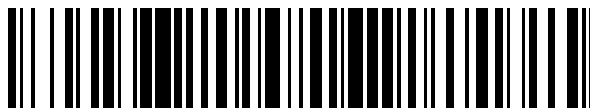


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 178**

21 Número de solicitud: 201500220

51 Int. Cl.:

C12C 11/11 (2006.01)

C12C 12/04 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

17.03.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.09.2016

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE MURCIA (100.0%)
Oficina de Transferencia de Resultados de
investigación (OTRI). Vicerrectorado de
Investigación e Internacionalización. Campus
Universitario de Espinardo. Edificio Rector Soler,
1ª planta
30100 Murcia ES**

72 Inventor/es:

**MARÍN INIESTA, Fulgencio;
SÁNCHEZ RUBIO, Marta;
CAVA RODA, Rita María y
TABOADA RODRÍGUEZ, Amaury**

54 Título: **Cerveza obtenida mediante fermentación con Saccharomyces boulardii**

57 Resumen:

Cerveza obtenida mediante fermentación con Saccharomyces boulardii.

La invención se define como una bebida con aporte importante de microorganismos probióticos a la microflora intestinal. Esta bebida es el resultado de la fermentación alcohólica, mediante la utilización de la especie de levadura probiótica Saccharomyces boulardii, de un mosto procedente de malta de cebada, sola o mezclado con otros productos amiláceos (trigo, arroz, maíz, etc.) transformables en azúcares por digestión enzimática, adicionado con lúpulo y/o sus derivados y sometido a un proceso de cocción. La fermentación con S. boulardii antes y después del embotellado permite obtener una cerveza con dicho microorganismo probiótico en suspensión a una concentración mayor de 10⁵ ufc/ml (células viables) mediante la refermentación de la cerveza en su propio envase lo que a su vez aporta el CO₂ encargado de la carbonatación y la formación de la espuma en este tipo de bebidas.

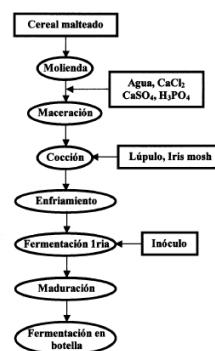


Figura 1

ES 2 583 178 A1

DESCRIPCIÓN**Cerveza obtenida mediante fermentación con *Saccharomyces boulardii*.****5 Objeto de la invención**

La presente invención hace referencia a una nueva cerveza obtenida a partir de la fermentación de la levadura *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) que permite producir una cerveza con importante aporte de microorganismos probióticos a la microflora intestinal de los consumidores, como resultado de la fermentación alcohólica de un mosto procedente de malta de cebada, sola o mezclada con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, adicionado con lúpulo y/o sus derivados y sometido a un proceso de cocción. La fermentación con *S. boulardii* antes y después del embotellado permite obtener una cerveza con dicho microorganismo probiótico en suspensión mediante la refermentación de la cerveza en su propio envase lo que a su vez aporta el CO₂ encargado de la carbonatación y la formación de la espuma.

Sector de la técnica

20 La presente invención se encuadra dentro en el campo de las bebidas especiales fermentadas mediante el empleo de microorganismos, en concreto mediante la utilización de levaduras de cerveza.

Estado de la técnica

25 Las levaduras del género *Saccharomyces* son ampliamente utilizadas en la industria agroalimentaria, especialmente en aquellas industrias que elaboran productos fermentados. La fabricación de estos productos conlleva la utilización de cepas y especies que son empleadas de manera distintiva en cada caso. *S. cerevisiae* es la especie característica utilizada en la elaboración del pan. Las especies de *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis* o *S. uvarum* son utilizadas en la fabricación de cervezas. *S. uvarum* también se emplea en la producción de sidra. Por su parte *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. beticus* y *S. bayanus* son utilizadas en la fermentación del vino y *S. rouxii* se usa en la fabricación de salsa de soja y miso.

35

S. boulardii es una levadura que fue aislada de frutos del lichi procedentes de Indochina aproximadamente en 1920. Desde 1962, *S. boulardii* se viene utilizando en Europa y otros países como un producto o medicamento probiótico, con probado efecto antidiarreico en seres humanos. Hoy día, este microorganismo es el principio activo del medicamento Ultra-
5 Levura, nombre comercial de Laboratorios Biocodex que lo produce en cápsulas con elevadas concentraciones de este microorganismo liofilizado en su interior.

Muchos artículos científicos y patentes muestran que *S. boulardii* es un medicamento efectivo contra muchas enfermedades, como así se pone de manifiesto en la patente
10 US4595590 que se refiere a sus efectos sobre la colitis pseudomembranosa, y US4643897 que se refiere a sus efectos sobre la amebiasis. En los artículos científicos McFarland, L.V. 2010. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology* 16(18): 2202-2222 y Czerucka, D. Piche, T. Rampal, P. 2007. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary*
15 *Pharmacology and Therapeutics*, se pone de manifiesto que *S. boulardii* puede ser recomendada para la prevención de la diarrea asociada a la toma de antibióticos, a la conocida como diarrea del viajero, a la diarrea entérica asociada a la nutrición, además reduce los síntomas relacionados con el tratamiento de *Helicobacter pylori*, previene recurrencias de la enfermedad de *Clostridium difficile*, se ha observado su eficacia en el
20 tratamiento del síndrome del intestino irritable, de la diarrea adulta aguda y se han observado algunas evidencias en cuanto a la prevención de la enfermedad de Crohn, la giardiasis y la diarrea relacionada con el virus de la inmunodeficiencia humana.

Diferentes patentes mencionan la utilización de *S. boulardii* para producir productos
25 alimenticios fermentados. En este sentido la patente US5639496 se refiere a la producción de alimentos fermentados que pueden ser consumidos directamente o como ingredientes de otros platos, mediante la fermentación de material vegetal crudo el cual contiene hidratos de carbono y proteínas. Por otro lado encontramos la patente ES2349951, referida a la
30 utilización de *S. boulardii* y otras bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* para producir una bebida probiótica a partir de zumo de granada o de bebidas de zumo de granada.

Descripción de la invención

35 Esta invención se refiere a una cerveza fermentada a partir de cepas de *S. boulardii*, microorganismo probiótico con probadas propiedades beneficiosas para la salud del

consumidor. Para la obtención de la cerveza objeto de la invención se llevan a cabo procedimientos ya conocidos los cuales no son objeto de protección en esta patente aunque son ampliamente expuestos en el apartado de un ejemplo de realización preferente de la invención.

5

La principal característica de esta invención es la producción de una cerveza fermentada con *S. boulardii* de tal forma que permite el aporte de dicho microorganismo en concentraciones muy elevadas en el momento de su consumo. Además permite obtener una cerveza cuyo contenido alcohólico es inferior a las cervezas fermentadas con la levadura *S. cerevisiae*.

10

Respecto a otras cervezas existentes en el mercado la protegida mediante la presente invención ofrece probadas propiedades beneficiosas para la salud de los consumidores ya que su aporte de microorganismos probióticos (*S. boulardii*) en suspensión es una característica del producto objeto de la presente invención que lo diferencia de otros tipos de cerveza.

15

Los productos comerciales que más se acercan, en cuanto a proceso de elaboración, a la cerveza objeto de la presente invención, son aquellas cervezas cuya fabricación incluye un proceso de refermentación dentro del propio envase.

20

Descripción de los dibujos o figuras

Figura 1. Diagrama de flujo que describe las distintas etapas y procesos que tienen lugar durante la fabricación de cerveza tipo "ale".

25

Figura 2. Logaritmo decimal de la concentración de unidades formadoras de colonias durante 7 días para cada una de las cepas (fermentación primaria), *S. boulardii* T1 (□) y *S. cerevisiae* Safbrew T58 (○).

Figura 3. Evolución del pH durante 7 días para cada una de las cepas (fermentación primaria), *S. boulardii* T1 (□) y *S. cerevisiae* Safbrew T58 (○).

30

Figura 4. Evolución del contenido en azúcares (°Brix) durante 7 días (fermentación primaria), *S. boulardii* T1 (□) y *S. cerevisiae* Safbrew T58 (○).

Figura 5. Viabilidad o supervivencia de *S. boulardii* T1 (□) y *S. cerevisiae* T58 (○) durante la fermentación terciaria (refermentación en botella o carbonatación).

Figura 6. Evolución del pH durante la fermentación terciaria (refermentación en botella o carbonatación) con *S. boulardii* T1 (□) y *S. cerevisiae* T58 (○).

Figura 7. Evolución del contenido en azúcares (°Brix) durante la fermentación terciaria (refermentación en botella o carbonatación) con *S. boulardii* T1 (□) y *S. cerevisiae* T58 (○).

5

Ejemplo de realización preferente de la invención

Un ejemplo no limitante de realización de la presente invención se llevó a cabo siguiendo el diagrama que representa la figura 1. Los materiales utilizados para la preparación de 23
10 litros de mosto fermentable (20 litros de cerveza aproximadamente) fueron:

- 1920 g. de malta clara de trigo. se trata de otra malta base para todas las cervezas de trigo. Da un mayor aroma a hierba a la cerveza y ayuda a la retención de espuma. Puede ser usada hasta en un 80%.
- 15 - 1.920 gramos de Malta Pale de cebada. Se trata de una malta base para elaborar cervezas tipo "Pale Ale".
- 160 gramos de malta CaraHell. Esta malta da un aroma más pleno, un sabor más suave y un color más profundo..
- 1,38 gramos de cloruro cálcico (CaCl₂)..
- 20 - 0,62 gramos de sulfato cálcico (CaSO₄)..
- Ácido fosfórico (H₃PO₄) hasta ajustar pH 5,2-5,25..
- 32 gramos de lúpulo "Cascade".
- 3 gramos del alga *Irish mosh*.

25 A partir del cereal malteado se realiza la molienda del mismo. El cereal molido se mezcla con agua y se añaden las sales de calcio y el ácido fosfórico. El mosto resultante de esta mezcla se somete a un proceso de maceración determinado por etapas donde la temperatura aumenta a una velocidad determinada, y otros tramos donde la temperatura se mantiene constante durante un cierto tiempo.

30

La velocidad de calentamiento del mosto es de 0,5 °C/min y las mesetas y tiempos de duración son las siguientes:

- Activación de la enzima β -glucanasa y degradación de β -glucanos, $43\pm 0,5$ °C, 10 minutos.
 - Activación de la enzima β -amilasa y degradación del almidón, 65-68 °C, 60 minutos.
 - Activación de la enzima α -amilasa y degradación del almidón, 70 °C, 30 minutos.
- 5 • Inactivación enzimática, que se lleva a cabo mediante incremento de temperatura hasta 78 °C.

Al finalizar el proceso de maceración se separa el mosto (con una elevada concentración de maltosa) del cereal mediante un proceso de aspersion del grano o *sparging*. El cereal se
10 lava con agua a una temperatura de entre 75-80 °C para recuperar el resto de azúcares que han quedado adheridos al grano, utilizando toda la masa de cereal macerado como filtro para obtener un mosto límpido. El mosto se somete a un proceso de cocción durante 90 minutos a 100 °C. Al inicio de dicho proceso se incorpora el lúpulo, en las siguientes cantidades y tiempos: 14 gramos cuando comienza la ebullición del mosto, 10 gramos a los
15 60 min de ebullición y 8 gramos 10 minutos antes de terminar el proceso de cocción. El *irish moss* se adiciona 10 minutos antes de terminar el proceso de cocción. Después de terminado éste proceso se procede al enfriamiento del mosto, dejándolo reposar unos minutos para favorecer la precipitación y sedimentación de sólidos en suspensión y a continuación se realiza el trasvase del mosto a la cuba de fermentación mediante sistemas
20 de intercambiadores de calor que permitan que el mosto llegue a la cuba de fermentación a una temperatura de 20 °C aproximadamente.

En la cuba de fermentación se procede a la inoculación de *S. boulardii*, el cual se añade directamente en forma de cultivo de iniciación puro preparado previamente en un mosto
25 muy parecido al descrito en este ejemplo de realización, como medio de cultivo para el crecimiento del inóculo. En éste ejemplo se preparó 8 horas antes de su inoculación.

Después del enfriamiento del mosto se añade el inóculo o cultivo de iniciación (*starter*) y comienza el proceso de fermentación que Incluye una fermentación primaria, una
30 fermentación secundaria o maduración y una fermentación terciaria o refermentación en su propio envase.

En primer lugar se lleva a cabo la fermentación primaria a 18 °C y durante un tiempo de 7 días, hasta que la concentración de los azúcares se mantiene constante. El mosto se
35 trasvasa posteriormente a un fermentador secundario o de maduración para conseguir una

decantación óptima. Durante la fermentación secundaria la cerveza se almacena a 15 °C durante 7 días.

5 Posteriormente el producto es envasado en botellas de cristal de 330 ml. previamente esterilizadas, cerradas herméticamente con chapas metálicas, a las cuales se le añade el mosto fermentado con levaduras viables en suspensión y mosto sin fermentar de tal forma que aumenta 0,5 ° Brix la concentración de azúcares del líquido en el interior; esto permite la deseada refermentación en el envase.

10 Durante los procesos de fermentación primaria, maduración o fermentación secundaria y re-fermentación en el propio envase, se llevan a cabo determinaciones analíticas para el seguimiento del proceso de producción de la cerveza probiótica y comprobar la concentración de células viables de *S. boulardii* durante todo el proceso. Para tener un criterio de comparación las figuras 2, 3, 4, 5, 6 y 7 reflejan las determinaciones para dos
15 tipos de cervezas fermentadas en el mismo mosto pero con cepas diferentes de levaduras, una con *S. boulardii* y la otra con *S. cerevisiae* Safbrew T58 (Brewferm, Bélgica). Estas determinaciones se realizaron cada 24 horas. Los parámetros analizados y los métodos empleados fueron los siguientes:

20 ▪ Determinación del pH, conforme a ISO, 1999. ISO 1842 Fruit and vegetable products -- Determination of pH. The International Organization for Standardization.

25 ▪ Determinación de la concentración de azúcares, conforme a ISO, 2003. ISO 2173 Fruit and vegetable products. Determination of soluble solids. Refractometric method. The International Organization for Standardization.

30 ▪ Determinación de la densidad del mosto, conforme a ISO, 1981. ISO 649-2 Laboratory glassware. Density hydrometers for general purposes. Part 2: Test methods and use. The International Organization for Standardization.

35 ▪ Recuento en placa de *S. boulardii*, conforme al procedimiento descrito por Tournas, V. M. (2001). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 18. BAM: Yeasts, Molds and Mycotoxins. Department of Health & Human Services.

35 Con el objetivo de comprobar el aporte de microorganismo probióticos (*S. boulardii*) a los consumidores de este producto se comprobó también mediante el empleo de la metodología

reportada por Tournas et al. (2001) la viabilidad del microorganismo (*S. boulardii*) a la temperatura de consumo (5° C). Este análisis ofreció como resultado que la concentración de *S. boulardii* en la cerveza a la temperatura y en el momento óptimo de su consumo fue de 10^5 ufc/ml de cerveza.

5

En la siguiente tabla se observa la evolución comparativa de distintos parámetros durante el proceso de maduración de ambas tipo de cerveza, es decir, la que utiliza la levadura *S. boulardii* y la que contiene *S. cerevisiae* Safbrew T58.

		Inicio	Final
pH	<i>S. boulardii</i> T1	4,31 ± 0,09	4,19 ± 0,03
	<i>S. cerevisiae</i> T58	4,00 ± 0,1	4,38 ± 0,01
°Brix	<i>S. boulardii</i> T1	7,83 ± 0,12	7,45 ± 0,07
	<i>S. cerevisiae</i> T58	6,43 ± 0,06	6,45 ± 0,21
Log ufc/ml	<i>S. boulardii</i> T1	5,15 ± 0,09	5,87 ± 0,35
	<i>S. cerevisiae</i> T58	3,59 ± 0,06	3,99 ± 0,41

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de una cerveza que comprende el empleo de la levadura *Saccharomyces boulardii* como microorganismo responsable de fermentación.
- 5 2. Cerveza producida de acuerdo con la reivindicación 1.
- 3.- Cerveza según reivindicaciones anteriores caracterizada porque es sometida a refermentación en el envase que la contiene.
- 10 4.- Cerveza según reivindicaciones anteriores caracterizada porque presenta una concentración en suspensión del microorganismo *Saccharomyces boulardii* mayor de 10^5 ufc/ml.

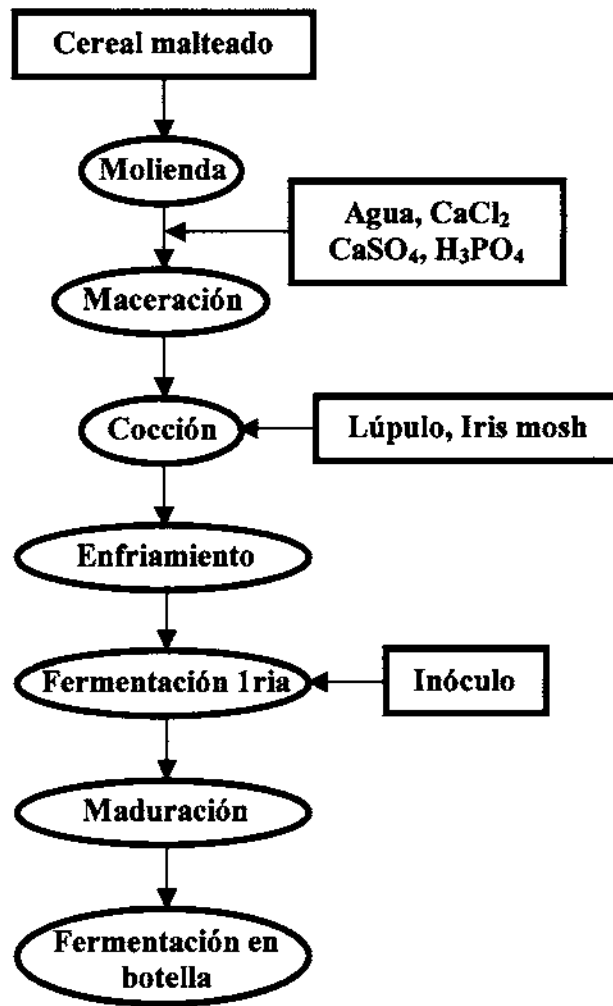


Figura 1

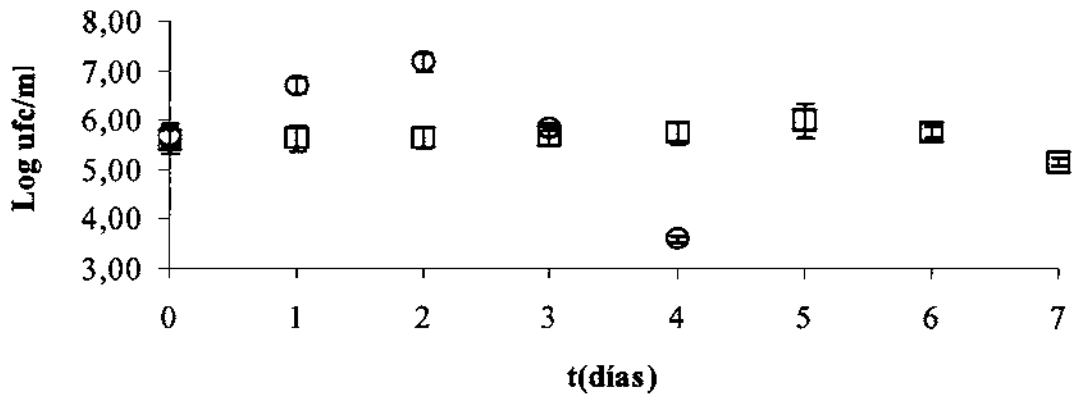


Figura 2

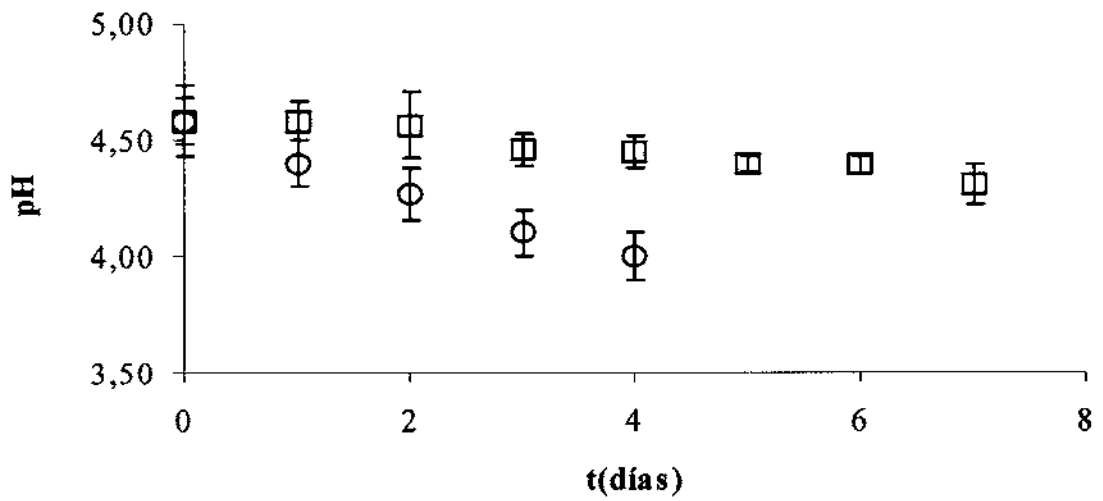


Figura 3

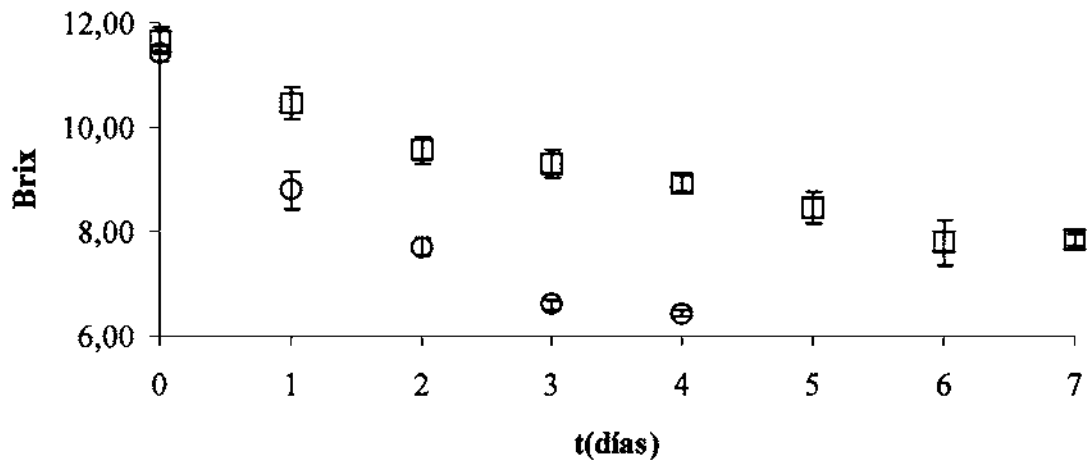


Figura 4

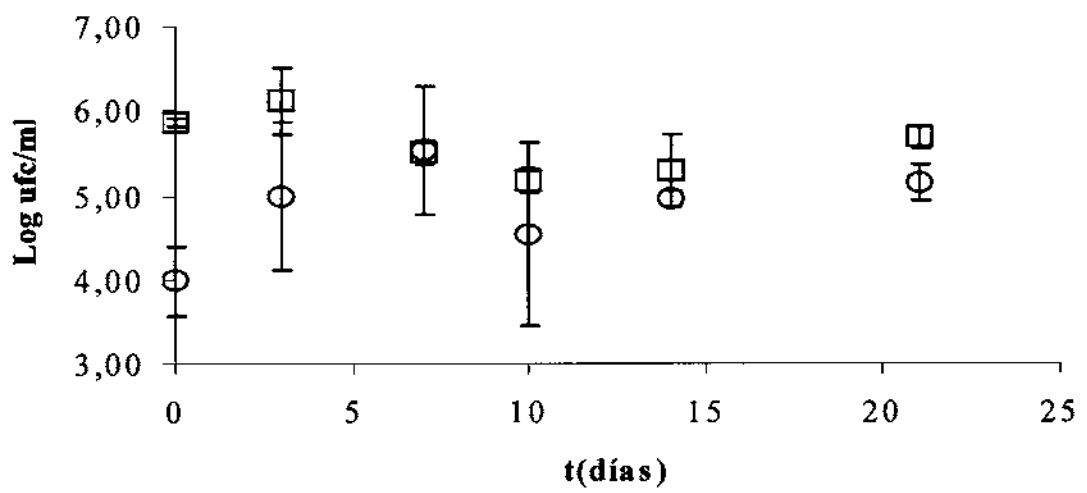


Figura 5

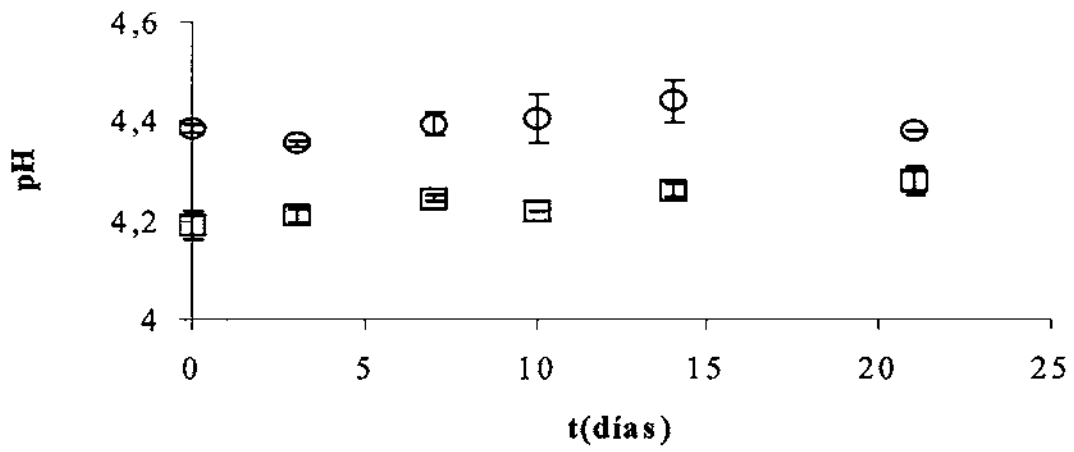


Figura 6

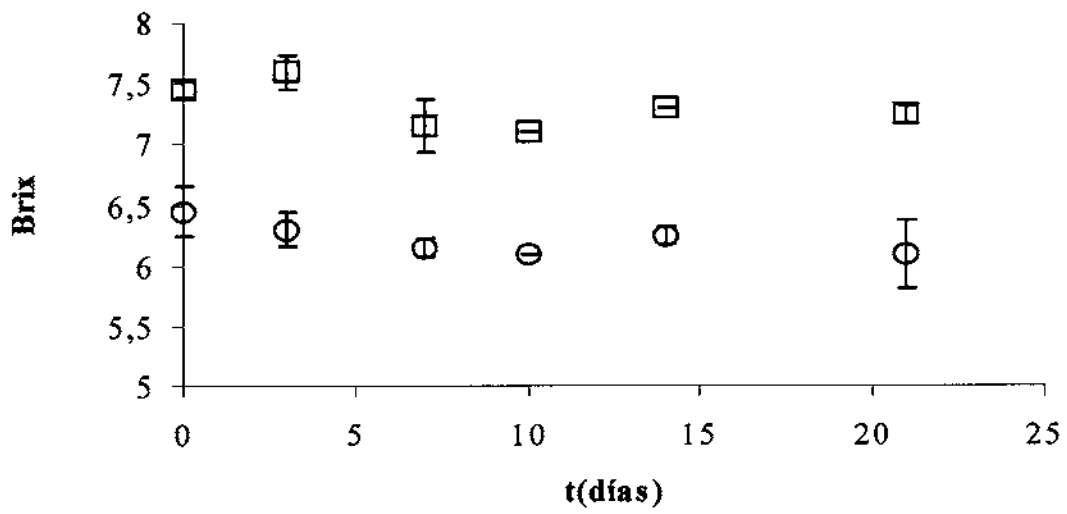


Figura 7



- ②① N.º solicitud: 201500220
②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.03.2015
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
X	ROSEN RICH. Pharmacy Brewing: Last Call. Brew your own [publicación en serie en línea], Jul/Ago 2008, [recuperado el 25.05.2015]. Recuperado de Internet <URL: http://byo.com/stories/item/1719-pharmacy-brewing-last-call	1-2
Y		3-4
Y	WO 9406901 A1 (LEFEBVRE PAUL HENRI et al.) 31.03.1994	3-4
Y	US 2014322386 A1 (FARLEY JAMES C et al.) 30.10.2014	3-4

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
27.05.2015

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12C11/11 (2006.01)

C12C12/04 (2006.01)

C12R1/865 (2006.01)

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

C12C, C12R

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, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.05.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3-4	SI
	Reivindicaciones 1-2	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-4	NO

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	ROSEN RICH. Pharmacy Brewing: Last Call. Brew your own [publicación en serie en línea], Jul/Ago 2008, [recuperado el 26.05.2015]. Recuperado de Internet <URL: http://byo.com/stories/item/1719-pharmacy-brewing-last-call	Julio 2008
D02	WO 9406901 A1 (LEFEBVRE PAUL HENRI et al.)	31.03.1994
D03	US 2014322386 A1 (FARLEY JAMES C et al.)	30.10.2014

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

La presente invención reivindica un procedimiento de obtención de una cerveza que comprende el empleo de la levadura *Saccharomyces boulardii* como microorganismo responsable de fermentación que es sometida a refermentación en el envase que la contiene y que presenta una concentración en suspensión del microorganismo *Saccharomyces boulardii* mayor de 105ufc/ml

El documento D01 describe la obtención de una cerveza que comprende el empleo de la levadura *Saccharomyces boulardii* como microorganismo responsable de fermentación. Asimismo también describe el uso de *Saccharomyces boulardii* como probiótico en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. El documento D01 anticipa el objeto de las reivindicaciones 1-2, que por tanto no se consideran nuevas según el Art. 6.1 LP 11/1986.

La reivindicación 3 se caracteriza por la refermentación a la que es sometida la cerveza obtenida. En este sentido, la diferencia entre la cerveza descrita en la reivindicación 3 y D01 radica en la etapa de refermentación. Por tanto el problema técnico subyacente sería la provisión de una cerveza obtenida a partir de *S. boulardii* refermentada en el envase. Los documentos D02-D03 describen procedimientos de fermentación secundaria en la lata o botella que en la que se envasa la cerveza. La combinación de los contenidos de los documentos D01 y D02-D03 resultaría obvia para un experto en la materia que se enfrentase al problema técnico planteado. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, la reivindicación 3 carece del requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP 11/1986.

La reivindicación 4 se caracteriza por qué presenta una concentración en suspensión del microorganismo *Saccharomyces boulardii* mayor de 105ufc/ml. No obstante, esta concentración no aporta un efecto técnico inesperado y, por tanto, en opinión de esta Oficina, tampoco cumple con el requisito de actividad inventiva previsto en el Art. 8.1 LP 11/1986.