suspendiendo la cápsula en un medio de cultivo adecuado. En particular, en el caso en el que un material de membrana que requiere iones metálicos multivalentes para la formación de gel, tal como alginato, se utilice como membrana externa, es preferente añadir iones metálicos multivalentes al medio en una concentración necesaria para mantener la intensidad del gel. Por lo tanto, en el caso de ácido alginico, pueden añadirse cloruro cálcico, cloruro de estroncio, cloruro de bario o cloruro de aluminio en del 0,01 al 5% en peso con respecto al peso del medio, preferentemente del 0,5 al 3% en peso.  
50

Por ejemplo, cuando se cultiva una cápsula que contiene *bifidus bacillus*, el *bifidus bacillus* se puede cultivar y crecer en la cápsula, de modo que el número los *bifidus bacillus* vivos en la cápsula es de hasta varias decenas de miles de millones/g o más de la cápsula. Además, dado que se cultivan células vivas en la cápsula, metabolitos (por ejemplo, bacteriocina, polisacáridos), se mantienen en la cápsula, mientras que dichos metabolitos pueden perderse cuando se cultivan bacterias en un tanque y se lavan con agua. Por lo tanto, cuando *bifidus bacillus* que ha crecido en la cápsula es ingerido en forma de la cápsula entera, puede mostrarse un efecto más inmediato y potente de mejoría de trastornos intestinales en comparación con la ingestión de un polvo de una bacteria liofilizada. Además, también puede proporcionarse un efecto de suavizar la piel y la articulación.  
60

En cápsulas que contienen bacterias lácticas vivas, las bacterias lácticas se pueden cultivar y crecer en la cápsula. Por lo tanto, cuando la cápsula se utiliza como biorreactor de fermentación ácido láctica, puede producirse ácido láctico con alta eficiencia, dado que no existe ninguna contaminación de bacterias lácticas, y es fácil recuperar el ácido láctico.  
65

En la presente invención, las células o los tejidos contenidos en la cápsula pueden crecer en un medio deseado. La

cápsula que contiene las células o tejidos cultivados puede utilizarse para alimentos o similares. Por ejemplo, bacterias del ácido láctico (*bifidus bacillus*), tejidos de ginseng o similares se introducen en una cápsula y se cultivan en la cápsula. Después de ello, las cápsulas se añaden a bebidas de zumo de frutas, zumo de verduras, bebidas saludables, leche de soja, mermelada, leche procesada, yogur, bebidas de bacterias del ácido láctico, leche fermentada, bebidas carbonatadas, agua mineral saborizada, pudín, o similares, para producir alimentos que incorporan las cápsulas de la presente invención. En la presente invención, "mermelada" incluye alimentos de tipo gel. Los alimentos a los que se pueden añadir las cápsulas no están limitados a los alimentos anteriores.

No existe ninguna limitación particular respecto a la cantidad de las cápsulas añadida a alimentos, pero de 0,1 a 10 g con respecto a 100 g de alimentos es preferente, y de 0,5 a 3 g es más preferente.

A continuación, se describirán las semillas artificiales para las que no se reivindica protección mediante la presente solicitud. Las semillas artificiales para las que no se reivindica protección mediante la presente solicitud pueden prepararse preferentemente en cápsulas blandas sin costuras que tienen una estructura de tres capas que tiene la capa más interna, la capa interna que cubre la capa más interna y la capa externa que cubre la capa interna o una estructura de capas múltiples que tiene más de tres capas. La figura 1 muestra una vista de sección transversal esquemática de las semillas artificiales para las que no se reivindica protección mediante la presente solicitud. La figura 1 es un diagrama para el caso de la estructura de tres capas. La capa más interna contiene, por ejemplo, un embrión adventicio, que es un tejido de células. Esta capa más interna está llena de un líquido o gel que incorpora componentes necesarios para mantener la vida del embrión adventicio y factor de crecimiento del mismo. La capa interna está compuesta por una membrana interna (mostrada como "membrana interna (membrana de aceite endurecido)" en la figura 1) que tiene aceite endurecido como componente principal. Esta membrana de aceite endurecido impide que el agua de la inclusión se evapore, y suprime la penetración de oxígeno. La capa más externa se muestra como "membrana externa (membrana de gelatina)" en la figura 1, y conserva la resistencia física y suprime la penetración de oxígeno.

En la descripción de diversos artículos académicos o documentos de patente, una única perla de gel de alginato cálcico puede denominarse como "cápsula". Sin embargo, dicha cápsula convencional es completamente diferente de la semilla artificial para la que no se reivindica protección mediante la presente solicitud, como es evidente a partir del procedimiento de producción descrito más adelante. Además, la superficie de las cápsulas de semilla artificial para las que no se reivindica protección mediante la presente solicitud es preferentemente seca, lo que muestra que las cápsulas de semilla artificial para las que no se reivindica protección mediante la presente solicitud son diferentes de la cápsula convencional compuesta por gel de ácido algínico húmedo.

Como tejido de células utilizado la presente invención e incluido en la capa más interna, pueden utilizarse preferentemente embriones adventicios, yemas adventicias, brotes múltiples, ápices de brotes, puntos de crecimiento, cuerpos similares a protocormo, raíces adventicias, raíces capilares o similares. También pueden utilizarse tejidos libres de virus.

Para mantener vivos los tejidos de células, es preferente suspender los tejidos de células en, por ejemplo, agua, solución fisiológica salina, un tampón, un medio de cultivo, o un líquido o un gel que incorpora componentes necesarios para mantener una actividad de diferenciación (germinación) de los tejidos de células (en lo sucesivo, denominado colectivamente como "medio"). Un medio que es adecuado para una planta deseada y utilizado por los expertos en la materia son, por ejemplo, el medio basal de Murashige & Skoog (1962: en lo sucesivo, denominado como "medio MS") o un medio modificado del mismo, aunque no existe ninguna limitación a esto. Además, también pueden añadirse hormonas vegetales, leche de coco, hidrolizado de caseína, extracto de levadura y similares, que se utilizan habitualmente en un medio de cultivo. Además, en el caso en el que se requiere mucho tiempo para descomponer la membrana interna y para germinar a partir del tejido después de la siembra, existe la posibilidad de que se produzcan daños en el tejido por microorganismos. En tal caso, pueden añadirse agentes antibacterianos para suprimir el crecimiento de los microorganismos.

Como membrana interna, pueden utilizarse preferentemente aceite y grasa que incorporan aceite endurecido como componente principal. "Que incorpora aceite endurecido como componente principal" significa que la membrana interna está compuesta por aceite endurecido solamente o una mezcla de aceite endurecido y otros aceites y grasas para ajustar las propiedades deseadas. Una membrana interna preferente es un aceite endurecido microbiológicamente degradable que es sólido a temperatura ambiente. "Aceite endurecido que es sólido a temperatura ambiente" se refiere a aceite endurecido que tiene un punto de fusión de aproximadamente 20°C o más. El punto de fusión puede ser de 30°C o más, 40°C o más, o 50°C o más. Se utiliza preferentemente aceite endurecido que tiene un punto de fusión de 20 a 50°C. Qué tipo de aceite endurecido utilizar se puede determinar en vista de la temperatura de almacenamiento, el tiempo de siembra o similares.

Como aceite endurecido, pueden utilizarse triglicéridos, diglicéridos o similares que incorporan ácidos grasos de cadena de carbono media. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, mantequilla, margarina, manteca, y manteca de cacao.

Es necesario que esta membrana interna sea impermeable, no solamente para formar una cápsula que comprende

una sustancia acuosa, sino también para evitar que se evapore el agua de la capa más interna (fase acuosa) que incorpora tejidos de células.

5 “Biodegradabilidad” o “microbiológicamente degradable” significa que la sustancia puede ser degradada o asimilada por microorganismos u otros organismos cuando es sembrada en tierra. Cuando el aceite endurecido se degrada o se asimila, la membrana interna compuesta por el aceite endurecido se descompone. De este modo, la barrera contra una liberación del tejido al exterior de la cápsula se elimina, y la permeabilidad al oxígeno se incrementa, lo que activa el tejido de células para que salga del estado durmiente, de modo que puedan producirse la diferenciación y el crecimiento del tejido.

10 Es preferente que la membrana externa se hinche con agua y sea biodegradable o microbiológicamente degradable, dado que una barrera contra la germinación se puede eliminar de modo que los tejidos de células puedan salir de la cápsula después de la diferenciación y crecimiento del tejido de células. Los ejemplos de las membranas externas que son biodegradables o microbiológicamente degradables incluyen proteínas, polisacáridos y plásticos biodegradables. Estas sustancias pueden utilizarse solas o en combinación de dos o más.

15 Los ejemplos de las proteínas incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, gelatina y colágeno. Estas sustancias pueden utilizarse solas o en combinación de dos o más.

20 Como polisacáridos, se utilizan preferentemente polisacáridos que forman gel. Los ejemplos de dichos polisacáridos incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, agar, carrageenano, goma arábica, goma de gelano, goma xantana, pectina, y ácido alginico. Estas sustancias pueden utilizarse solas o en combinación de dos o más.

25 Los ejemplos de plásticos biodegradables incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, ácido poliláctico, ácido polihidroxibutírico, y una mezcla de los mismos. Estas sustancias pueden utilizarse solas o en combinación de dos o más.

30 Además, si se desea, pueden modificarse propiedades de la membrana externa añadiendo sacáridos, alcohol de azúcar, alcohol polihídrico, pululano, quitosana o similares a las sustancias biodegradables descritas anteriormente.

35 Una membrana externa particularmente preferente es gelatina, cuyas propiedades de barrera al oxígeno pueden incrementarse después de que se seque.

Las cápsulas de semilla artificial para las que no se reivindica protección mediante la presente solicitud, pueden tener una estructura de cuatro o más capas, si se desea. Seleccionando materiales para la membrana externa, pueden dotarse de diversas propiedades a la membrana externa. Además, la superficie de las cápsulas de semilla artificial puede revestirse con productos farmacéuticos.

40 Un procedimiento general para producir una cápsula blanda sin costuras de tres capas ya se ha descrito anteriormente para aplicación alimentaria. Para semillas artificiales, por ejemplo, como inclusión (la capa más interna) de la cápsula, puede utilizarse un tamaño adecuado de embrión adventicio que se obtiene de un tejido de células (por ejemplo, embrión adventicio) que se cultiva en un medio líquido o un medio sólido y se suspende en un medio. Como membrana interna, puede utilizarse aceite endurecido que es sólido a temperatura ambiente. Como membrana externa, puede utilizarse una solución de sustancia biodegradable que tiene una concentración apropiada (por ejemplo, solución de gelatina al 22%). Utilizando esos componentes, la cápsula de tres capas puede producirse dejando caer una gota de cápsula en un líquido utilizando un aparato provisto de una tobera tubular triple. En este caso, se ajusta una bomba de modo que un embrión adventicio se coloca en el líquido interno en cada cápsula. La conformación y la solidificación de la cápsula se realizan en aceite de solidificación, de modo que se produce una cápsula que tiene una estructura de tres capas. El aceite de solidificación puede eliminarse de las cápsulas formadas y, a continuación, las cápsulas se someten a secado en tambor, de modo que se obtienen semillas artificiales de la cápsula seca en superficie que contienen embriones adventicios. El secado se realiza a una baja temperatura, de modo que los tejidos de células no mueren.

55 El tamaño de partícula de la cápsula de semilla artificial es de 1 mm a 12 mm, dependiendo del tamaño de los tejidos de células. Preferentemente, el tamaño es de 3 a 10 mm. El número de los tejidos de células a contener en una cápsula puede variar de uno a varios, dependiendo del tamaño del tejido. El número de los tejidos puede determinarse, de modo que la cápsula tenga propiedades apropiadas como las semillas artificiales en vista de la tasa de rediferenciación (tasa de germinación). El número de tejidos de células depende del tipo de la planta pero es preferentemente de 1 a 4.

60 Las cápsulas de semilla artificial obtenidas de este modo de la presente invención pueden almacenarse durante tres meses o más a temperatura ambiente en un granero seco o similar mientras conservan la capacidad de germinación. Por lo tanto, no existe necesidad de un frigorífico o almacenamiento especial en agua a baja temperatura. Si se almacenan en un frigorífico a 10°C o menos, puede conseguirse el almacenamiento a largo plazo de 6 meses o más.

La semilla artificial encapsulada para la que no se reivindica protección mediante la presente solicitud, puede ser una cápsula blanda sin costuras hueca que abarca un tejido de células vegetales rediferenciables (tejido de células). La cápsula está compuesta por una membrana interna hecha de aceite endurecido y una membrana externa hecha de gel biodegradable (proteína, polisacáridos) o plásticos biodegradables, donde la superficie de la cápsula (membrana externa) se seca. Dicha composición de la cápsula limita el suministro de oxígeno al interior de la cápsula, lo que permite que el tejido de células sobreviva en un estado durmiente en la cápsula. Además, se impide que el agua se evapore de la cápsula y la cápsula puede almacenarse durante dos meses o más a temperatura ambiente. Una vez que la cápsula se siembra en tierra, no solamente la membrana externa sino también el aceite endurecido de la membrana interna pueden degradarse por agua y las actividades de los microorganismos en la tierra, de este modo la permeabilidad al oxígeno puede incrementarse y el tejido de células puede despertarse del estado durmiente y se transfiere al estado de germinación.

### Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá más específicamente por medio de ejemplos, pero el alcance de la presente invención no está limitado por ellos.

Ejemplo 1: bebida de zumo de frutas que incorpora cápsulas que contienen bifidus bacillus vivo

Dos colonias en asas de siembra de platino de Bifidobacterium longum JCM7050 se inocularon en 100 ml de un medio de leche desnatada líquido que contenía el 15% de leche desnatada, el 0,4% de extracto de levadura, 3% de glucosa, y pH 6,5. Los cultivos se realizaron con agitación moderada a 60 rpm a 37°C durante 15 horas en un recipiente anaerobio utilizando AnaeroPack (fabricado por Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.). Dado que el pH se redujo durante el cultivo, el pH se mantuvo a 5,5 con una solución acuosa 5 M de NaOH, utilizando un regulador de pH automático. El número de bacterias después de 15 horas de cultivo era  $2 \times 10^9$ /ml medido contando las colonias cultivadas durante 24 horas en un medio de agar BL (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.) en condiciones anaerobias. Esta suspensión bacteriana se diluyó 100 veces con un medio de leche desnatada que tenía la misma composición que anteriormente excepto que el medio de leche desnatada al 15% se trató con pancreatina F al 0,01% (fabricada por Amano Pharmaceuticals) a 45°C durante 15 horas. El diluido se utilizó como líquido interno de la cápsula. En lo sucesivo, el medio de leche desnatada tratado con la pancreatina se denomina "medio de leche desnatada tratado con pancreatina".

A continuación, cápsulas que tienen una estructura de tres capas que contienen este líquido interno (tamaño de partícula promedio de 1,8 mm) se prepararon según la formulación mostrada en la tabla 1 utilizando un procedimiento de goteo con una tobera tubular triple para producir cápsulas blandas sin costuras. Como membrana externa, se utilizó agar y se realizaron conformación y solidificación en un líquido de solidificación.

Tabla 1

Capa	Componente	Proporción del componente* (% en peso)
Capa más interna	líquido con bifidus bacillus	30
capa interna	aceite de vitamina E	30
capa más externa	solución de agar al 2%	40
* con respecto al peso total de la cápsula		

A continuación, 100 g de estas cápsulas se colocaron en 1 l de un medio de leche desnatada tratado con pancreatina. El cultivo se realizó con burbujeo de un gas mixto compuesto por el 85% de nitrógeno, el 10% de hidrógeno y el 5% de dióxido de carbono (fabricado por Sumitomo Seika Chemicals Co. Ltd.) a un caudal de 100 ml/min, a 37°C durante 30 horas con agitación moderada a 50 rpm con una pala agitadora y ajustando el pH a 5,5. Después del cultivo, el número de bacterias vivas en la cápsula era de  $3 \times 10^{10}$ /g de la cápsula (peso húmedo).

Después de que las superficies de las cápsulas se lavaron con agua destilada estéril, las cápsulas se añadieron en una cantidad de 2 g a 100 ml de zumo de uva moscatel transparente. Por lo tanto, se preparó una bebida de zumo de uva moscatel que incorpora cápsulas en las que hay 60 miles de millones de bifidus bacillus vivos por 100 ml de zumo de uva moscatel. La bebida de zumo de uva moscatel que incorpora cápsulas que contienen bifidus bacillus vivos mantuvo su transparencia y sabía bien, dado que no existe ningún mal sabor peculiar de bifidus bacillus. Dado que bebida de zumo de uva moscatel que incorpora las cápsulas tiene un gran número de bifidus bacillus vivos, se espera que tenga efecto de mejora de trastornos intestinales.

Ejemplo 2: zumo de verduras que incorpora cápsulas que contienen bacterias del ácido láctico vivas

Bacterias del ácido láctico, Lactococcus lactis JCM7638, se sembraron y cultivaron en un medio de agar CMG (0,5% de extracto de levadura, 0,5% de polipeptona, 0,5% de NaCl, 1% de glucosa y 2% de agar). Un asa de siembra de



platino de colonias se inocularon en 20 ml de un medio de leche desnatada líquido de pH 6,5 que contenía el 12% de leche desnatada, el 0,4% de extracto de levadura, el 3% de glucosa y se cultivó estacionario a 37°C durante 15 horas. El número de bacterias después 15 horas de cultivo era  $2 \times 10^9$ /ml. Esta suspensión bacteriana se diluyó 500 veces con el mismo medio de leche desnatada y se utilizó como líquido interno de la cápsula.

5 A continuación, se prepararon cápsulas (tamaño de partícula promedio: 1,8 mm) que tenían una estructura de tres capas y que contenían este líquido interno de la misma manera descrita en el ejemplo 1.

10 A continuación, se utilizaron 100 g de las cápsulas obtenidas se colocaron en 500 ml de un medio de leche desnatada que tenía la misma composición que anteriormente excepto que la solución acuosa de leche desnatada al 12% que se trató con proteasa P al 0,01% (fabricada por Amono pharmaceuticals) a 40°C durante 15 horas (en lo sucesivo, denominada como "medio de leche desnatada tratado con proteasa P para bacterias del ácido láctico"). Las cápsulas se cultivaron a 37°C durante 2 días con agitación a 50 rpm y ajustando el pH a 5,2 con una solución 5 M de NaOH. El número de bacterias vivas en la cápsula después del cultivo era  $6 \times 10^{10}$ /g de la cápsula (peso húmedo), lo que indicaba que las bacterias del ácido láctico crecieron en la cápsula significativamente.

15 Después de que las cápsulas obtenidas de este modo se lavaron con agua destilada estéril, y a continuación las cápsulas se añadieron en una proporción de 1 g/100 ml a zumo de verduras. Aunque este zumo de verduras incorporaba una gran cantidad de bacterias del ácido láctico vivas, no era desagradable. Las cápsulas se tomaban fácilmente y sabían bien. Por lo tanto, una gran cantidad de bacterias del ácido láctico puede tomarse bebiendo el zumo de verduras, lo cual no se creía que fuera posible antes.

Ejemplo 3: bebida saludable que incorpora cápsulas que contienen células cultivadas de ginseng

25 En primer lugar, 5 g (peso húmedo) de tejidos de células de ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer) que había sido sometido a subcultivo en un medio líquido de Murashige-Skoog (pH 5,6) que contenía el 3% de sacarosa y 1 mg/l de ácido indol-3-acético (IAA) se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, seguido por adición de 100 ml del mismo medio, y a continuación se sometieron a cultivo a 25°C durante dos semanas con agitación a 120 rpm y, por lo tanto, se obtuvo un grupo de células libres. A continuación, este grupo de células libres se filtró con una malla de nylon que tenía un tamaño de agujero de 80  $\mu$ m, y un grupo de células finas que pasaban a través de la malla de nylon se filtró con una malla de nylon que tenía un tamaño de agujero de 20  $\mu$ m, y de este modo el grupo de células que se quedó en la malla se recogió. Este grupo de células se suspendió en una cantidad de 5 g (peso húmedo) en 100 ml del medio líquido de Murashige-Skoog que tenía la misma composición que anteriormente, y utilizado como líquido interno de la cápsula.

35 Las cápsulas blandas sin costuras se prepararon de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto que la suspensión celular, que era el líquido interno, se hizo vibrar mediante un vibrador durante la alimentación de la suspensión celular. A continuación, se recogieron 10 g de las cápsulas obtenidas que contienen células de ginseng y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, y se añadieron 100 ml del medio líquido de Murashige-Skoog que tenía la misma composición que anteriormente, y a continuación se sometieron a cultivo a 25°C a 50 rpm durante tres semanas. Las células de ginseng se cultivaron en la cápsula y se cargaron en la cápsula. A continuación, 2 g de las cápsulas obtenidas después del cultivo se lavaron con agua destilada estéril, y a continuación se añadieron a 50 ml de una bebida saludable (que tenía la misma composición que un producto llamado "Super Rikigen" fabricado por Morishita Jintan Co., Ltd y no contiene un extracto de ginseng) a la que se añadieron 0,05 g de pectina para la circulación de las cápsulas. De este modo, se preparó una bebida saludable que incorporaba cápsulas que contienen células de ginseng vivas. Esta bebida saludable no era amarga o desagradable, se tomaba fácilmente y sabía bien, aunque incorpora células de ginseng vivas.

Ejemplo 4: Leche de soja que incorpora cápsulas que contiene Bacillus natto

50 En primer lugar, a 500 ml de agua, se añadieron 100 g de harina de soja pulverizada, 5 g de sacarosa y 1 g de NaCl. La mezcla se autoclavó a 121°C durante 30 minutos, seguida por centrifugado para obtener un sobrenadante. En lo sucesivo, el sobrenadante se denomina como "medio con extracto de soja". A continuación, 10 ml del medio con extracto de soja se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, y se inocularon un asa de siembra de platino de las colonias de Bacillus natto (Bacillus subtilis IFO13169). El Bacillus natto se cultivó a 30°C durante 15 horas con agitación a 120 rpm. Todo el caldo de cultivo se añadió a 90 ml de un medio con extracto de soja, y se mezcló uniformemente para utilizar esta suspensión como líquido interno de la cápsula.

60 Se prepararon cápsulas de la misma manera que en el ejemplo 1. Cien gramos de las cápsulas obtenidas se añadieron a 400 ml de un medio con extracto de soja, y las cápsulas se cultivaron a 30°C durante 24 horas a 100 rpm. Los Bacillus natto se incrementaron en la cápsula durante el cultivo y produjeron una sustancia viscosa. El número de las bacterias era  $3 \times 10^9$  /g de la cápsula (peso húmedo). A continuación, 3 g de estas cápsulas se lavaron con agua destilada y se añadieron a 100 ml de leche de soja. Esta leche de soja que incorporaba las cápsulas no olía a Bacillus natto y sabía bien para una bebida. Esta bebida permite que Bacillus natto y una sustancia viscosa se tomen junto con leche de soja.

65

## Ejemplo 5: procedimiento para cultivar bifidus bacillus encapsulado

Cápsulas que contienen *Bifidobacterium longum* JCM7050, preparadas de la misma manera que en el ejemplo 1, se cargaron en una columna cilíndrica de 100 ml provista de una camisa para ajuste de la temperatura. A continuación, 1 l de leche desnatada tratada con pancreatina se colocó en un baño de medio externo, y se dejó fluir al medio desde la sección inferior de la columna rellena con la cápsula hasta la sección superior a 10 ml / min y volvió al baño de medio de nuevo para circulación. El pH en el baño de medio se mantuvo a 5,5 con solución acuosa 10 M de amonio utilizando un regulador de pH automático. Durante la circulación, un gas mixto compuesto por el 85% de nitrógeno, el 10% de hidrógeno y el 5% de dióxido de carbono (fabricado por Sumitomo Seika Chemicals Co. Ltd.) se insufló al interior del baño de medio para mantener una condición anaerobia. El gas mixto se insufló a 100 ml/min durante las primeras 12 horas, y a 20 ml/min desde la 12<sup>a</sup> hora a la 30<sup>a</sup> hora. Después de la circulación a 37°C durante 30 horas, el número de las bacterias era de hasta  $5 \times 10^{10}$ /g de la cápsula.

Este procedimiento de cultivo utilizando una columna rellena de cápsulas permite que *bifidus bacillus* se cultive a una densidad elevada en la cápsula sin cualquier daño físico, y reduce la posibilidad de contaminación. Además, las cápsulas no se rompen cuando son recogidas, y pueden transportarse con la columna a un lugar donde se mezclan con alimentos. Por lo tanto, la manipulación durante y después del cultivo es muy fácil, de modo que este procedimiento es adecuado industrialmente para el cultivo de *bifidus bacillus* en cápsulas.

## Ejemplo 6: encapsulación y cultivo de bacterias liofilizadas

*Bifidobacterium longum* JCM7050 se sometió a cultivo anaerobio en un medio de leche desnatada de la misma manera que en el ejemplo 1. Después del cultivo, las bacterias se recogieron mediante centrifugado a 4°C, a 8000 rpm durante 20 minutos. Se añadió agua destilada esterilizada al sedimento en una cantidad 10 veces más grande que la de las bacterias, seguido por agitación y dispersión y a continuación las bacterias se liofilizaron. Cuando las bacterias liofilizadas se sometieron a almacenamiento en frío en un recipiente hermético que se hizo anaerobio cargando AnaeroPack en su interior, las bacterias se almacenaron muy estables. A continuación, 0,1 g de las bacterias liofilizadas se recogieron y se suspendieron en un 1 l de un medio de leche desnatada y se utilizaron como líquido interno de la cápsula. El número de las bacterias en esta suspensión era  $5 \times 10^7$ /ml.

A continuación, cápsulas blandas sin costuras (tamaño de partícula promedio de 3,5 mm) que incorporaban este líquido interno se prepararon según la formulación mostrada en la tabla 2 mediante goteo en el aire.

Tabla 2

Capa	Componente	Proporción de constitución* (% en peso)
capa más interna	líquido con <i>bifidus bacillus</i>	30
capa interna	Aceite de vitamina E	30
capa más externa	Solución de alginato sódico al 4%	40
líquido de solidificación	Solución acuosa de cloruro cálcico al 3%	
* con respecto al peso total de la cápsula		

A continuación, 100 g de las cápsulas obtenidas se colocaron en 1 l de un medio de leche desnatada tratada con pancreatina, y se cultivaron a 37°C durante 2 días con agitación y ajustando el pH a 5,5 con una solución acuosa 5 M de NaOH. El número de bacterias vivas en la cápsula después del cultivo era  $2 \times 10^{10}$ /g de la cápsula (peso húmedo), lo que indica crecimiento de las bacterias en la cápsula.

Ejemplo 7: Bebida con bacterias del ácido láctico que incorpora cápsulas que contienen *bifidus bacillus* vivos

Bacterias del ácido láctico, *Lactococcus lactis* JCM7638, se cultivaron en un medio agar CMG (0,5% de extracto de levadura, 0,5% de polipeptona, 0,5% de NaCl, 1% de glucosa y 2% de agar) de modo que se obtuvieron colonias de las bacterias. Un asa de siembra de platino de las colonias se recogieron y se inocularon en 20 ml de un medio de leche desnatada líquido de pH 6,5 que contenía el 12% de leche desnatada, el 0,4% de extracto de levadura, el 3% de lactosa y se cultivaron estacionarias a 37°C durante 15 horas. El número de bacterias era  $6 \times 10^9$ /ml.

Todo el caldo de cultivo se centrifugó a 4°C, a 8.000 x g durante 20 minutos, y el sobrenadante se desechó. Al sedimento bacteriano, se le añadieron 40 ml de una solución fisiológica salina, se agitaron con un vórtice, seguida por un centrifugado a 8.000 x g durante 20 minutos, y las bacterias se recogieron. La misma operación de lavado se repitió una vez más y se obtuvieron bacterias lavadas. Al sedimento de las bacterias lavadas, se le añadió zumo de manzana transparente en una cantidad de 40 ml, seguido por dispersar las bacterias uniformemente con un vórtice. A continuación, se añadieron 0,5 ml del zumo de manzana en el que las bacterias se suspendieron uniformemente a

100 ml de zumo de manzana transparente. El número de las bacterias en el zumo de manzana era  $1 \times 10^7$  /ml. El aspecto del zumo de manzana era sustancialmente transparente.

5 Por separado, cápsulas que contienen bifidus bacillus se prepararon de la misma manera que en el ejemplo 1. Dos gramos de las cápsulas que contienen bifidus bacillus se añadieron a 100 ml de las bacterias del ácido láctico-suspendidas en zumo de manzana obtenidas anteriormente. El número de los bifidus bacillus vivos contenidos en la cápsula era 30 miles de millones/g por cápsula. El zumo de manzana que incorporaba las bacterias del ácido láctico vivas y las cápsulas que contienen las bacterias de bifidus vivas pueden cumplir la definición de bebida con bacterias del ácido láctico según el estándar de "ordenanza ministerial respecto a la leche". Sin embargo, las  
10 bebidas con bacterias del ácido láctico de la presente invención son totalmente diferentes de bebidas con bacterias del ácido láctico convencionales en que la bebida de la presente invención es sustancialmente transparente, pueden ingerirse 60 miles de millones de bifidus bacillus vivos por 100 ml, y puede beberse fácilmente.

#### 15 Aplicabilidad industrial

La cápsula de la presente invención está constituida de modo que células o tejidos vivos puedan crecer incluso en la cápsula y no pueda ser disuelta por el ácido gástrico. Por lo tanto, particularmente cuando se contienen bacterias del ácido láctico (incluyendo bifidus bacillus), una gran cantidad de bacterias vivas pueden suministrarse a los intestinos de modo que pueda mostrarse una mejoría rápida y potente de un trastorno intestinal. Además, la cápsula de semilla  
20 artificial que contiene un tejido de célula vegetal rediferenciable de la presente invención para la cual no se reivindica protección mediante la presente solicitud, tiene alta estabilidad en almacenamiento en un estado seco a temperatura ambiente y cuando es sembrada en tierra, la membrana de la cápsula se hincha y se descompone mediante actividades microbianas y, por lo tanto, germina rápidamente.

25 En otras palabras: la invención se refiere a una cápsula que contiene un líquido en el que se suspende una célula o tejido vivo, en la que la célula o el tejido puede crecer en el líquido.

En una realización preferente, la cápsula, según lo anterior, es una cápsula blanda sin costuras.

30 En otra realización preferente, en la cápsula, según lo anterior, la célula o el tejido es una célula o tejido de plantas utilizadas como alimento.

En otra realización preferente, en la cápsula, según lo anterior, la célula o tejido es, como mínimo, una célula o tejido seleccionado entre el grupo que comprende bacterias del ácido láctico (incluyendo bifidus bacillus), Bacillus natto, levadura de panadería, levadura de cervecera, hongos filamentosos para destilación, algas unicelulares, algas pluricelulares, plantas comestibles, tejidos vegetales comestibles y bacterias o liofilizadas o tejidos de las mismas.  
35

Además, la presente invención se refiere a un alimento que incorpora la cápsula, según lo anterior.

40 En una realización preferente, en el alimento, según lo anterior, el alimento que incorpora la cápsula es una bebida de zumo de frutas, zumo de verduras, bebida saludable, leche procesada, leche de soja, mermelada, yogur, bebida con bacterias del ácido láctico, leche fermentada, bebida carbonada, agua mineral saborizada o pudín.

45

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Cápsula sin costuras que comprende un líquido acuoso en el que está suspendida una célula o tejido vivos,  
en la que la cápsula está formada mediante un aparato de fabricación de cápsulas sin costuras con una tobera  
tubular triple,  
en la que el líquido acuoso que contiene la célula o tejido vivos se suministra en el tubo más interno de la tobera  
tubular triple,  
en la que un material lipófilo se suministra al tubo medio de la tobera tubular triple,  
10 en la que un material que forma la membrana externa se suministra al tubo más externo de la tobera tubular triple,  
en la que la célula o tejido puede crecer en el líquido acuoso,  
caracterizada porque el material lipófilo se selecciona entre el grupo que comprende aceites de fritura por inmersión,  
aceite para ensalada, vitamina E, aceite de germen de trigo, aceite de sésamo, aceite endurecido que tiene un punto  
de fusión de 35°C o menos, manteca de cacao, mantequilla, margarina, manteca, y éster de ácido graso de  
15 sacarosa,  
en la que el material que forma la membrana externa es, como mínimo, uno seleccionado entre el grupo que  
comprende gelatina, agar, pectina, ácido algínico, alginato, carragenano, curdlano, almidón, goma de gelano y  
glucomanano.
- 20 2. Cápsula, según la reivindicación 1, que es una cápsula blanda sin costuras.
3. Cápsula, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la célula o tejido es una célula o un tejido  
vegetal utilizado para alimento.
- 25 4. Cápsula, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la célula o el tejido es, como mínimo, uno  
seleccionado entre el grupo que comprende bacterias del ácido láctico (incluyendo bifidus bacillus), Bacillus natto,  
levadura de panadería, levadura de cervecería, hongos filamentosos para destilación, algas unicelulares, algas  
pluricelulares, plantas comestibles, tejidos vegetales comestibles y sus bacterias o tejidos liofilizados.
- 30 5. Alimentos que incorporan la cápsula, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Alimento, según la reivindicación 5, en la que el alimento que incorpora la cápsula es una bebida de zumo de  
frutas, zumo de verduras, bebida saludable, leche procesada, leche de soja, mermelada, yogur, bebida con bacterias  
del ácido láctico, leche fermentada, bebida carbonada, agua mineral saborizada o pudín

35

Figura 1

