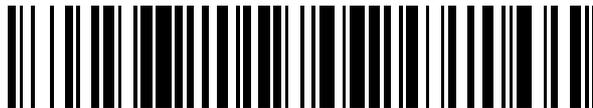


19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 557 813**

21 Número de solicitud: 201531479

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)**C12P 39/00** (2006.01)**C12R 1/225** (2006.01)**C12R 1/85** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**14.10.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**28.01.2016**

Fecha de la concesión:

**03.05.2016**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**10.05.2016**

73 Titular/es:

**LÓPEZ SEVILLA, Maria Asunción (20.0%)**  
**Paseo de la campsa nº 2, 3º 2ª**  
**08940 Cornellà de Llobregat (Barcelona) ES;**  
**LOPE RODRÍGUEZ, Sheila (20.0%);**  
**MIYAR RODRÍGUEZ, Karen (20.0%);**  
**ABILLEIRA CASTELLS, Carola (20.0%) y**  
**GODALL HERMS, Mónica (20.0%)**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ SEVILLA, Maria Asunción ;**  
**LOPE RODRÍGUEZ, Sheila;**  
**MIYAR RODRÍGUEZ, Karen ;**  
**ABILLEIRA CASTELLS, Carola y**  
**GODALL HERMS, Mónica**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**54 Título: **Composición iniciadora de la fermentación que comprende cepas de microorganismos libres e inmovilizados**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a una composición iniciadora de la fermentación para un sustrato que comprende al menos una cepa de microorganismos inmovilizados y al menos una cepa de microorganismos libres en un medio de suspensión. La presente invención también se refiere al procedimiento para la preparación y conservación de dicha composición iniciadora de la fermentación, al procedimiento para activar un sustrato así como al uso de dicha composición para la producción de bebidas y alimentos, la producción de metabolitos y para el tratamiento de lixiviados o residuos.

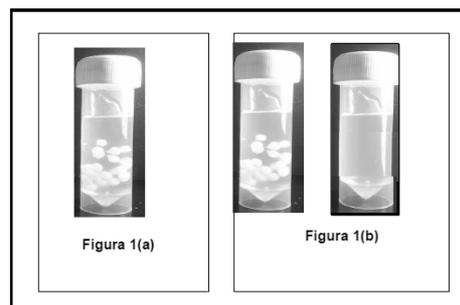


FIG. 1

ES 2 557 813 B2

## DESCRIPCIÓN

Composición iniciadora de la fermentación que comprende cepas de microorganismos libres e inmovilizados.

5

### CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra dentro del marco de la Microbiología Industrial, y proporciona una composición iniciadora estable de la fermentación de un substrato empleando simultáneamente cepas de microorganismos libres e inmovilizados.

10

También la presente invención describe un procedimiento para la preparación de la composición iniciadora de la fermentación y su uso para la obtención de productos seleccionados del grupo formado por: alimentos que comprenden probióticos, alimentos que comprenden prebióticos y/o metabolitos así como para el tratamiento de lixiviados y productos residuales industriales y urbanos.

15

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La Microbiología Industrial como rama de la microbiología orientada a la producción de productos de interés industrial a través procesos donde, en al menos algún paso, interviene un microorganismo, manifiesta un crecimiento vertiginoso desde su diversificación en el siglo XX.

20

Esta disciplina abarca un amplio campo de aplicaciones entre las que se encuentra la producción de: alimentos por vía fermentativa (vino, pan, cerveza, etc.); suplementos (como los cultivos de algas, vitaminas o aminoácidos); biopolímeros, el tratamiento de lixiviados y residuales; así como la producción de principios activos de interés en medicina, como la insulina y la hormona del crecimiento entre otros metabolitos.

25

Por otra parte, desde el punto de vista de la presente invención, es importante destacar que el empleo de microorganismos inmovilizados en procesos fermentativos ha generado en las últimas décadas un gran interés dentro de los bioprocesos, debido a las grandes ventajas técnicas y económicas en relación a las fermentaciones tradicionales. Entre las principales ventajas que presentan los sistemas biotecnológicos que utilizan células inmovilizadas se

30

35

encuentran las siguientes: que posibilitan el empleo de una mayor densidad celular comparado con los procesos tradicionales, que ofrecen un mejor control en sistemas continuos y que facilitan la posible recuperación de la biomasa para su posterior reutilización.

5

El “atrapamiento” o inmovilización de microorganismos en matrices sólidas puede realizarse por difusión de las células en matrices sólidas sintetizadas previamente o por encapsulamiento, que consiste en la formación de matrices alrededor de las células a modo de perlas o por inclusión en matrices a partir de polímeros que gelifican como el agar.

10

La inmovilización por encapsulamiento, consiste en la inmovilización de las células en esferas poliméricas que pueden ser de diferente naturaleza. Por ejemplo, Cachon y Divies, 2001 describen la inmovilización de células de levadura en perlas de alginato, poliacrilamida empleadas con éxito en la fermentación de vino blanco y en la producción de etanol. Otra ventaja importante en este caso, es que el soporte protege la levadura de la acción de inhibidores, metales pesados, fenoles y temperaturas extremas.

15

El estado de la técnica describe una amplia información bibliográfica en forma de publicaciones científicas donde se describen diferentes tipos de procedimientos de obtención de perlas o inmovilizados, tanto de principios activos como de microorganismos y su aplicación en la industria farmacéutica (Bang SH et al, 2014), nutracéutica (Kapoor M et al., 2007), industrial (Fernandez-Lafuente, 2014) y alimenticia (Contesini FJ et al., 2013).

20

En el marco de la propiedad industrial, la patente de invención española ES2306707, divulga un procedimiento de recubrimiento de microorganismos vivos deshidratados con una capa hidrófoba homogénea que comprende una sustancia elegida entre ácidos grasos, ceras o una mezcla de los mismos, caracterizado porque dicha sustancia hidrófoba se inyecta a una temperatura superior a su temperatura de fusión. Las sustancias mencionadas permiten aumentar la resistencia de dichos microorganismos a las tensiones fisicoquímicas tales como el calor, humedad, acidez o la compresión.

25

30

Otro ejemplo de aplicación a la industria de los alimentos es la patente de invención española ES2331442. Este documento se refiere a la fabricación de productos comestibles que contienen componentes inmovilizados o incrustados, tales como componentes nutracéuticos, farmacéuticos, componentes biológicamente activos y/o microorganismos

35

vivos. Los productos fabricados según esta invención pueden ser consumidos directamente como alimentos o se pueden utilizar como aditivos de alimentos, tales como en aplicaciones tópicas o en bebidas. En este caso no es necesario un procesamiento adicional severo para destruir térmica o mecánicamente el agente encapsulante.

5

La solicitud de patente internacional WO2009024376 se refiere a microperlas para la inmovilización de sólidos orgánicos o inorgánicos, compuestos lipófilos tales como aceites y/o grasas, lípidos, o microorganismos tales como levaduras y bacterias, para su uso en los alimentos, como aditivos alimentarios, o como suplementos dietéticos, basados en una matriz de encapsulación preferiblemente esférica utilizando alginato como la sustancia de base. Dicha perla comprende adyuvantes adicionales y estabilizantes en la matriz de alginato, tales como proteínas, almidones, sólidos inorgánicos y/o emulsionantes, a saber, lecitina, estabilizadores de oxidación que afectan el comportamiento de la perla en el tracto digestivo, por lo que los ingredientes inmovilizados están protegidos contra la oxidación, y el sabor y el olor de los ingredientes están enmascarados. Los ingredientes inmovilizados se liberan después de la ingestión de la perla sólo después de pasar a través del estómago hasta el duodeno, y están protegidos de los efectos anteriores digestivos del estómago.

10

15

La solicitud de patente internacional WO9948372 divulga un producto que contiene un componente encapsulado de tipo nutracéutico, farmacéutico o biológicamente activo, o microorganismos vivos, o una combinación de los mismos. En realizaciones preferidas de la invención, el producto contiene un microorganismo encapsulado. Los productos esta invención contienen uno o más encapsulantes en una matriz que rodea el producto y hace más grata su degustación y que sea mejor masticable.

20

25

Por otra parte, dentro de la producción de alimentos en las últimas décadas, el empuje científico técnico ha permitido la aparición de nuevas tendencias en el ámbito de la nutrición, basadas en nuevos estilos de vida y en la preocupación por elevar la calidad de vida de los individuos.

30

Como consecuencia de lo anterior, el concepto de “alimento sano”, salta a un nivel superior en comparación con los alimentos tradicionales, dando lugar a otro concepto más actual de “alimento funcional”, el cual además de aportar nutrientes, mejora el estado de salud y bienestar, y reduce el riesgo de padecer enfermedades.

35

Algunos ejemplos de este tipo de alimentos que pueden encontrarse en los mercados son las leches y yogures enriquecidos con ácidos grasos omega-3, ácido oleico, ácido fólico, calcio, fósforo y zinc, los cereales fortificados con fibra y minerales y el pan enriquecido con ácido fólico, entre otros.

5

Los alimentos funcionales pueden incluir componentes probióticos, prebióticos y simbióticos los cuales definen características esenciales de los mismos.

10

Un probiótico se refiere a microorganismos vivos que, una vez agregados como suplementos dietéticos, favorecen el desarrollo de la flora microbiana en el intestino ya que estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo a la vez que previenen infecciones entéricas y gastrointestinales.

15

Por ejemplo, en la actualidad está demostrado el uso ventajoso de bacterias vivas como fermentos lácticos en el tratamiento de los signos y síntomas que acompañan la intolerancia a la lactosa y de otros estados patológicos como diarreas, infecciones del sistema urinario, desórdenes inmunológicos, hipercolesterolemia, algunos tipos de cáncer y las alergias alimentarias.

20

Los prebióticos por otra parte son ingredientes no digeribles de la dieta, que producen efectos beneficiosos estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del huésped. Son fundamentalmente fructo y galacto oligosacáridos. Dentro de este grupo está comprendida la fibra dietética.

25

Un ejemplo de prebióticos son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que aportan la mayor parte de la energía que necesitan las células de la mucosa colónica, estimulan el crecimiento y la diferenciación de estas células e inhiben el crecimiento de células tumorales. Entre ellos, por ejemplo el butirato aporta mayor cantidad de energía y desempeña importantes funciones en la biología del colon.

30

La combinación de prebióticos con probióticos se ha definido como simbiótico, la cual beneficia al huésped mediante el aumento de la supervivencia e implantación de los microorganismos vivos de los suplementos dietéticos en el sistema gastrointestinal. Se ha descrito que existe un efecto sinérgico entre ambos, es decir, los prebióticos pueden

35

estimular el crecimiento de cepas específicas y por tanto contribuir a la instalación de una microflora bacteriana específica con efectos beneficiosos para la salud.

5 Un ejemplo de este sinergismo lo constituye la relación de la cantidad de fibra dietética en la dieta con la microflora intestinal: una dieta pobre en fibra puede producir cambios en la ecología de la microflora intestinal y una disminución en la población de *Lactobacillus* con aumento de *Bacteroides* capaces de desdoblar los ácidos biliares secundarios en compuestos carcinogénicos, como el deshidronorcoleno y el metilcolantreno.

10 Por eso es sumamente importante controlar el proceso de fermentación en el intestino para evitar la formación de compuestos indeseables y para favorecer la actividad simbiótica de los agentes probióticos y prebióticos de la dieta.

15 En relación al estado de la técnica, la presente invención propone una variante nueva, donde la composición iniciadora de la fermentación aparece en diferentes formatos en donde se combinan simultáneamente células, esporas de microorganismos y/o microorganismos tanto inmovilizados como libres a la vez, que a su vez pueden incluir prebióticos u otros compuestos que influyen de forma positiva en el curso de la fermentación o bien que pueden añadir un valor añadido al producto final.

20 Otro importante campo de aplicación de microorganismos inmovilizados es en los procesos biológicos aplicados a la biorremediación de sitios contaminados y para el tratamiento de residuales, debido principalmente a su bajo costo. En este caso, la aplicación de la inmovilización en estos microorganismos presenta ciertas ventajas, como son una mayor  
25 resistencia a concentraciones altas de compuestos tóxicos, incremento en la actividad catalítica y la formación de microambientes necesarios para la degradación de compuestos recalcitrantes.

Innumerables publicaciones científicas refieren el uso de microorganismos inmovilizados en el  
30 tratamiento de residuales. Por ejemplo (Chapatwala, et al., 1998), divulgan el uso de *Pseudomonas putida*, inmovilizada en alginato de calcio, carragenano y agar; en la biodegradación de cianidas, cianatos y tiocianatos de amonio y dióxido de carbono, producidas en la minería y extracción de metales. El mejor índice de biodegradación, fue reportado por las células de *P. putida* inmovilizadas en alginato de calcio, mineralizándose  
35 los compuestos hasta  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$ .

Otros numerosos estudios han sido realizados para la biodegradación de sustancias tóxicas por métodos de atrapamiento en geles. Por ejemplo el uso de geles de poliacrilamida, alginato y agar para la inmovilización de células de *Pseudomonas sp.* En la degradación de naftaleno (Karegoudar, et al., 1998), o la biodegradación de pireno y fenantreno, por medio de *Fusarium sp.* Inmovilizado en polivinil y alginato (Li, et al., 2005).

Tampoco se han localizado documentos dentro del estado de la técnica que describan el uso simultáneo de microorganismos inmovilizados y libres para el tratamiento de residuales.

Por tanto, en forma general, la novedad y elemento inventivo de la presente invención en relación al estado de la técnica, es que propone una composición iniciadora estable de la fermentación para un substrato que se presenta en diferentes formatos (matriz o en perlas biocompatibles) y en donde se combinan simultáneamente cepas de microorganismos en forma de células, esporas de microorganismos y/o microorganismos tanto inmovilizados como libres a la vez, que a su vez pueden incluir prebióticos u otros compuestos que influyen de forma positiva en el curso de la fermentación o bien que pueden añadir un valor añadido al producto final. La activación de la composición iniciadora de la fermentación se produce al liberar al medio las cepas de los microorganismos libres suspendidos que aportan nutrientes al entorno mientras el resto se mantienen inmovilizados en el substrato.

Una de las aplicaciones de la presente invención, sin que sea limitativo de la misma, es producir alimentos con unas cualidades organolépticas y nutritivas diferentes obtenidas por mezclas de microorganismos que evolucionan con una cinética de crecimiento diferente.

La presente invención tiene por objeto el desarrollo de una composición iniciadora estable para la fermentación de un substrato que permite amortiguar significativamente la competencia entre los microorganismos por el mismo substrato y protegerlos frente a compuestos inhibidores o tóxicos del metabolismo.

En la presente invención el término “estable” cuando se refiere a la composición iniciadora de la fermentación, tal como lo entendería un técnico especializado en la materia, significa que durante un tiempo determinado de hasta cinco días no se afecta la viabilidad de las poblaciones de microorganismos presentes si se conservan a una temperatura entre 3 y 10 °C.

En la presente invención se emplean los términos "microorganismo", "célula" o "espora" de manera indistinta y se refieren a las partículas o elementos vivos de diferente naturaleza microbiológica presentes en la composición iniciadora de la fermentación objeto de la presente invención.

En la presente invención el término "substrato" se refiere al medio físico objeto de la fermentación, que de forma no limitativa, es el soporte físico que se desea fermentar y que comprende todos los requerimientos nutricionales y físicos de la célula, microorganismo o espora que forman parte del proceso fermentativo.

La composición iniciadora de la fermentación descrita en la presente invención presenta la ventaja de que permite asociar microorganismos que son "incompatibles" en el desarrollo de productos de la fermentación en las condiciones en que se encuentran en la práctica actualmente. Y permite crear un ecosistema con evolución propio a partir de un formato iniciador combinado. Por esta razón, la invención es potencialmente útil, además del campo de la producción de alimentos, en la producción de metabolitos, y en el tratamientos de residuales industriales y urbanos.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra la imagen de tres recipientes en donde en la figura 1(a) se observa un recipiente que contiene células y/o esporas libres suspendidas en un medio acuoso de suspensión y células y/o esporas inmovilizadas dentro de una matriz o perla; y en la Figura 1(b) se observa la imagen de dos recipientes que contienen células y/o esporas libres suspendidas en un medio acuoso de suspensión y células y/o esporas inmovilizadas dentro de una matriz o perla, los cuales se mezclan opcionalmente antes de la fermentación.

Figura 2. Representa un gráfico que muestra la tasa de generación de CO<sub>2</sub> producido por la fermentación de masa panadera expresada en incremento de volumen a las 8 h de fermentación.

Figura 3. Representa dos imágenes en donde se aprecia el aspecto macroscópico de dos fermentos de masa panadera. En el fermento 1 con formato B (bacterias libres y levaduras inmovilizadas) se observa producción localizada de CO<sub>2</sub> en torno a las perlas. En el

fermento 2 con formato A (levaduras libres y bacterias inmovilizadas) se observa producción homogénea de CO<sub>2</sub>.

5 Figura 4. Muestra un gráfico que representa la evolución de los diferentes fermentos de pan mediante determinaciones de la viabilidad por recuento de unidades formadoras de colonias (ufc).

Figura 5. Muestra un gráfico que representa la evaluación sensorial.

10 Figura 6. Muestra un gráfico que representa la Influencia del tamaño de las perlas en las propiedades organolépticas del pan. Los valores representan las medias del total de valores representados en la figura 5.

#### BIBLIOGRAFÍA Y CITAS:

- 15
- Bang SH, Kim P, Oh SJ, Kim YH, Min J. Impact of Solvent pH on Direct Immobilization of Lysosome-Related Cell Organelle Extracts on TiO<sub>2</sub> for Melanin Treatment. *J Microbiol Biotechnol.*, 2014 Dec 12.
- Cachon, R. y Divies, C. 2001. Immobilised cell technology in winery and fruit wine production. *Engineering and Manufacturing for Biotechnology.* 413 - 421.
- 20 Contesini FJ1, de Alencar Figueira J, Kawaguti HY, de Barros Fernandes PC, de Oliveira Carvalho P, da Graça Nascimento M, Sato HH. Potential applications of carbohydrases immobilization in the food industry. *Int J Mol Sci.* 2013 Jan 11; 14(1):1335-69. doi: 10.3390/ijms14011335.
- 25 Chapatwala, K., Babu, G., Vijaya, O., Kumar, K., Wolfram, J. (1998). Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 20: 28-33.
- Fernandez - Lafuente. Editorial: special issue - enzyme immobilization. *Molecules.* 2014 Dec 30 10; 19(12):20671-4. doi: 10.3390/molecules191220671.
- Kapoor M1, Kuhad RC. Immobilization of xylanase from *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in production of xylo-oligosaccharides. *Appl Biochem Biotechnol.* 2007 Aug; 142(2):125-38.

Karegoudar, T., Manohar, S. (1998) Degradation of naphthalene by cells of *Pseudomonas* sp. Strain NGK 1 immobilized in alginate, agar and polyacrylamide. Applied Microbiology Biotechnology 49: 785-792

5 Li, P., Li, H., Stagnitti, F., Wang, X., Zhang, H., Gong, Z., Liu, W., Xiong, X., Li, L., Austin, C., Barry, D. (2005) Biodegradation of Pyrene and Phenanthrene in Soil Using Immobilized Fungi *Fusarium* sp. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 75: 443-450.

#### DESCRIPCION DETALLADA

10

La presente invención proporciona una composición iniciadora estable de la fermentación para un substrato que comprende cepas de microorganismos libres e inmovilizados de forma simultánea. La presente invención también se refiere al procedimiento para la preparación de la composición anteriormente mencionada y a sus diferentes usos tales como: la producción de alimentos, la obtención de metabolitos por vía fermentativa y en el

15 tratamiento de lixiviados y productos residuales.

15

La composición iniciadora de la fermentación de la presente invención comprende una mezcla en solución acuosa de al menos una cepa de microorganismos inmovilizados dentro

20 de una matriz o perla biocompatibles, al menos una cepa de microorganismos libres en el medio de suspensión fuera de la matriz o perlas biocompatibles y adicionalmente al menos un compuesto prebiótico.

20

Los microorganismos inmovilizados y libres se seleccionan del grupo formado por bacterias,

25 levaduras y mohos, que pueden combinarse de todas las formas posibles adaptándose a un proceso fermentativo en particular.

25

A modo de ejemplos, pero sin que los mismos sean limitativos de la invención, algunas formas de realización serían las siguientes:

30

- una o más cepas de levaduras inmovilizadas con bacterias libres.
- una o más cepas de bacterias inmovilizadas con levaduras libres.
- una o más cepas de levaduras inmovilizadas con esporas de mohos libres.

El procedimiento de preparación de la composición iniciadora de la fermentación de un sustrato de la presente invención comprende las siguientes etapas:

a.-) Cultivo de las cepas y preparación de un medio acuoso con células libres y/o esporas.

5

Cultivar las cepas de los microorganismos en medios de cultivo descritos por la Microbiología Clásica para bacterias, levaduras o mohos y en las condiciones óptimas de temperatura, pH y aireación descritas para cada cepa.

10

De forma preferida pero no limitativa de la presente invención para cultivar las bacterias se emplea medio de cultivo MRS y para cultivar los mohos y levaduras se emplea medio SB (Sabouraud).

15

Los medios de cultivos sólidos o líquidos, empleados para la propagación de las diferentes cepas de microorganismos, los mismos se incuban el tiempo necesario para obtener cultivos en fase exponencial o principio fase estacionaria según se requiera, de manera que las células a recuperar sean células jóvenes en plenitud metabólica.

20

Tanto los medios de cultivos como los medios acuosos para obtener las células y/o esporas libres, previo a su uso se han de esterilizar, a 120 °C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

25

De manera preferente, pero no limitativa de la invención, la propagación de los microorganismos comprende las siguientes etapas: incubar las cepas de bacterias a 37 °C durante al menos 18-24 h y las cepas de levaduras y mohos a 22-30 °C, entre 24-48 h las levaduras y 4-5 días los mohos respectivamente. Según los requerimientos de cada cepa, las mismas se cultivan en condiciones de atmósfera controlada, por ejemplo las cepas de *Lactobacillus*.

30

De manera preferente, pero no limitativa de la invención, los medios acuosos para obtener células y/o esporas libres, comprenden agua estéril o solución salina o solución Ringer ¼.

35

De manera preferente, pero no limitativa de la invención, la recuperación de la biomasa crecida en el medio de cultivo líquido comprende las siguientes etapas: centrifugar entre 3000-10000 rpm durante al menos 10 minutos, lavar la biomasa al menos 1 vez, preferentemente dos veces y más preferentemente tres veces en un medio acuoso,

centrifugar entre 3000-10000 rpm durante al menos 10 minutos, recuperar la biomasa en un medio acuoso, diluir la suspensión a una absorbancia a 620 nm de 0,9-1 que equivale a  $10^8$ - $10^9$  unidades formadoras de colonias (ufc)/ml en el caso de *Lactobacillus* y  $10^7$ - $10^8$  ufc/ml en el caso de las levaduras o esporas de mohos.

5

De manera preferente, pero no limitativa de la invención, la recuperación de la biomasa crecida en el medio de cultivo sólido comprende las siguientes etapas: recuperar la biomasa crecida en la superficie del medio de cultivo sólido con el auxilio de algún medio mecánico, como por ejemplo un asa de Kolle estéril, resuspender la biomasa en un medio acuoso, lavar la biomasa al menos 1 vez, preferentemente dos veces y más preferentemente tres veces en un medio acuoso, centrifugar entre 3000 - 10000 rpm durante al menos 10 minutos, recuperar la biomasa en un medio acuoso, diluir la suspensión a una absorbancia a 620 nm de 0,9-1 que equivale a  $10^8$  -  $10^9$  unidades formadoras de colonias (ufc)/ml en el caso de *Lactobacillus* y  $10^7$  -  $10^8$  ufc/ml en el caso de las levaduras o esporas de mohos.

10

15

b.-) Inmovilización de células y/o esporas en una matriz o perlas de naturaleza polimérica:

Preparar una solución con el polímero a gelificar.

20

De forma preferente, pero no limitativa de la presente invención, el polímero se añade en una concentración entre 0.5 % y 4 %. De manera ejemplar, pero no limitativa de la presente invención emplear alginato de sodio al 2 % o agar al 2 %. También pueden emplearse otros polímeros equivalentes como K-carragenina, poliacrilamida, celulosa y chitosán.

25

De forma preferente, pero no limitativa de la presente invención, añadir a la solución del polímero antes preparada, el medio acuoso con las células y/o esporas libres en una relación tal que la mezcla contenga entre  $10^6$  -  $10^9$  células o esporas/mL.

De forma preferente, pero no limitativa de la presente invención mezclar la solución de alginato de sodio o agar al 2 % con medio acuoso con las células y/o esporas libres, en una relación de 1:0,1 respectivamente, para obtener una mezcla final que contenga entre  $10^7$  -  $10^8$  bacterias y  $10^6$  -  $10^7$  levaduras o esporas/mL.

30

A continuación, de forma preferente, pero no limitativa de la presente invención dispersar las gotas que contienen alginato en un recipiente que contiene una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 1,1 %. Mantener durante 30 minutos a 37 °C. Lavar las perlas al menos 1 vez, preferentemente dos

veces y más preferentemente tres veces en un medio acuoso. El medio isotónico a modo de ejemplo pero sin limitar es Ringer ¼.

En el caso de emplear agar al 2 % para inmovilizar las células, de forma preferente, pero no limitativa de la presente invención realizar la mezcla con agar a 45°C y rápidamente (para evitar lesionar las células por calor) dispensar las gotas en un recipiente que contiene una fase oleosa y un medio acuoso, este último a modo de ejemplo pero sin limitar la invención es Ringer ¼. Lavar las perlas al menos 1 vez, preferentemente dos veces y más preferentemente tres veces en un medio acuoso. El medio acuoso a modo de ejemplo pero sin limitar es Ringer ¼.

c.-) Preparación de células y/o esporas libres en un medio de suspensión:

Las células y/o esporas libres preparan en un medio de suspensión que puede ser agua estéril o un medio viscoso, que comprende un agente de suspensión y/o emulsionante y/o estabilizante y/o espesante.

El agente de suspensión y/o emulsionante y/o estabilizante y/o espesante de forma preferente, pero no limitativa de la presente invención, comprende carragenina iota o xantana o goma guar.

De forma preferente, pero no limitativa de la presente invención, preparar una solución de carragenina iota 0,5 %. Añadir a la solución de iota 0,5 % el medio acuoso con células y/o esporas libres en una relación 1: 0,1 para obtener una mezcla final que contenga entre  $10^7$  –  $10^8$  bacterias y  $10^6$  –  $10^7$  levaduras o esporas / mL.

El hecho de suspender las células y/o esporas en una suspensión de iota 0,5 % impide que sedimenten y que permanezcan mejor distribuidas en el volumen total de la suspensión.

d.-) Preparación de los diferentes formatos de la composición

Las células y/o esporas inmovilizadas b) y las células y/o esporas libres en el medio de suspensión c), pueden almacenarse en frascos separados que se mezclan antes de ser añadidas al substrato para iniciar la fermentación, pero también pueden almacenarse mezcladas en el mismo frasco. En cualquier caso las mezclas se realizan en volúmenes equivalentes de solución de células y/o esporas inmovilizadas y células y/o esporas libres.

Para mejor comprensión de los ejemplos de realización, pero sin ser limitativo de la presente invención nos referiremos a los siguientes formatos de la composición iniciadora de la fermentación

A – Levaduras libres y bacterias inmovilizadas en perlas de alginato de sodio o agar.

B – Bacterias libres y levaduras inmovilizadas en perlas de alginato de sodio o agar.

C1 – Levaduras libres en medio de suspensión.

5 C2 – Bacterias libres en medio de suspensión.

e.-) Conservación de la composición iniciadora de la fermentación

Conservar los frascos en refrigeración.

10

De forma preferente, pero no limitativa de la presente invención, los frascos se conservan a una temperatura de 3 °C a 10 °C

15

Teniendo en cuenta la explicación detalla, es un objeto de la presente invención una composición iniciadora de la fermentación para un substrato que comprende al menos una cepa de microorganismos inmovilizados y al menos una cepa de microorganismos libres en un medio de suspensión. De forma preferida, los microorganismos están inmovilizados en una matriz o en perlas biocompatibles.

20

Es un aspecto importante de la presente invención que las cepas de microorganismos inmovilizados y libres comprenden bacterias, y/o levaduras y/o esporas de bacterias y/o mohos. De forma preferida, las cepas de microorganismos inmovilizados y libres comprenden bacterias del género *Lactobacillus*. De forma preferida, las cepas de microorganismos inmovilizados y libres comprenden levaduras del género *Saccharomyces*.

25

De forma preferida, las cepas de microorganismos inmovilizados y libres comprenden esporas de mohos del género *Rhizopus* y *Aspergillus*.

30

Es un aspecto importante que la composición objeto de la presente invención comprende al menos un compuesto prebiótico. De forma preferida, el compuesto prebiótico comprende inulina y/o oligo-frutosa.

35

Es un aspecto importante de la composición objeto de la presente invención el que el medio de suspensión comprende agua o un medio isotónico. De forma preferente, pero no limitativa de la presente invención, el medio isotónico es solución Ringer o solución salina.

Es un aspecto importante de la composición objeto de la presente invención el que el medio de suspensión comprende además al menos un agente seleccionado del grupo formado por agente de suspensión, agente emulsionante, agente estabilizante y agente espesante. De forma preferida, el agente es carragenina iota, carragenina xantana o goma guar.

5

Es un aspecto importante que la composición objeto de la presente invención comprende células y/o esporas de cepas de microorganismos libres en solución Ringer  $\frac{1}{4}$  con carragenina iota al 0,5 % en una relación células libres: carragenina iota de 1:0,1.

10

Es un aspecto importante de la composición objeto de la presente invención el que la matriz y las perlas biocompatibles comprenden un polímero. De forma preferida el polímero comprende alginato, agar, K-carragenina, poliacrilamida, quitosano o celulosa.

15

Es un aspecto importante que la composición objeto de la presente invención comprende cepas de levaduras libres con cepas de bacterias inmovilizadas en perlas de alginato de sodio o agar.

20

Es un aspecto importante que la composición objeto de la presente invención comprende cepas de bacterias libres con cepas de levaduras inmovilizadas en perlas de alginato de sodio o agar.

25

Es un objeto de la presente invención un procedimiento para la preparación y conservación de la composición iniciadora de la fermentación de las reivindicaciones anteriores que comprende las siguientes etapas:

30

- a.-) Cultivar cepas de bacterias, levaduras y mohos en un medio de cultivo,
- b.-) Aislar células y/o esporas del cultivo de las cepas de bacterias, levaduras y mohos,
- c.-) Suspender células y/o esporas en un medio acuoso,
- d.-) Centrifugar la suspensión entre 3000 y 10000 rpm durante al menos 10 minutos,
- e.-) Descartar el sobrenadante y lavar en el medio acuoso, obteniendo una suspensión lavada de células y/o esporas,
- f.-) Centrifugar la suspensión obtenida en la etapa (d) entre 3000 y 10000 rpm durante al menos 10 minutos,

g.-) Descartar el sobrenadante y resuspender el producto obtenido tras la etapa (e) en un medio acuoso, obteniendo otra suspensión lavada de células y/o esporas,

h.-) Tomar una porción de las células y/o esporas obtenidas en la etapa (f), a emplear como células libres, y mezclar con un agente de suspensión y/o emulsionante y/o estabilizante y/o espesante,

i.-) Tomar otra porción de las células y/o esporas obtenidas en la etapa (f), a emplear inmobilizadas, y mezclar con un polímero de inmobilización para una concentración final comprendida entre  $10^5$  y  $10^9$  células o esporas / ml de polímero,

j.-) Elaborar perlas o una matriz polimérica con la mezcla obtenida de la etapa (i) para inmobilizar las células,

k.-) Distribuir las perlas o la matriz polimérica de células y/o esporas inmobilizadas de la etapa (j) así como las células y/o esporas libres de la etapa (h) en frascos que contienen un medio de suspensión apto para su conservación, y

l.-) Conservar los frascos en refrigeración a  $3^{\circ}\text{C}$  y  $10^{\circ}\text{C}$ .

Es un objeto de la presente invención un procedimiento para activar la fermentación que comprende las etapas de tomar un sustrato, adicionar el contenido de los frascos refrigerados de la reivindicación 18 y agua para obtener una mezcla que se mantiene a temperatura controlada de  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo de 8 a 12 horas.

Es un objeto de la presente invención el uso de la composición iniciadora de la fermentación para la producción de bebidas y alimentos, la producción de metabolitos y para el tratamiento de lixiviados o residuos.

Es un objeto de la presente invención el uso de la composición iniciadora de la fermentación para la producción masa madre panadera.

#### EJEMPLOS DE REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

Los siguientes ejemplos de realización son ilustrativos pero no limitativos del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Preparación de una composición iniciadora que contiene células de *Lactobacillus plantarum* libres y células de *Saccharomyces cerevisiae* inmobilizadas (Formato B).

a.-) Cultivo de las cepas y preparación de una suspensión de células libres.

5 Cultivar las cepas en un medio de cultivo sólido en placas de Petri de MRS en el caso de las bacterias y en medio SB en el caso de las levaduras.

Incubar las placas con los cultivos en las siguientes condiciones:

*Lactobacillus*: 37 °C / 18-24 h en atmósfera de CO<sub>2</sub>

*Saccharomyces*: 30 °C / 24-48 h

10

Recuperar la biomasa crecida en la superficie de la placa auxiliándose con un asa de Kolle estéril, previamente añadir 4 ml de solución Ringer 1/4 en cada placa crecida para realizar suspensión de la misma.

Centrifugar el volumen total a 3000 rpm durante 10 minutos.

15 Descartar el sobrenadante y el pellet se lava 3 veces con solución Ringer 1/4.

Resuspender el pellet final en Ringer 1/4 hasta ajustar la concentración a una absorbancia de 0,9-1 a 620 nm.

b.-) Inmovilización de células en alginato de sodio:

20 Preparar una solución de alginato de sodio al 2 %

Añadir a la solución de alginato de sodio, la solución Ringer 1/4 de células libres en una relación 1:0,1.

Dispensar las gotas en un recipiente que contiene una solución de CaCl<sub>2</sub> al 1,1 % (0,1 M)

Mantener durante 30 minutos a 37 °C

25 Lavar tres veces con Ringer ¼

c.-) Preparación de células libres en suspensión:

Preparar una solución de iota 0,5 %.

30 Añadir a la solución de iota 0,5 % la solución Ringer 1/4 con células libres en una relación 1:0,1.

d.-) Preparación del Formato B

35 Mezclar 2 mL de la solución que contiene las células de *Saccharomyces* inmovilizadas en alginato (b), con 2 mL de las células de *Lactobacillus* suspendidas en iota 0,5 % (c). Se añaden perlas hasta que se incrementa en 2 mL el volumen del conjunto.

e.-) Conservación de la composición

Conservación del envase en refrigeración a una temperatura de entre 3 y 10 °C. Preferentemente pero sin limitar la invención la conservación es a 5 ± 2 °C con picos de temperatura para simular condiciones reales.

5

Ejemplo 2. Ensayos de estabilidad

En este ejemplo de realización de la invención, se demuestra la estabilidad probada con cepas: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* y Levadura comercial que es *Saccharomyces cerevisiae*. Se realizó un control de la viabilidad por recuento de las unidades formadoras de colonia (ufc/g) de bacterias lácticas y levaduras, así como control de pH durante 2 meses (Tabla 1)

10

15

Tabla 1. Ensayos de estabilidad de los cultivos.

Frasco	ufc / g	t = 0	t = 1 mes	t = 2 meses
A	Levaduras	100%	76%	70%
	Bacterias	100%	72%	65%
B	Levaduras	100%	70%	61%
	Bacterias	100%	64%	52%
C1	Levaduras	100%	65%	60%
C2	Bacterias	100%	56%	50%

Los formatos desarrollados en el presente ejemplo se corresponden con la leyenda siguiente:

20

- A – Levaduras libres y bacterias inmovilizadas.
- B – Levaduras inmovilizadas y bacterias libres.
- C1 – Levaduras libres en iota

C2 – Bacterias libres en iota

Las células inmobilizadas están atrapadas en perlas como resultado de la polimerización del alginato de sodio (AS) al 1,1 % y las células libres se encuentran suspendidas en una solución de carragenina iota (CL) al 0,5 %.

Ejemplo 3. Procedimiento de fabricación de fermentos para panificación (masa madre)

Se realizaron dos ensayos comparativos con diferente tamaño de las perlas de inmobilización de AS, para ello, en cada ensayo se preparan 5 fermentos diferentes, 4 formatos de acuerdo al ejemplo 1 y con un control.

Ingredientes del fermento según ensayo 1 donde el medio de inmobilización son perlas pequeñas de agar o alginato:

Ensayo 1	Formato A	Formato B	Formato A	Formato B	C1+C2
Medio de inmobilización	alginato	alginato	agar	agar	-
Agua (g)	20	20	20	20	20
Harina (g)*	20	20	20	20	20

\*Harina de trigo (fuerza: W> 300)

Ingredientes del fermento según ensayo 2 donde el medio de inmobilización son perlas grandes de agar o alginato:

Ensayo 1	Formato A	Formato B	Formato A	Formato B	C1+C2
Medio de inmobilización	alginato	alginato	agar	agar	-
Agua (g)	20	20	20	20	20
Harina (g)*	20	20	20	20	20

\*Harina de trigo (fuerza: W> 300)

Los fermentos se mantienen en condiciones controladas de temperatura ( $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) para su fermentación durante un tiempo de 8 a 12 horas. Se observan las características macroscópicas en la figura 4 y el comportamiento del pH de los fermentos en la figura 5:

5 Evaluación de la actividad de generación de  $\text{CO}_2$  y acidificación en la masa madre (MM)

10 Para evaluar y comparar la actividad de generación de  $\text{CO}_2$  en la primera fermentación, las muestras se prepararon mezclando 20 g harina, 20 g agua de acuerdo a los formatos A, B, C1 y C2 (en volúmenes equivalentes de microorganismos inmovilizados y libres) en un recipiente de 100 ml.

La tasa de generación de  $\text{CO}_2$  se calculó dividiendo el volumen incrementado por la masa por las 8 horas de fermentación (Figura 2)

15 Para evaluar la generación de ácidos se midió el pH de los fermentos.

El aspecto macroscópico del fermento empleando simultáneamente células libres es similar al obtenido con el fermento 2

20 El aspecto macroscópico del Fermento 1 muestra producción de gas localizada en torno a las perlas que contienen levaduras, mientras que la producción de gas del Fermento 2 es homogénea. (Figura 3)

25 La evolución de los diferentes fermentos de pan se presenta en las gráficas 1, 2 y 3 de la (figura 4).

Los fermentos pueden mantenerse en nevera 24 h sin alterar las características organolépticas del producto final

30 Ejemplo 4: Fabricación de panes con masa madre fermentada a partir de fermentos producidos según el ejemplo 2, empleando diferentes tamaños de perlas de inmovilización.

Se prepara una masa madre con los siguientes ingredientes (para pan de 250 g trigo):

-122 g harina trigo (+20 que añadirá en el proceso de amasado en manos, superficies etc)

35 -80 g agua

-2 g sal

5 En este ejemplo de realización se emplearon diferentes tamaños de perlas con una forma esférica, lo cual influye dependiendo del tamaño de las perlas en la velocidad de la fermentación, ya que en el caso de las perlas pequeñas al aumentar la superficie de contacto, se facilitan los procesos de transferencia de masa. El tamaño de las perlas, influye por consiguiente, en las propiedades organolépticas del producto final.

10 Por perlas pequeñas, se entenderá en la presente invención aquellas que tienen un diámetro igual o menor a 2 mm y por perlas grandes aquellas cuyo diámetro es superior a 2 mm.

15 Mezclar y dejar reposar 30 min a temperatura ambiente (entre 18 °C-25 °C). Preparar 5 mezclas para cada ensayo y a continuación se añade el fermento según la tabla del ejemplo 2. Ingredientes del fermento según ensayo 1 donde el medio de inmovilización está constituido de perlas pequeñas de agar o alginato:

Ensayo 1	Formato A	Formato B	Formato A	Formato B	C1+C2
Medio de inmovilización	alginato	alginato	agar	agar	-
Agua (g)	80	80	80	80	80
Harina (g)*	122	122	122	122	122

\*Harina de trigo (fuerza: W> 300)

20 Ingredientes del fermento según ensayo 2 donde el medio de inmovilización está constituido de perlas grandes de agar o alginato:

Ensayo 1	Formato A	Formato B	Formato A	Formato B	C1+C2
Medio de inmovilización	alginato	alginato	agar	agar	-
Agua (g)	80	80	80	80	80
Harina (g)*	122	122	122	122	122

\*Harina de trigo (fuerza: W> 300)

Evaluación del pH de diferentes panes con perlas pequeñas

Muestra	A	B	A	B	Control
pH	5,52	4,81	4,11	4,06	4,42

Ingredientes (para pan de 250 g trigo y espelta):

5

-42 g harina trigo (+20 que añadirá en el proceso de amasado en manos, superficies etc)

-60 g harina espelta

-80 g agua

10

-2 g sal

Se mezcla y se deja reposar 30 min a temperatura ambiente (entre 18°C-25°C). Se preparan 5 mezclas para el ensayo y a continuación se añade el fermento según tabla del ejemplo 2.

En este ensayo se emplearon perlas grandes:

15

Ensayo 3	Formato A	Formato B	C1+C2
Medio de inmovilización	alginato	alginato	-
Agua (g)	80	80	80
Harina espelta (g)	60	60	60
Harina de trigo (g)	42	42	42

\*Harina de trigo (fuerza: W> 300)

Evaluación pH diferentes panes:

Muestra	A perlas	B perlas	C1+C2
pH	4,66	3,69	4,40

20

Ingredientes (para pan de 250 g trigo y centeno integral):

- 76 g harina trigo (+20 que añadirá en el proceso de amasado en manos, superficies etc)
- 50 g harina centeno integral
- 77 g agua
- 3 g sal

5

Se mezcla y se deja reposar 30 min a temperatura ambiente (entre 18 - 25°C). Se preparan 5 mezclas para el ensayo y a continuación se añade el fermento según ensayo tabla etapa 5 y un control, donde el medio de inmovilización está constituido de perlas pequeñas de agar o alginato:

10

Ensayo 4	Formato A	Formato B	Formato A	Formato B	C1+C2
Medio de inmovilización	alginato	alginato	agar	agar	-
Agua (g)	77	77	77	77	77
Harina integral centeno (g)	50	50	50	50	50
Harina H (g)*	76	76	76	76	76

\*Harina de trigo (fuerza: W> 300)

Una vez añadido el contenido del formato se amasa durante 10 minutos y se deja reposar de 8 a 12 horas a temperatura ambiente. La masa fermentada puede mantenerse en nevera 8h manteniendo características organolépticas del producto final-

15

Evaluación pH diferentes panes, correspondientes a perlas pequeñas:

Muestra	A	A	B	B	C1+C2
pH	5,33	4,84	4,01	3,97	5,63

20

El horneado se llevó a cabo de la siguiendo los siguientes pasos

- Precalentar horno a 240°C.
- Introducir recipiente adecuado con agua para generar vapor.

- Introducir pan, hornear durante 5 minutos a 240°C, a continuación bajar temperatura a 150-170 °C hornear durante 55- 65 minutos.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente durante 1 hora.

5 Evaluación sensorial:

10 Los panes preparados se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se realizó una evaluación sensorial por una serie de probadores no entrenados (consumidores) y entrenados (curso análisis sensorial), grupos de 10 catadores. Se empleó un protocolo de basado en una escala de 1-9. Se pidió a los probadores que evaluaran (por separado) el aroma y el sabor de los panes, así como la calidad general basada en el volumen, textura, color y sabor.

15 Escala de evaluación sensorial:

ME GUSTA	extremadamente	9
	mucho	8
	moderadamente	7
	poco	6
Ni me gusta, ni me disgusta		5
ME DISGUSTA	poco	4
	moderadamente	3
	mucho	2
	Extremadamente	1

La evaluación sensorial de las diferentes variantes se muestra en la gráfica de la figura 5

**REIVINDICACIONES**

1. Composición iniciadora de la fermentación para un sustrato que comprende al menos una cepa de microorganismos inmovilizados y al menos una cepa de microorganismos libres en un medio de suspensión con la excepción de que los  
5 microorganismos sean mohos.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada que los microorganismos están inmovilizados en una matriz o en perlas biocompatibles.
- 10 3. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que las cepas de microorganismos inmovilizados y libres comprenden bacterias, y/o levaduras y/o esporas de bacterias.
- 15 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 caracterizada por que las cepas de microorganismos inmovilizados y libres comprenden bacterias del género *Lactobacillus*.
- 20 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 caracterizada por que las cepas de microorganismos inmovilizados y libres comprenden levaduras del género *Saccharomyces*.
6. Composición según la reivindicación 1 caracterizada por que comprende al menos un compuesto prebiótico.
- 25 7. Composición según la reivindicación 6 caracterizada por que el compuesto prebiótico comprende inulina y/o oligo-fructosa.
8. Composición según la reivindicación 1 caracterizada por que el medio de suspensión comprende agua o un medio isotónico.
- 30 9. Composición según la reivindicación 8 caracterizada por que el medio isotónico es solución Ringer o solución salina.
- 35 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1, 8 y 9 caracterizada por que el medio de suspensión comprende además al menos un agente

seleccionado del grupo formado por agente de suspensión, agente emulsionante, agente estabilizante y agente espesante.

- 5
11. Composición según la reivindicación 10 caracterizada que el agente es carragenina iota, carragenina xantana o goma guar.
- 10
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, y 9 a 11 caracterizada por que comprende células y/o esporas de cepas de microorganismos libres en solución Ringer  $\frac{1}{4}$  con carragenina iota al 0,5 % en una relación células libres: carragenina iota de 1:0,1.
13. Composición según la reivindicación 2 caracterizada por que la matriz y las perlas biocompatibles comprenden un polímero.
- 15
14. Composición según la reivindicación 13 caracterizada por que el polímero comprende alginato, agar, K-carragenina, poliacrilamida, quitosano o celulosa.
- 20
15. Composición según reivindicaciones anteriores caracterizada por que comprende cepas de levaduras libres con cepas de bacterias inmovilizadas en perlas de alginato de sodio o agar.
- 25
16. Composición según reivindicaciones anteriores caracterizada por que comprende cepas de bacterias libres con cepas de levaduras inmovilizadas en perlas de alginato de sodio o agar.
- 30
17. Procedimiento para la preparación y conservación de la composición iniciadora de la fermentación de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
- 35
- a.-) Cultivar cepas de bacterias y levaduras en un medio de cultivo,
  - b.-) Aislar células y/o esporas del cultivo de las cepas de bacterias y levaduras
  - c.-) Suspender células y/o esporas en un medio acuoso,
  - d.-) Centrifugar la suspensión entre 3000 y 10000 rpm durante al menos 10 minutos,
  - e.-) Descartar el sobrenadante y lavar en el medio acuoso, obteniendo una suspensión lavada de células y/o esporas,

f.-) Centrifugar la suspensión obtenida en la etapa (d) entre 3000 y 10000 rpm durante al menos 10 minutos,

g.-) Descartar el sobrenadante y resuspender el producto obtenido tras la etapa (e) en un medio acuoso, obteniendo otra suspensión lavada de células y/o esporas,

h.-) Tomar una porción de las células y/o esporas obtenidas en la etapa (f), a emplear como células libres, y mezclar con un agente de suspensión y/o emulsionante y/o estabilizante y/o espesante,

i.-) Tomar otra porción de las células y/o esporas obtenidas en la etapa (f), a emplear inmovilizadas, y mezclar con un polímero de inmovilización para una concentración final comprendida entre  $10^5$  y  $10^9$  células o esporas / ml de polímero,

j.-) Elaborar perlas o una matriz polimérica con la mezcla obtenida de la etapa (i) para inmovilizar las células,

k.-) Distribuir las perlas o la matriz polimérica de células y/o esporas inmovilizadas de la etapa (j) así como las células y/o esporas libres de la etapa (h) en frascos que contienen un medio de suspensión apto para su conservación, y

l.-) Conservar los frascos en refrigeración a  $3^{\circ}\text{C}$  y  $10^{\circ}\text{C}$ .

18. Procedimiento para activar la fermentación que comprende las etapas de tomar un sustrato, adicionar el contenido de los frascos refrigerados de la reivindicación 18 y agua para obtener una mezcla que se mantiene a temperatura controlada de  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo de 8 a 12 horas.

19. Uso de la composición iniciadora de la fermentación de reivindicaciones 1 a 17 para la obtención de productos de la fermentación particularmente bebidas y alimentos.

20. Uso de la composición iniciadora de la fermentación de reivindicaciones 1 a 17 para la producción masa madre panadera.

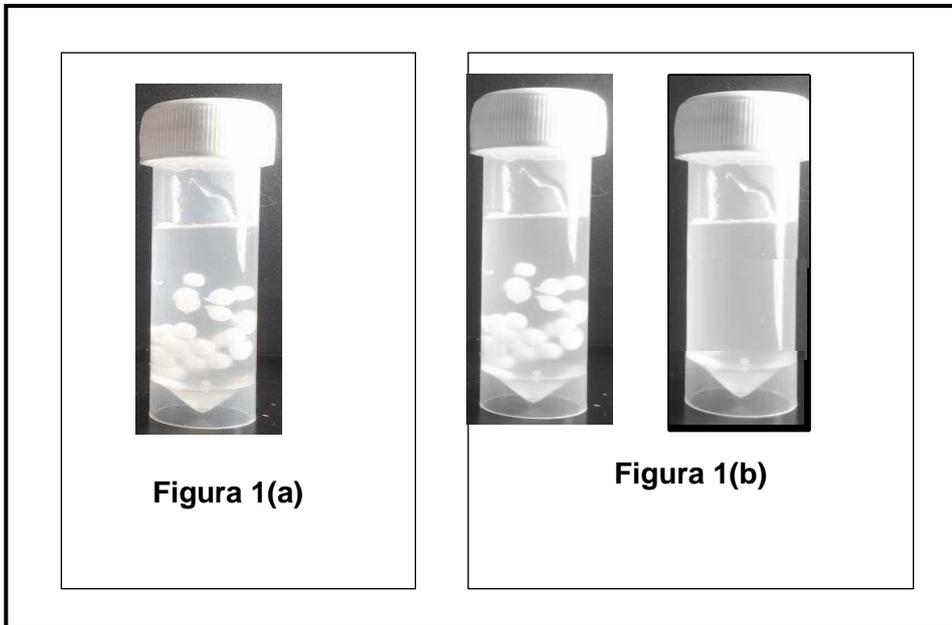


FIG. 1

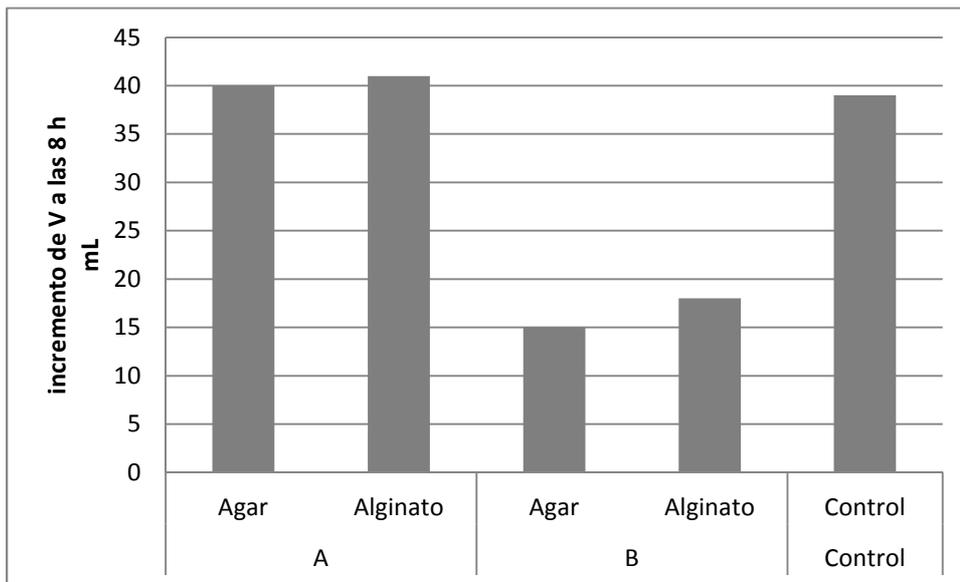


FIG. 2

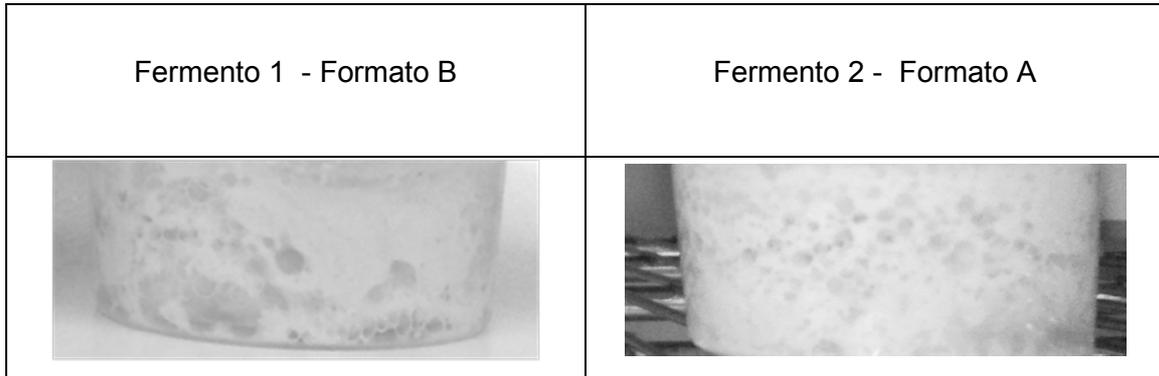


FIG. 3

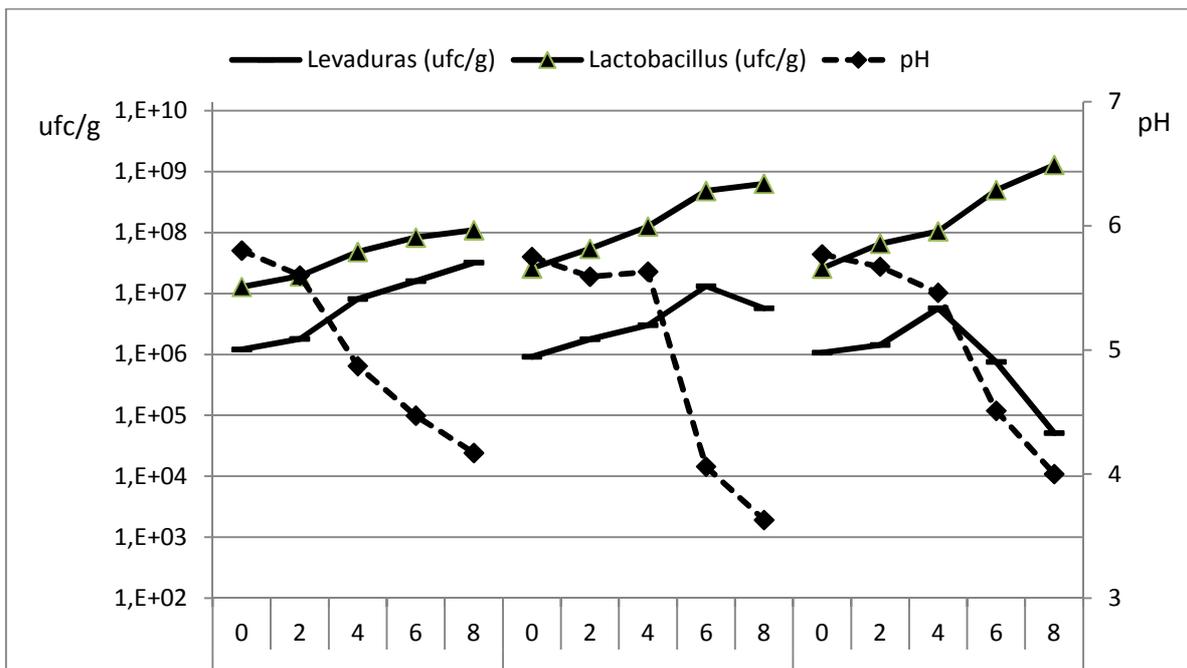


FIG. 4

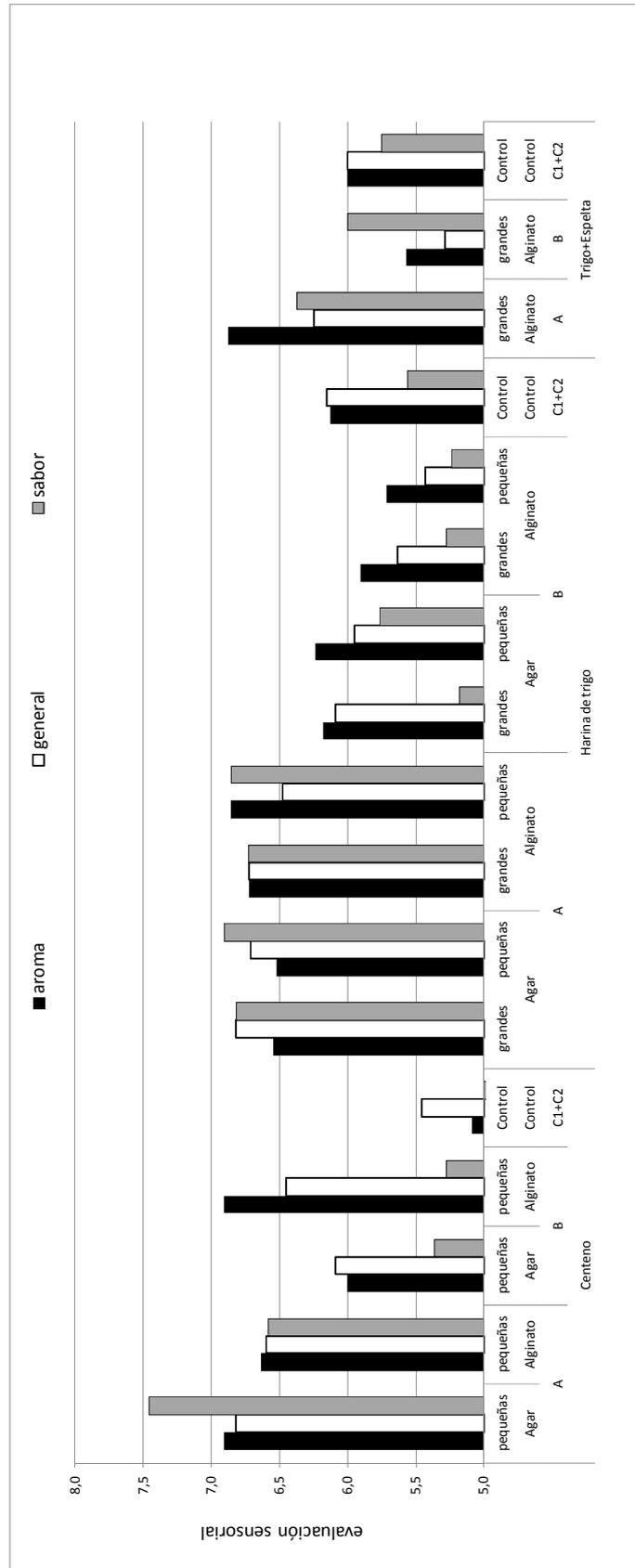


FIG. 5

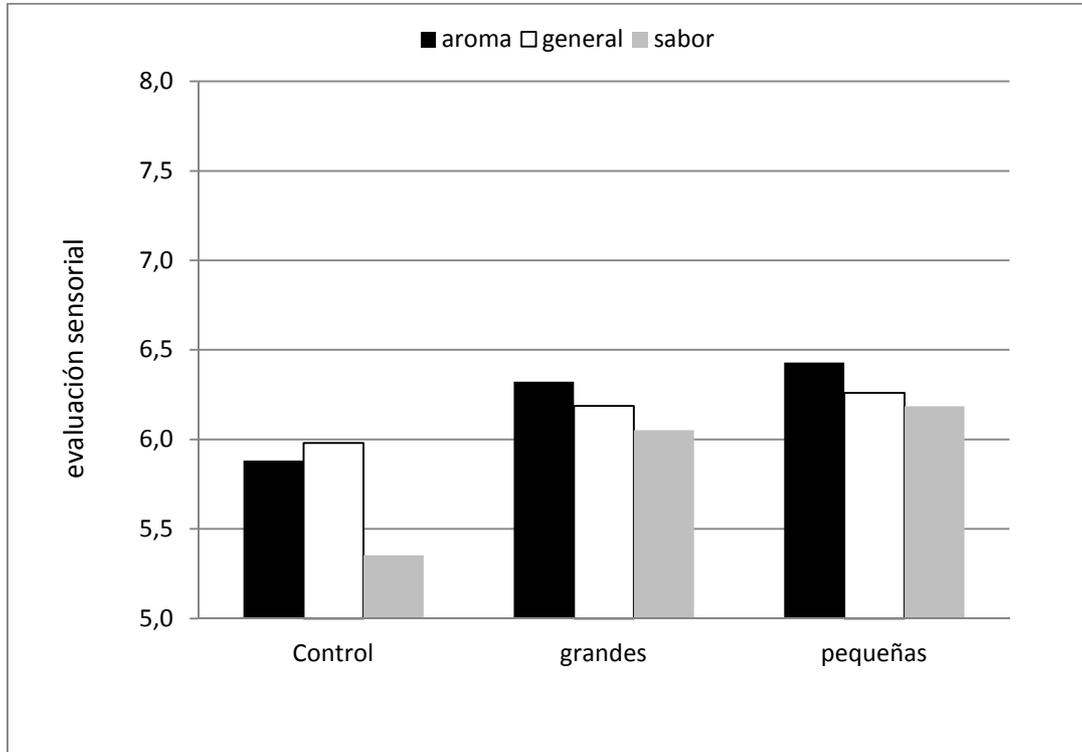


FIG. 6



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201531479

②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.10.2015

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 5316776 A (ANNUK DAVID et al.) 31.05.1994, todo el documento.	1-20
A	US 2004023360 A1 (LACROIX CHRISTOPHE et al.) 05.02.2004, todo el documento.	1-20
A	LACROIX et al. "Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality." CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, 20070417 LONDON, GB 17.04.2007 VOL: 18 No: 2 Págs: 176-183 ISSN 0958-1669 Doi: doi:10.1016/j.copbio.2007.02.002 Betenbaugh Michael J; Bentley William E; todo el documento.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
15.01.2016

Examinador  
M. Á. García Coca

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N1/20** (2006.01)  
**C12P39/00** (2006.01)  
C12R1/225 (2006.01)  
C12R1/85 (2006.01)  
A23L 1/105 ()

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12P, C12R, A23L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, ,XPESP, MEDLINE/NLM, EMBASE/ELSEVIER y Bases de datos de texto completo TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.01.2016

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-20	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-20	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 5316776 A (ANNUK DAVID et al.)	31.05.1994
D02	US 2004023360 A1 (LACROIX CHRISTOPHE et al.)	05.02.2004
D03	LACROIX et al. "Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality." CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, 20070417 LONDON, GB 17/04/2007 VOL: 18 No: 2 Págs: 176-183 ISSN 0958-1669 Doi: doi:10.1016/j.copbio.2007.02.002 Betenbaugh Michael J; Bentley William E.	17.04.2007

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-20, es una composición iniciadora de la fermentación, que comprende al menos una cepa de un microorganismo inmovilizado y al menos una cepa de microorganismos libres en un medio de suspensión, no siendo ninguno de ellos mohos (reiv. 1-16). Es también objeto de la invención un procedimiento para la obtención y conservación de dicha composición (reiv. 17), un procedimiento para la activación de la fermentación (reiv. 18) y el uso de dicha composición (reiv. 19 y 20).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga un método de fermentación para la obtención de productos de panadería, que consiste en añadir a una mezcla de harina y agua en un fermentador, una concentración determinada de una bacteria ácido-láctica (*Lactobacillus plantarum*) en presencia de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) inmovilizada en una matriz para evitar la pérdida de levadura en el proceso. A medida que se va formando la masa, se van retirando pequeñas porciones y se van sustituyendo por una nueva mezcla de agua y harina, pero sin añadir más bacterias. Las porciones retiradas de masa se transfieren a un segundo fermentador donde se incuban con enzimas proteolíticas antes de una segunda fermentación con la levadura para obtener la masa madre.

El documento D02 divulga métodos de fermentación en dos fases para la modulación de determinadas características de las células probióticas para la obtención de probióticos. El método consiste en inmovilizar las células probióticas en una matriz, y cultivarlas en un primer reactor con un medio de cultivo apropiado en condiciones óptimas para la modulación de la característica de interés. Este primer reactor opera en serie con un segundo reactor que contiene células libres en suspensión liberadas del primer reactor. Los medios de cultivo incluyen extractos de levadura (ver ejemplo 2).

El documento D03 divulga distintas tecnologías utilizadas en fermentación para la obtención de producto probióticos.

Aunque en el estado de la técnica se encuentra divulgada la combinación de microorganismos inmovilizados y microorganismos libres en suspensión para llevar a cabo distintos tipos de fermentación, éstos no forman parte de una única composición. Además, en el estado de la técnica se suelen utilizar microorganismos aislados o microorganismos libres para la realización de los distintos tipos de fermentaciones, no la mezcla de ambos.

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados del estado de la técnica, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-20. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-20. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-20 es con referencia a los documentos D01-D03 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).