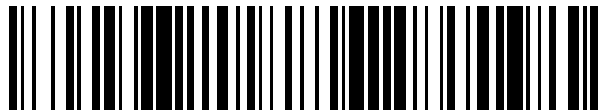


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 355**

21 Número de solicitud: 201631584

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A21D 8/04 (2006.01)
C12P 19/42 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
C12R 1/225 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

13.12.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.03.2017

Fecha de concesión:

10.01.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

17.01.2018

73 Titular/es:

EUROPASTRY, S.A. (100.0%)
Plaza Xavier Cugat 2, Edif. C, Planta. 4
08174 Sant Cugat de Vallés (Barcelona) ES

72 Inventor/es:

DIANA PEREZ, Marina;
GONZALEZ LERIDA, Laura y
QUILEZ GRAU, Joan

74 Agente/Representante:

DIÉGUEZ GARBAYO, Pedro

54 Título: **NUEVAS CEPAS DE LA ESPECIE LACTOBACILLUS REUTERI PARA LA ELABORACIÓN DE MASAS MADRES PANARIAS**

57 Resumen:

Nuevas cepas de la especie *Lactobacillus reuteri* para la utilización en masas madres panarias.

La presente invención se refiere al uso de las cepas CECT 9148 y/o CECT 9224 de *Lactobacillus reuteri* para la producción de Vitamina B₁₂, de medios enriquecidos en Vitamina B₁₂, para la fabricación de alimentos funcionales, complementos nutricionales y/o farmacéuticos, así como un método para la producción de Vitamina B₁₂ en masa madre ácida o sourdough mediante dichas cepas.

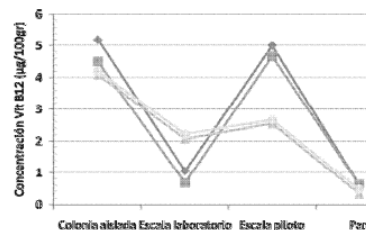


Fig. 1

ES 2 604 355 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

**NUEVAS CEPAS DE LA ESPECIE LACTOBACILLUS REUTERI PARA LA
ELABORACIÓN DE MASAS MADRES PANARIAS**

Descripción

5

Nuevas cepas de las especies *Lactobacillus reuteri* para la elaboración de masas madres panarias.

La presente invención se refiere a las cepas CECT 9148 y CECT 9224 de *Lactobacillus reuteri* y su uso para la producción de Vitamina B₁₂ o cobalamina, de medios enriquecidos en Vitamina B₁₂ o cobalamina, para la fabricación de alimentos funcionales, complementos nutricionales y/o farmacéuticos, así como un método para la producción de Vitamina B₁₂ o cobalamina en masas madres ácidas de pan o *sourdough* mediante dichas cepas.

15 La Vitamina B₁₂ o cobalamina es una vitamina hidrosoluble esencial para el funcionamiento del organismo tanto en humanos como en animales. Es necesaria para la función metabólica de dos enzimas: la metionina sintasa y la metilmalonil-CoAmutasa, implicadas en el metabolismo de aminoácidos, ácidos grasos y glúcidos, y en la síntesis y regulación del DNA.

20

Salvo bacterias y arqueas, ningún otro organismo tiene las enzimas necesarias para la síntesis de esta vitamina. Por este motivo, es necesario incluir en la dieta alimentos que sirvan de fuente de cobalamina para cumplir con la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) de 2,5µg/día. La mayoría de alimentos de origen animal contienen Vitamina B₁₂, como carnes, pescado, huevos, leche y sus derivados; mientras que los alimentos de origen vegetal no, o contienen cantidades muy reducidas. La deficiencia de Vitamina B₁₂, debido a una baja ingesta, puede causar diversas manifestaciones clínicas. Este tipo de deficiencias es, por tanto, más común en personas veganas, vegetarianas y en gente mayor. No obstante, la anemia perniciosa, que es la deficiencia más severa, no tiene su origen en problemas en la dieta, sino que es el resultado de un problema en la absorción de vitaminas en el intestino delgado.

Estructuralmente es una de las vitaminas más complejas, formada por un anillo de corrina con un átomo central de cobalto unido a 4 anillos pirrólicos, un α-ligando

35

inferior y un β -ligando superior. Incluye tres formas de origen natural (adenosilcobalamina, metilcobalamina e hidroxilcobalamina) y una forma transformada químicamente (cianocobalamina), que difieren en el ligando superior.

5 En solución acuosa la Vitamina B₁₂ es sensible a la luz, a agentes oxidantes y reductores y a temperaturas elevadas. Su estabilidad también puede verse afectada por la presencia de otras vitaminas. La forma más estable y barata se obtiene por la reacción de vitámeros naturales producidos por bacterias (principalmente hidroxilcobalamina) con cianuro, formando cianocobalamina, que es la que se utiliza
10 en los alimentos fortificados y en las preparaciones farmacéuticas. La producción industrial de Vitamina B₁₂ se realiza mediante procesos biosintéticos de fermentación, utilizando cepas altamente productoras de dicha vitamina, como *Propionibacterium freudenreichii* y *Pseudomonas denitrificans*. Recientemente se ha descubierto que *Lactobacillus reuteri* también es capaz de producir la forma activa de la Vitamina B₁₂
15 en procesos de fermentación. Este microorganismo forma parte de las bacterias ácido lácticas (BAL), un grupo heterogéneo que está presente de manera natural en un amplio rango de nichos ecológicos, como los alimentos y el tracto gastrointestinal de los animales, incluido el hombre. Las BAL, especialmente el género *Lactobacillus*, son ampliamente utilizadas como probióticos, ayudando al restablecimiento de la
20 microbiota intestinal tras un proceso gástrico y previniendo de enfermedades infecciosas y alergias alimentarias, entre otros beneficios. Además de actuar como probióticos, algunas cepas de bacterias ácido lácticas pueden producir, liberar o incluso incrementar ciertos compuestos beneficiosos en los alimentos. Estos compuestos, llamados nutricéuticos, pueden ser macronutrientes, micronutrientes
25 (como las vitaminas) o moléculas no-nutritivas, y con ellos se elaboran lo que conocemos como alimentos funcionales, que son alimentos que se consumen como parte de una dieta normal y que contienen componentes biológicamente activos beneficiosos para la salud.

30 Las bacterias ácido lácticas juegan un importante papel en la fermentación de las masas madre (*sourdough* en inglés) que se utilizan para la elaboración del pan. Este hecho, junto con la capacidad de ciertas cepas de producir Vitamina B₁₂, ofrece la posibilidad de obtener un pan enriquecido de manera natural con esta vitamina.

35

Antecedentes de la invención

Actualmente se está recuperando el gusto por el pan tradicional elaborado con masa madre. La fermentación de esa masa madre mejora la textura y el sabor del pan, y además mejora sus características nutricionales. Si, además, la fermentación de esa masa la realiza un microorganismo capaz de producir cobalamina de manera natural, se consigue un alimento funcional que aporta beneficios a la salud, sin que esto suponga un mayor coste para el consumidor final.

Son conocidos estudios como el de Edelman *et al.* (2016) en el que se analizaba la estabilidad de la Vitamina B₁₂, tanto añadida como producida *in situ* por *Propionibacterium freudenreichii*, en la elaboración del pan. La cuantificación de la vitamina la realizó tanto por cromatografía de ultra alta precisión (UHPLC) como por ensayo microbiológico (MBA). La concentración de cianocobalamina obtenida con este último método fue de aproximadamente 0,5 µg/gr de peso seco. *Propionibacterium freudenreichii*, a pesar de poseer el estatus GRAS, no se encuentra en las masas madre de manera natural, por lo que es probable que no aporte las mismas características organolépticas al pan que una BAL.

Se conocen otros estudios referentes a fortificar un pan de manera natural con un microorganismo productor cobalamina, pero ninguno que se haga utilizando *Lactobacillus reuteri*. Otros autores han utilizado este microorganismo para incrementar la concentración de Vitamina B₁₂ en diferentes productos alimentarios. Molina *et al.* (2012) utilizó la bacteria ácido láctica *Lactobacillus reuteri* CRL1098 para biofortificar una leche de soja y evaluar su eficiencia en la prevención de los síntomas producidos por la deficiencia nutricional de Vitamina B₁₂ en hembras murinas embarazadas. Guet *al.* (2015) utilizó otra cepa de *Lactobacillus reuteri* para aumentar el contenido de Vitamina B₁₂ en un yogur de soja, consiguiendo una concentración de 18 µg/100mL. Ambos estudios utilizan la biofortificación sobre un producto derivado de la soja. Esto se debe a la popularidad alcanzada entre vegetarianos y ancianos por su sabor, su fácil digestibilidad y su asociación con la salud. Sin embargo, el pan es un alimento accesible en prácticamente todo el planeta, muy económico y que no requiere gasto de energía para su conservación (p.e. refrigeración), por lo que resulta el candidato idóneo para combatir la deficiencia por Vitamina B₁₂.

También son conocidas patentes de cepas de *Lactobacillus reuteri* y sus diferentes aplicaciones, como por ejemplo WO2015025072, CN105219683,

US2015250836, GB2535177 y otras, pero ninguna de ellas se refiere al uso de cepas de *Lactobacillus reuteri* para elaborar masas madre enriquecidas en Vitamina B₁₂.

5

Explicación de la invención

La presente invención se refiere unas nuevas cepas de la especie *Lactobacillus reuteri* inscritas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con los números CECT 9148 y CECT 9224 aisladas para su utilización en la elaboración de masas
10 madres panarias y en la fabricación de pan como alimento funcional a través de la inclusión de masa madre o *sourdough* producida por medio de estas cepas así como para la fabricación de cualquier producto alimenticio considerado alimento funcional o complemento nutricional y/o farmacéutico mediante la fuente concentrada de Vitamina B₁₂ para su ingestión o administración oral.

15

La invención también se refiere al proceso para el uso de estas cepas aisladas en la elaboración de masas madre enriquecidas en Vitamina B₁₂ que cuenta con la preparación del inóculo, la propagación en un medio de cultivo para la obtención de biomasa celular, la resuspensión y/o inoculación de la biomasa obtenida en sustratos
20 o disoluciones y la fermentación de los mismos.

En base a los conocimientos de los efectos bioquímicos de la Vitamina B₁₂ y de los múltiples estudios que lo han corroborado, en los datos de esta descripción así se demuestra, la alta capacidad de producción de cobalamina por parte de las cepas
25 CECT 49148 y CECT 9224 de *Lactobacillus reuteri*, que han sido aisladas a partir de productos alimenticios fermentados.

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son esenciales para la producción de alimentos fermentados. Su presencia en la materia prima es bien conocida, incluso sin ser añadidas (10^2 - 10^3 ufc/gramo), dominando rápidamente la fermentación. Su
30 habilidad para disminuir el pH de la matriz alimentaria produciendo ácidos a través de la fermentación de los carbohidratos permite obtener un producto final con notables características organolépticas. Las prácticas modernas de fabricación implican el uso de *starters* comerciales permitiendo una producción a gran escala sin riesgos. No
35 obstante, su uso conlleva a la obtención de productos con un perfil microbiológico

muy estandarizado y menos variable en comparación con los que han sido fermentados de forma natural.

Las ventajas que supone esta invención engloban la posibilidad de emplear sustratos de fermentación natural a bajo coste permitiendo el uso de estos microorganismos y su biosíntesis de Vitamina B₁₂, un tipo de fermentación que permite un alto valor fisiológico enriquecido de forma natural en Vitamina B₁₂ con la ventaja de poder ser conservado por largos periodos de tiempo y la posibilidad de crear un alimento potencialmente funcional apto para el consumo humano.

10

Materiales y métodos

Medios y reactivos

15

Todos los reactivos utilizados eran de grado analítico. El acetato de sodio, el ácido acético, el cianuro de sodio y la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (o taka-diestasa) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El agar MRS se compró en Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia) y el medio de ensayo de Vitamina B₁₂ y el Tween 80 en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Los *API suspensión medium* (de 2 y 5 mL), el *API 50CHL medium*, las tiras de API 50CH y el patrón McFarland fueron proporcionados por Biomérieux (Marcy-l'Étoile, Francia). La D-(+)-maltosa monohidratada fue obtenida de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El KHCO₃ de PanReacApplichem (Castellar del Vallés, Barcelona). El kit VitaFast empleado para la determinación y cuantificación de Vitamina B₁₂ (Cianocobalamina) y el estándar de recuperación de Vitamina B₁₂ fueron obtenidos de R-Biopharm (Darmstadt, Alemania).

25

Microorganismos

Como control experimental se utilizaron dos cepas de *Lactobacillus reuteri*. Una de ellas fue *Lactobacillus reuteri* JCM 1112, obtenida de la *Japan Collection of Microorganisms* (JCM) y la otra se obtuvo de un preparado probiótico farmacéutico llamado Reuteri Gotas (BioGaia, Laboratorios Casen Fleet S.L.U., Zaragoza) que contiene *Lactobacillus reuteri* Protectis® DSM 17938. Estas cepas sirvieron de guía para poder comparar los resultados con los de nuestras cepas aisladas.

35

Aislamiento de cepas a partir de productos fermentados

Para este estudio se analizaron 47 productos alimenticios (44 de ellos fermentados), listados en la **Tabla 1**. Se pesaron 10 gr de muestra en una bolsa con filtro (AES Chemunex, Terrassa), se realizó una dilución 1/10 con agua de peptona y se trituró en un homogeneizador *stomacher* (UIL Instruments, Barcelona, Spain). A partir de la muestra filtrada, se realizaron 8 diluciones seriadas en agua de peptona y se sembraron por inmersión las 4 últimas diluciones en placas de Petri con medio de ensayo de Vitamina B₁₂ agar, previamente fundido. Una vez solidificado el agar, se incubaron las placas en una jarra de anaerobiosis a 37°C durante 48h. En las placas de agar que mostraron crecimiento, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (ufc) utilizando un contador de colonias y se seleccionaron varias de ellas al azar para realizar un cultivo previo a la extracción. Cada una de estas colonias se picó y resembró en un tubo falcon con faldón, provisto de caldo de medio de ensayo de Vitamina B₁₂ previamente preparado y autoclavado. Los tubos se incubaron durante 48h a 37°C. Tras ese periodo de incubación, se homogeneizó el pellet de cada tubo y se procedió a realizar la extracción de la Vitamina B₁₂.

Extracción y cuantificación de Vitamina B₁₂

20

Para realizar la extracción de la cianocobalamina, se siguió el protocolo de extracción facilitado en las instrucciones del kit VitaFast Vitamina B₁₂ (R-Biopharm, Alemania). Primeramente, se pesó 1 gr del pellet homogeneizado en otro tubo falcon y se añadió 20 mL de tampón de acetato (pH 4,5), preparado con anterioridad. Luego se añadió a cada tubo 250 µL de NaCN (1%, recién preparado), 300 mg de taka-diastasa (α -amilasa de *Aspergillus oryzae*) y se agitó bien en un vórtex. Todo el procedimiento se realizó intentando mantener los tubos en la oscuridad, tapándolos con papel de aluminio. Tras la adición de todos los reactivos, se incubaron los tubos durante 1h en oscuridad a 37°C, agitándolos cada diez minutos. Después, se enrasaron los tubos a 40 mL con agua destilada y se calentaron los extractos durante 30 minutos en un baño de agua a 95°C. Durante el proceso, los tubos se agitaron al menos 5 veces y se mantuvieron en la oscuridad, tapando el baño. Una vez transcurrido ese tiempo, se enfriaron los tubos rápidamente por debajo de los 30°C, se centrifugaron y se conservaron a 4°C en oscuridad hasta el momento de realizar el kit.

35

Para la cuantificación de la cianocobalamina, se utilizó el kit VitaFastVitamina B₁₂ (de R-Biopharm), que consta de una placa de microtitulación formada por 12 tiras con 8 pocillos cada una (recubiertos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*), un medio de Vitamina B₁₂ y un vial con un estándar de vitamina que se utiliza para realizar una curva patrón. El medio y los estándares se prepararon frescos cada vez que se realizó el kit, siguiendo las instrucciones facilitadas en el mismo. Las extracciones se filtraron (utilizando filtros de jeringa de 0.20 µm Ø) en un eppendorf de 2 mL y, cuando fue necesario, se diluyeron con agua destilada estéril. Se pipetearon 150 µL del medio de crecimiento en cada pocillo, seguido de otros 150 µL de los estándares o 150 µL de las muestras en los pocillos asignados, ambos por duplicado, siguiendo una plantilla. Tras eliminar las burbujas formadas en los pocillos con la ayuda de puntas de pipeta estériles, se cubrieron las tiras con una lámina adhesiva y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 48h. Tras la incubación, se presionó la lámina adhesiva para evitar que se vertiera el contenido de los pocillos, se colocó la microplaca boca abajo sobre una mesa y se agitó cuidadosamente para homogeneizar el contenido de los pocillos. A continuación, se retiró la lámina adhesiva en diagonal, sujetando las tiras con cuidado para evitar sacarlas de la placa de microtitulación, se destruyeron las burbujas que habían aparecido durante la agitación con puntas de pipeta estériles y se realizó la medición de turbidez a 630 nm mediante un lector de absorbancia de microplacas ChroMate (Awareness Technology, Palm City, Florida). Los datos generados se analizaron utilizando el software RIDA® SOFT Win de R-Biopharm.

Para comprobar que el procedimiento de extracción de la cianocobalamina se realizó correctamente, se hizo un ensayo de recuperación, en el que se añadían 200µL de una solución de Vitamina B₁₂ de concentración conocida a un tubo falcon con 1 gr de muestra y se seguía el mismo protocolo de extracción y análisis que con el resto de muestras. Finalmente, se comparó el resultado obtenido con el de la muestra sin la solución de recuperación y se calculó el porcentaje de recuperación.

30

Identificación

Las cepas que produjeron una concentración de Vitamina B₁₂ de interés para este estudio en el VitaFast se identificaron mediante la galería API 50CH (Biomérieux, Francia), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Para ello, se sembró

35

en superficie en agar MRS una parte del pellet obtenido en el proceso de aislamiento, y se incubó durante 48h a 30°C en anaerobiosis. Con un asa de Kolle, se realizó una suspensión densa en una ampolla de *API suspensión medium* de 2mL. Luego, con una pipeta pasteur, se transfirió cierto número de gotas (n) a una ampolla de 5mL de *API suspensión medium*, alcanzando una turbidez igual al patrón 2 de McFarland. Para conseguir el inóculo final, se transfirió el doble de gotas (2n) a una ampolla de *API 50CHL medium* y, tras homogeneizarlo bien, se inoculó en las galerías API 50CH, colocadas en su soporte con agua destilada para evitar la evaporación del medio. Una vez inoculadas las 50 galerías, se cubrieron con aceite de parafina para generar un ambiente anaerobio y se incubaron a 30°C durante 24-48h. Utilizando el programa de lectura web de API (www.apweb.biomerieux.com) se identificaron las cepas aisladas. Finalmente, aquellas que resultaron de interés, se transfirieron a tubos con criobolas para conservarlas mejor y poder utilizarlas en posteriores procedimientos.

15 *Elaboración de masas madre y pan*

Una vez obtenidas e identificadas las cepas productoras de Vitamina B₁₂, se hicieron pruebas de fermentación de masas madre líquidas a dos escalas diferentes: escala laboratorio en un matraz Erlenmeyer y escala planta piloto en un biorreactor de 5L (Biostat A plus, Sartorius, Alemania). En ambos casos era necesario preparar un inóculo de la cepa aislada anteriormente. Para ello, se prepararon dos tubos falcon con caldo de ensayo de Vitamina B₁₂ y se depositaron 2 criobolas en cada uno. Tras incubarlos durante 48h a 37°C, se centrifugaron los tubos, se decantó el medio y se lavó el pellet cuidadosamente con agua destilada estéril, evitando que se desprendiera del fondo del tubo. Luego se resuspendió en 20 mL de agua destilada a cada tubo, se vorteoó durante unos minutos y se midió la turbidez mediante un espectrofotómetro para calcular la concentración de microorganismo de la que partiría la masa madre.

En el caso de las pruebas realizadas a escala laboratorio, para cada cepa ensayada se preparó por duplicado una masa madre blanco (sin inóculo) y una con cepa productora de cianocobalamina. Los blancos se prepararon mezclando agua del grifo y harina integral *wholegrain* en proporción 80% y 20%, respectivamente. Las masas con inóculo mantenían la misma proporción pero incluían los 20 mL con la cepa resuspendida. Tanto los blancos como las muestras se incubaron a 30°C

durante 48h, con agitación manual cada cierto tiempo. Durante ese periodo, se valoró el pH y la acidez total titulable (TTA) de 10 gr de las masas madre homogenizados con 90 mL de agua destilada en un medidor automático (Titroline pH MATIC 23, Crison Instruments, España). La TTA, expresada como la cantidad (mL) de NaOH 0,1 M necesaria para alcanzar un pH de 8,4, y el pH se analizaron a 3 tiempos diferentes ($t_0=0h$, $t_1=24h$ y $t_2=48h$). Finalmente, se realizó la extracción y la cuantificación de Vitamina B₁₂ de las masas madre fermentadas, siguiendo el mismo procedimiento anteriormente explicado, incluyendo la recuperación.

10 En el caso de las pruebas a escala planta piloto, la preparación del inóculo fue exactamente igual (incluyendo el duplicado) que a escala laboratorio, excepto el paso final. Tras añadir 20 mL de agua y vortear, se traspasaron las cepas a dos Erlenmeyers, se enrasaron a 200 mL y luego se determinó la turbidez en el espectrofotómetro. La fermentación de la masa madre en el biorreactor se realizó de dos modos diferentes. En uno de ellos se respetó la misma proporción de ingredientes
15 utilizada en los matraces Erlenmeyer (80% agua del grifo y 20% harina integral *wholegrain*) mientras que en el otro se optimizó, añadiendo maltosa a la harina y manteniendo el pH a 5 durante las 48h de proceso. La proporción de ingredientes que se siguió en este caso fue la siguiente: harina integral *wholegrain* (17%), D-(+)-
20 maltosa monohidratada (3%) y agua del grifo (80%), donde se incluyó la cepa diluida. Durante el procedimiento se monitorizó la temperatura de fermentación (30°C), el pH y la agitación (rpm). Trascurridas las 48h, se procedió a la extracción de Vitamina B₁₂ y la determinación de la TTA de la misma manera que con las masas madres a escala laboratorio, todo ello por duplicado. Además, también se hizo un recuento en placa de
25 la concentración final de microorganismos en la masa madre, sembrando en medio de ensayo de Vitamina B₁₂ agar. Las masas madres obtenidas se congelaron para su posterior uso en la elaboración de pan.

Para finalizar el proyecto, se elaboró pan a partir de las masas madre optimizadas en el biorreactor. Todas las pruebas de pan se realizaron por duplicado. En la cubeta de la panificadora (Moulinex, Alençon, Francia), se pesaron los siguientes ingredientes siguiendo este orden: 160 gr de masa madre, 10 gr de sal, 150 gr de agua, 500 gr de harina para pan y 5 gr de levadura fresca. Se seleccionó un programa de pan rápido (98 minutos). Una vez enfriado y desmoldado, se procedió a extraer y
35 cuantificar la Vitamina B₁₂. Para realizar la extracción, se trituró un trozo de pan con

ayuda de un molino de cuchillas (M20-IKA Labortechnik, Brisgovia, Alemania) y se pesó 1 gr en un tubo falcon. Luego se siguió con el mismo procedimiento de extracción y cuantificación anteriormente detallado.

5 Resultados

Screening de cepas productoras de Vitamina B₁₂

La **Tabla 1** muestra que, de las 47 muestras analizadas, 34 dieron un resultado positivo en cuanto al crecimiento en placa, mientras que las 13 restantes no. El número de unidades formadoras de colonias en placa obtenido de los diferentes productos fue muy variado, con recuentos de entre 10⁶ufc/gr (queso de cabra Banon de Chèvre Fermier Xavier, Francia) hasta 10⁹ufc/gr (masa madre a base de cerveza Voll-Damn, elaborada por Europastry).

15

El medio de ensayo de Vitamina B₁₂ utilizado para realizar el *screening* es un medio que carece de esta vitamina y está pensado para el crecimiento de bacterias acidolácticas capaces de producir cobalamina o para aquellas que crecen independientemente de su presencia. Teniendo esto en cuenta, partimos de la siguiente hipótesis: las cepas capaces de crecer en ese medio podían ser productoras de cobalamina y resultarnos útiles para este estudio o, por el contrario, podían ser cepas que no requerían de esta vitamina para su crecimiento, produciendo resultados conocidos como “falsos positivos”. Para confirmar esta hipótesis y descartar los posibles falsos positivos obtenidos, se realizó el cultivo de 5 colonias escogidas al azar de cada muestra (170 colonias en total) en caldo de Vitamina B₁₂ y se procedió a la extracción de vitamina (con un porcentaje de recuperación del 98,77%) y a su posterior cuantificación utilizando el kit VitaFast Vitamina B₁₂. De las 170 colonias analizadas, 19 resultaron ser positivos reales, produciendo una cantidad de cianocobalamina suficiente como para ser cuantificada con el kit. Las demás produjeron un valor inferior al límite de detección (0,21 µg/100gr). Pese a los resultados positivos, únicamente 8 colonias (pertenecientes a dos muestras analizadas) dieron valores cercanos a los obtenidos en el análisis de las dos cepas control (*Lactobacillus reuteri* JCM 1112 y *Lactobacillus reuteri* Protectis® DSM 17938). Los valores de cianocobalamina fueron de 4,00 ± 0,11 y 4,22 ± 0,05 µg/100g, y correspondían a dos cepas aisladas a partir de dos masas madre obtenidas de una

35

panadería artesanal de Tarragona, que se corresponden con las cepas CECT 9148 y CECT 9224.

Tabla 1. Alimentos analizados y resultados del screening.

Muestra	Origen de leche	Crecimiento en medio de ensayo de Vitamina B ₁₂	CFU/ml	Vitamina B ₁₂ (µg/100 g)
Quesos				
C-1	E	-		
C-2	G	+	$1.80 \cdot 10^9$	< 0.03
C-3	C	+	$4.56 \cdot 10^8$	< 0.03
C-4	G	+	$4.00 \cdot 10^7$	< 0.03
C-5	E	+	$9.65 \cdot 10^7$	< 0.03
C-6	C	+	$9.48 \cdot 10^8$	< 0.03
C-7	M	+	Incontable ^(a)	< 0.03
C-8	E	+	$5.62 \cdot 10^6$	< 0.03
C-9	G	+	$1.96 \cdot 10^8$	< 0.03
C-10	C	+	$6.41 \cdot 10^7$	< 0.03
C-11	G	+	$1.00 \cdot 10^6$	< 0.03
C-12	C	+	$4.98 \cdot 10^7$	< 0.03
C-13	B	-		
C-14	C	-		
C-15	C	-		
C-16	G	-		
C-17	C	-		
C-18	G	+	$3.45 \cdot 10^7$	< 0.03
C-19	C	-		
C-20	E	+	$1.50 \cdot 10^8$	< 0.03
Productos lácteos				
D-21	E	+	Incontable ^(a)	< 0.03
D-22	G	-		
D-23	C	+	$2.18 \cdot 10^8$	< 0.03
D-24	C	-		
D-25	C	+	$5.72 \cdot 10^6$	< 0.03
D-26	C	+	Incontable ^(a)	< 0.03
D-27	C	+	$2.21 \cdot 10^7$	< 0.03
D-28	C	+	$4.05 \cdot 10^7$	< 0.03
Masas madre				
S-1		+	$1.38 \cdot 10^9$	< 0.03
S-2		+	$3.84 \cdot 10^8$	< 0.03
S-3		+	$5.47 \cdot 10^9$	< 0.03
S-4		+	$4.90 \cdot 10^8$	< 0.03
S-5		+	$3.01 \cdot 10^8$	< 0.03
S-6		+	$4.32 \cdot 10^7$	< 0.03
S-7		+	$1.80 \cdot 10^9$	0.030 ± 0.008
S-8		+	$1.00 \cdot 10^9$	0.030 ± 0.002
S-9		+	$1.50 \cdot 10^9$	0.030 ± 0.004
ST-1		+	$2.04 \cdot 10^9$	4.10 ± 0.006
ST-2		+	$3.00 \cdot 10^9$	4.22 ± 0.009
S-10		+	$2.03 \cdot 10^7$	< 0.03
S-11		+	$1.70 \cdot 10^7$	< 0.03
S-12		+	$7.10 \cdot 10^7$	0.031 ± 0.1
Otros				
O-29: Harina Integral de trigo		-		
O-30: Cerveza		-		
O-31: Cerveza		-		
O-32: Cerveza		-		
O-33: Salami		+	$9.47 \cdot 10^7$	< 0.03

E, oveja; B, búfalo; G, cabra; C, vaca; M, mixta.

La concentración de cobalamina se presenta como media \pm desviación estándar.

^(a) Colonias muy pequeñas.

5

Elaboración de masas madre a escala laboratorio

En las pruebas a escala laboratorio realizadas en matraces Erlenmeyer, se obtuvieron los resultados que se observan en la **Tabla 2**. Se valoró el pH y la TTA de todas las masas madre cada 24h. Durante las primeras 24 horas de incubación, se observó una bajada drástica del pH tanto en las masas madre blanco como en las inoculadas con *Lactobacillus reuteri*. En el caso de las masas madre sin inóculo, el pH bajó de $6,29 \pm 0,07$ a $3,69 \pm 0,07$, mientras que en las masas madres inoculadas con las cepas experimentales disminuyó de $6,16 \pm 0,04$ a $3,24 \pm 0,06$ en *Lactobacillus reuteri* CECT 9148 y de $6,20 \pm 0,08$ a $3,21 \pm 0,06$ en CECT 9224. La acidez total titulable también varió considerablemente durante las primeras 24h pero, a diferencia del pH, aumentó. Este incremento fue más notorio en las masas madre inoculadas con las cepas CECT 9148 y CECT 9224, llegando a doblar la acidez de la masa madre blanco. En las siguientes 24h, se observó una diferencia en la evolución de algunos tipos de masas madre. Mientras que las blanco y las preparadas con cepa control siguieron la misma tendencia (el pH y la TTA siguió disminuyendo y aumentando, respectivamente), en las masas madre preparadas con las cepas CECT 9148 y CECT 9224 se observó un pico a las 48h en el que se produce un ligero aumento del pH y el descenso de la TTA.

25

En cuanto a la Vitamina B₁₂ producida, las masas madres blanco produjeron una pequeña cantidad (promedio de $0,11 \pm 0,03$ $\mu\text{g}/100\text{gr}$). Esta ínfima concentración puede ser causada por la presencia de bacterias salvajes productoras de cobalamina en la misma harina o por interferencias de ésta en el kit, siendo irrelevante en el conjunto de este estudio. Las masas madre incubadas con las colonias de *Lactobacillus reuteri* CECT 9148 y CECT 9224 produjeron una cantidad de cobalamina muy superior a las de las masas madre blanco e incluso superior a la de las cepas control *Lactobacillus reuteri* JCM 1112 ($0,68 \pm 0,03$ $\mu\text{g}/100\text{gr}$) y *Lactobacillus reuteri* Protectis® DSM 17938 ($1,06 \pm 0,03$ $\mu\text{g}/100\text{gr}$). Las concentraciones de estas masas madre fue de $2,36 \pm 0,32$ $\mu\text{g}/100\text{gr}$ en la cepa *Lactobacillus reuteri* CECT 9148 y $2,28 \pm 0,23$ $\mu\text{g}/100\text{gr}$ en *Lactobacillus reuteri* CECT 9224, con un porcentaje de recuperación del 97,33%.

35

Tabla 2. Resultados pruebas a escala laboratorio (matraz Erlenmeyer).

Muestra	UFC/mL	pH			TTA (mLNaOH 0,1 M)			Conc. Vitamina B12 (µg/100gr)
		0h	24h	48h	0h	24h	48h	
<i>L. reuteri</i> DSM*	1,48 · 10 ⁹	6,22 ± 0,01	3,25 ± 0,04	3,13 ± 0,03	0,51 ± 0,11	10,09 ± 0,32	11,45 ± 0,22	1,06 ± 0,03
<i>L. reuteri</i> JCM*	1,80 · 10 ⁹	6,21 ± 0,04	3,48 ± 0,21	3,16 ± 0,06	0,52 ± 0,05	8,02 ± 1,92	10,93 ± 0,44	0,68 ± 0,03
<i>L. reuteri</i> CECT 9148	2,75 · 10 ⁹	6,16 ± 0,04	3,24 ± 0,06	3,39 ± 0,02	0,60 ± 0,00	12,22 ± 0,58	11,61 ± 0,41	2,07 ± 0,25
<i>L. reuteri</i> CECT 9224	3,10 · 10 ⁹	6,20 ± 0,08	3,21 ± 0,06	3,40 ± 0,02	0,65 ± 0,11	12,80 ± 2,04	11,96 ± 0,46	2,22 ± 0,18
Blanco	-	6,29 ± 0,07	3,69 ± 0,07	3,52 ± 0,14	0,49 ± 0,03	5,10 ± 3,36	6,96 ± 3,72	0,09 ± 0,02

Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar.

*Cepas control.

5 Elaboración de masas madre a escala planta piloto

La **Tabla 3** muestra los resultados de las pruebas realizadas en las masas madres elaboradas a escala planta piloto. En la masa madre sin inóculo ('BIOBLANC') se obtuvo un recuento final de $3,20 \cdot 10^9$ ufc/mL. Este resultado evidencia la presencia de microorganismos en la propia harina y que crecen a lo largo de la fermentación. El recuento de las masas madre no optimizadas se mantuvo prácticamente igual a lo largo de la fermentación. Sin embargo, el recuento final de las masas madre optimizadas aumentó respecto al recuento inicial. En el caso de las masas madre OPTIFARM y OPTIJAP (inoculadas con *Lactobacillus reuteri* Protectis® DSM 17938 y *Lactobacillus reuteri* JCM 1112, respectivamente) el recuento final incrementó 1 logaritmo, mientras que las masas madre OPTITARR 1 y OPTITARR 2 (inoculadas con las cepas de CECT 9148 y CECT 9224, respectivamente) aumentaron su recuento final en placa de 10^8 a 10^{10} . La acidez total titulable en las masas madre no optimizadas fue muy superior a la obtenida en las elaboradas a pH constante y con maltosa. En la determinación de la concentración de cianocobalamina se obtuvo un resultado de $2,55 \pm 0,07$ µg/100gr en OPTITARR 1 y $2,67 \pm 0,15$ µg/100gr en OPTITARR 2, siendo $5,10 \pm 0,07$ µg/100gr y $4,67 \pm 0,88$ µg/100gr las obtenidas en OPTIFARM y OPTIJAP, respectivamente. El porcentaje de recuperación de Vitamina B₁₂ fue del 107,57%.

Tabla 3. Resultados pruebas a escala planta piloto (Biorreactor).

Masa madre	UFC/mL (t=0)	UFC/mL (t=48h)	pH inicial	pH final	TTA final (mLNaOH 0,1M)	Concentración Vitamina B ₁₂ (µg/100gr)
No optimizado						
BIOBLANC	-	3,20 · 10 ⁹	6,20	3,64	9,89 ± 0,31	0,03 ± 0,00
BIOFARM*	1,25 · 10 ⁸	2,38 · 10 ⁸	6,15	3,41	12,62 ± 2,12	1,40 ± 0,11
BIOJAP*	2,42 · 10 ⁸	8,90 · 10 ⁸	6,30	3,40	11,49 ± 0,05	1,19 ± 0,02
BIOTARR 1 ⁺	3,25 · 10 ⁸	6,27 · 10 ⁸	6,20	3,38	13,02 ± 0,18	0,73 ± 0,02
BIOTARR 2 [^]	2,90 · 10 ⁸	2,49 · 10 ⁸	6,15	3,34	12,22 ± 0,10	0,92 ± 0,05
Optimizado						
OPTIFARM*	2,90 · 10 ⁸	4,85 · 10 ⁹	6,14	4,95	4,51 ± 0,26	5,10 ± 0,07
OPTIJAP*	2,75 · 10 ⁸	2,04 · 10 ⁹	6,34	4,95	4,30 ± 0,08	4,67 ± 0,07
OPTITARR 1 ⁺	2,67 · 10 ⁸	6,00 · 10 ¹⁰	6,25	4,95	4,79 ± 0,25	2,55 ± 0,07
OPTITARR 2 [^]	3,12 · 10 ⁸	1,70 · 10 ¹⁰	6,26	4,95	4,86 ± 0,04	2,67 ± 0,15

* Masas madre inoculadas con las cepas control *Lactobacillus reuteri* Protectis® DSM 17938 y *Lactobacillus reuteri* JCM 1112.

⁺ Masas madre inoculadas con la cepa *Lactobacillus reuteri* CECT 9148.

[^] Masas madre inoculadas con la cepa *Lactobacillus reuteri* CECT 9224.

5

Elaboración de pan con masa madre optimizada

10 De cada masa madre optimizada en el biorreactor se elaboró un pan por duplicado. Tras la extracción de la Vitamina B₁₂ (con una recuperación del 89,37%), se obtuvieron los siguientes resultados: 0,12 ± 0,00 µg/100gr en BIOBLANC; 0,63 ± 0,07 µg/100gr para los elaborados con las cepas control (OPTIFARM y OPTIJAP); 0,33 ± 0,05 µg/100gr en OPTITARR 1 y 0,48 ± 0,07 µg/100gr en OPTITARR 2.

15

Evolución de la Vitamina B₁₂ con el proceso de escalado

20 En la figura 1 se observa cómo varía la cuantificación de cianocobalamina de las cepas de *Lactobacillus reuteri* que se han estudiado a todos los niveles (colonia aislada, escala laboratorio, escala piloto y pan). La concentración de Vitamina B₁₂ disminuye conforme se aumenta la complejidad de la muestra estudiada. El aumento en la concentración que se puede apreciar en el paso de escala laboratorio a escala

planta piloto se debe a que, en este último caso, la fermentación se optimizó añadiendo maltosa y manteniendo el pH a 5 durante el proceso.

En el último paso del escalado, al saber el porcentaje de masa madre que se utilizó para elaborar el pan (32%), se pudo calcular la concentración de Vitamina B₁₂ que se esperaba obtener y, al compararla con la real, se calculó el porcentaje que se mantenía y el que se perdía (**Tabla 4**). El pan que mejor conservó la Vitamina B₁₂ fue el preparado con la cepa de CECT 9224, conservando un 56,32% de la presente en la masa madre. Por el contrario, el peor resultado obtenido fue el del pan elaborado OPTIFARM, en el que únicamente se conservó el 38,60% de la Vitamina B₁₂. De promedio total se cuantificó una pérdida del 55,71%.

Tabla 4. Concentración de Vitamina B₁₂ teórica y real en pan.

Pan	µg/100 gr Vitamina B ₁₂ en biorreactor	% MM en pan	µg/100gr Vitamina B ₁₂ esperada en pan	µg/100gr Vitamina B ₁₂ obtenida en pan	% Vitamina B ₁₂ conservado
OPTIFARM*	5,10 ± 0,07	32%	1,63 ± 0,02	0,63 ± 0,07	38,60
OPTIJAP*	4,67 ± 0,88	32%	1,50 ± 0,28	0,63 ± 0,07	41,94
OPTITARR 1 ^a	2,55 ± 0,07	32%	0,82 ± 0,02	0,33 ± 0,05	40,29
OPTITARR 2 ^b	2,67 ± 0,15	32%	0,85 ± 0,05	0,48 ± 0,07	56,32

* Pan elaborado con las masas madre de las cepas control (*Lactobacillus reuteri* Protectis® DSM 17938 y *Lactobacillus reuteri* JCM 1112).

^aPan elaborado con la masa madre de la cepa *Lactobacillus reuteri* CECT 9148.

^b Pan elaborado con la masa madre de la cepa *Lactobacillus reuteri* CECT 9224.

20 Screening de cepas productoras de Vitamina B₁₂

La cobalamina únicamente es sintetizada por algunos grupos de bacterias y arqueas. Entre ellos encontramos microorganismos como *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium shermanii*, *Pseudomonas denitrificans*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus megaterium*, *Rhizobium cobalaminogenum*, *Rhodopseudomonas protamicus* y *Streptomyces olivaceus*. De todos los mencionados, *Pseudomonas denitrificans* es el más explotado industrialmente, ya que su productividad puede alcanzar los 300 mg/L. Sin embargo, este microorganismo no ha obtenido el estatus GRAS (del inglés *Generally Recognized As Safe*) de la Agencia de Alimentos y Medicamentos estadounidense (FDA), por lo que su utilización en la industria alimentaria no está aprobada. En 2003 Taranto *et al.* describió por primera

vez la capacidad de una bacteria ácido láctica de sintetizar cobalamina, concretamente *Lactobacillus reuteri* CRL1098. Las BAL, a diferencia de *Pseudomonas denitrificans*, sí poseen el estatus GRAS de la FDA, por lo que pueden ser utilizadas en la industria alimentaria para aportar características nutricionales y organolépticas beneficiosas a los productos alimenticios elaborados. Este grupo de bacterias juega un importante papel en la elaboración de una gran cantidad de productos fermentados, como quesos, yogures, embutidos, masas madre e incluso bebidas alcohólicas. Por los motivos expuestos, en el presente estudio se ha realizado el *screening* de cepas ácido lácticas en estos productos.

10

No es la primera vez que se realiza un análisis de esta índole. La cepa de *Lactobacillus reuteri* (*Lactobacillus reuteri* CRL1098 estudiada por Taranto *et al.* (2003) fue aislada de una masa madre. Miescher Schwenninger *et al.* (2004) aisló 1.424 cepas procedentes de varios productos alimenticios (leche cruda, queso, yogur, aceitunas negras, masas madre y salami, entre otros), para posteriormente ensayar la actividad antifúngica de éstas sobre los contaminantes fúngicos predominantes en el yogur y la fruta. Recientemente, Diana *et al.* (2014) realizó el *screening* de 58 quesos artesanales con el propósito de seleccionar cepas de lactobacilos productoras de ácido γ -aminobutírico (GABA), una molécula con efecto hipotensivo (11), para su posterior utilización en panes con masas madres fermentadas por estos aislados. Este último estudio es el más similar al que se presenta en este trabajo. De las 580 colonias analizadas (10 colonias por queso) por Diana *et al.* (2014), 65 dieron un resultado positivo en la producción de GABA (11,2%). En este, de las 170 colonias analizadas en total, 19 produjeron un resultado positivo en cuanto a la síntesis de Vitamina B₁₂ (11,2%). No obstante, es preciso tener en cuenta que únicamente 65 colonias fueron aisladas a partir de las muestras de queso, y de esas 65, tan solo 2 (3,1%) produjeron una cantidad de cobalamina cuantificable. Para realizar el *screening*, se compraron quesos de múltiples orígenes geográficos (**Tabla 1**), preferentemente artesanales. La elección de estos quesos se debe al tipo de cepas que se encuentran en ellos. Mientras que en los quesos elaborados en procesos más industrializados se suelen utilizar cultivos *starters* estándares, los que siguen un proceso artesanal contienen las cepas salvajes que se encuentran en la leche con la que se elaboran. Pese a la selección de los quesos analizados (de elaboración artesanal), únicamente los quesos Ardi Gazta Ekia D.O. Roncal (Valle del Roncal, Navarra) y Banon de Chèvre Fermier Xavier D.O.P. (Provence – Alpes – Cote d’Azur,

35

Francia) proporcionaron resultados positivos. Ambos difieren en prácticamente todo: el primero está elaborado con leche de oveja, mientras que en el segundo la leche es de cabra, y tampoco se encuentran cercanos geográficamente. Las únicas características que comparten son el estado de la leche con la que se elaboran (leche
 5 cruda) y que ambos tienen Denominación de Origen Protegida (D.O. o D.O.P.), lo que garantiza una producción artesanal únicamente con los ingredientes de una zona determinada. Los demás, pese a su apariencia artesanal, es posible que lleven algún tipo de cultivo *starter*, que las cepas salvajes que contienen no sean productoras de cobalamina o que su concentración sea tan ínfima que no se pueda detectar con el
 10 método microbiológico del VitaFast.

De los demás productos analizados, únicamente se obtuvieron cepas productoras de cobalamina de 6 masas madre (**Tabla 1**). En 2005, Corsettiet *al.* aisló e identificó una nueva especie de lactobacilo, denominada *Lactobacillus rossiae* DSM 15814, a
 15 partir de una masa madre italiana en el trascurso de un estudio en el que se pretendía analizar la producción de sustancias antimicrobianas por las BAL presentes. Las masas madre son consideradas ecosistemas complejos en los que las bacterias ácido lácticas son los microorganismos prevalentes. De todas esas bacterias, el género *Lactobacillus* es el responsables de la acidificación de la masa, por ese motivo es un
 20 buen producto base a partir del cual aislar diferentes cepas de este microorganismo. Más tarde, De Angeliset *al.* (2014) realizó un análisis genómico completo (incluyendo anotación genómica, análisis comparativos y reconstrucción de vías metabólicas) de *Lactobacillus rossiae* DSM 15814 y descubrió el *cluster* genético presuntamente involucrado en la biosíntesis de la cobalamina. Además, para demostrar esta
 25 capacidad biosintética, realizó un ensayo microbiológico (MBA) utilizando el extracto celular de *Lactobacillus rossiae* para el crecimiento de *Lactobacillus leichmannii* subsp. *lactis*, un microorganismo auxótrofo para la Vitamina B₁₂. A diferencia del estudio presente, De Angelis *et al.* no cuantificó la concentración de vitamina producida, sino que se conformó con el crecimiento del microorganismo auxótrofo. A
 30 parte de la identificación genómica, no se han realizado más análisis para demostrar la presencia de los genes implicados en la biosíntesis de cobalamina en las cepas CECT 9148 y CECT 9224, pero podría formar parte de un futuro proyecto.

Elaboración y optimización de masas madre

En el presente estudio, se decidió realizar un ensayo a escala laboratorio (utilizando matraces Erlenmeyer autoclavados) para ver si las cepas seleccionadas eran capaces de sintetizar cobalamina en un medio de fermentación más complejo al utilizado en el *screening*, como es la mezcla de agua y harina que se utiliza en la elaboración de masas madre. Este tipo de pruebas a escala laboratorio son muy habituales. Por ejemplo, Madhu *et al.* (2010) realizó una fermentación a pequeña escala para comprobar que la cepa de *Lactobacillus plantarum* aislada de *kanjika* (un producto fermentado utilizado como alimento medicinal en la India) producía Vitamina B₁₂. En ese estudio, al medio de fermentación (que contenía macro y micronutrientes) se le añadió glicerol, ya que está demostrado que induce la síntesis de cobalamina. En la fermentación a escala laboratorio llevada a cabo en este estudio, no se añadió ninguna fuente de carbono externa a la propia harina, ya que únicamente estaba pensada para corroborar la producción de Vitamina B₁₂ de las cepas de estudio. En los resultados obtenidos en el estudio de Madhu *et al.* utilizaron otro método analítico y expresaron la concentración en ng de Vitamina B₁₂/gr de biomasa seca. Chamlagain *et al.* (2015) realizó una prueba similar a la realizada en este estudio. Este grupo utilizó dos matrices de dos cereales (centeno y cebada) como medio de fermentación, pero, a diferencia de la utilizada aquí, fueron previamente procesadas (cocinadas durante 2 minutos en agua hirviendo y autoclavadas). Además, el microorganismo que utilizó fue *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii* en lugar de *Lactobacillus reuteri*. El resultado de cianocobalamina que obtuvo fue de 28,80 ng/gr (28,8 µg/100gr) en la masa de centeno y 25,00 ng/gr (25 µg/100gr) en la de cebada, valores superiores a los obtenidos en el presente estudio (**Tabla 2**).

Una vez corroborada la producción de Vitamina B₁₂ en una masa madre a pequeña escala, se elaboraron varias masas madre a escala planta piloto. Al ver que los resultados de cianocobalamina obtenidos sin agregar ninguna fuente de carbono exógena eran tan bajos, se decidió optimizar la fermentación, como habían hecho otros autores en estudios anteriores. Mohammed *et al.* (2014) describió la capacidad de *Lactobacillus reuteri* de producir una forma activa de Vitamina B₁₂ optimizando las condiciones de fermentación. En ese estudio se añadió ácido δ-aminolevulínico (precursor crítico en el inicio de la ruta biosintética) y 5,6-dimetilbenzimidazol (el α-ligando inferior responsable de la producción de la forma activa de la cobalamina). En este estudio se decidió no utilizar esos compuestos químicos para la optimización de la fermentación con la intención de no generar costes adicionales y preservar la

naturalidad del producto. Madhu *et al.*(2010) optimizó la fermentación utilizando como fuente de carbono el glicerol. También en 2010, Hugenschmidt *et al.* utilizó permeado de suero como fuente de carbono en lugar de glucosa en la fermentación que realizó con *Lactobacillus reuteri* y 99 cepas de bacterias propiónicas (PAB) para determinar si
5 eran capaces de sintetizar cobalamina. En un proyecto llevado a cabo por Xia *et al.* (2015) con el fin de desarrollar un medio de fermentación efectivo y económico para la producción industrial de Vitamina B₁₂ (con *P. denitrificans*), se utilizó sirope de maltosa y agua de la maceración del maíz (ambos subproductos de la industria del maíz) como medio de fermentación, siendo el primero una fuente de carbono y el segundo
10 una fuente de nitrógeno. Tras un proceso de 180h Xia *et al.* obtuvo una concentración de $198,27 \pm 4,60$ mg/L de Vitamina B₁₂. Aunque el microorganismo y el propósito de ese estudio difería del aquí presente, resultó muy interesante la posibilidad de utilizar una fuente de carbono efectiva y económica a la hora de optimizar la fermentación en el biorreactor, ya que de esa manera no repercutiría en el precio del producto final elaborado. Por ese motivo se optó por añadir maltosa a la mezcla de fermentación.
15 Xia *et al.*(2015) utilizó el sirope de maltosa como única fuente de carbono, de ahí su elevada concentración en el medio (80,3%). En este estudio, sin embargo, únicamente se añadió un 3% para comprobar si se producía una mejora en la cantidad de cobalamina sintetizada. Tras una fermentación de 48h (**Tabla 3**), se
20 obtuvo un resultado inferior al obtenido en el estudio de Xia *et al.* (2015). Esta diferencia puede ser debida a varios factores: la utilización de otro microorganismo diferente a *Lactobacillus reuteri*, la elevada proporción de maltosa utilizada o la duración del proceso (180h).

25 En el presente estudio también se optimizó el pH de la fermentación. Hasta el momento, en todas las fermentaciones realizadas se producía una bajada drástica del pH, pasando de valores cercanos a la neutralidad a una acidez importante (**Tabla 3**). Aunque la bajada del pH es normal en la fermentación de masas madre, puede causar la degradación de la cobalamina, ya que es sensible a cambios de pH. Xia *et al.* (2015) demostró que el uso de la maltosa como fuente de carbono en lugar de
30 glucosa producía una menor disminución del pH, manteniéndose en un rango estable cercano a 6,5. Edelmann *et al.* (2016) estudió la estabilidad de la Vitamina B₁₂, tanto añadida como producida *in situ* por *Propionibacterium freudenreichii* en la elaboración del pan. El extracto de malta que utilizó Edelmann *et al.* en la elaboración de masa
35 madre también resultó una menor bajada del pH, manteniéndose en valores cercanos

a 5. Debido a esos resultados, se decidió mantener durante las 48h de fermentación el pH a 5, suministrando de manera automática y constante una solución de KHCO_3 0,1 M. Se utilizó esta base y no NaOH para evitar un incremento del sodio en la masa madre y que esta sal no afectara a las cepas de estudio.

5

Elaboración de pan fortificado con Vitamina B₁₂

La principal fuente de Vitamina B₁₂ se encuentra en alimentos de origen animal, como la carne, el pescado, la leche y los huevos. Una dieta omnívora (conocida
10 comúnmente como “dieta variada”) asegura la ingesta de una cantidad de Vitamina B₁₂ suficiente como para cubrir las necesidades diarias (CDR = 2,5 µg/día). El déficit de Vitamina B₁₂ puede causar diferentes manifestaciones patológicas, afectando al sistema hematopoyético, al neurológico e incluso al sistema cardiovascular. Un tipo de deficiencia más severa es la anemia perniciosa, una patología causada por la falta
15 de producción de una glicoproteína que facilita la absorción de la vitamina en el intestino delgado. Se ha demostrado que la administración oral de la cepa *Lactobacillus reuteri* CRL1098 ayuda a prevenir síntomas causados por esta hipovitaminosis. Existen varios grupos poblacionales con elevado riesgo de padecer patologías derivadas de una deficiencia de Vitamina B₁₂. Entre estos encontramos a
20 las personas veganas y vegetarianas, que no consumen ningún alimento de origen animal (excepto los lacto-ovo-vegetarianos, que consumen leche, derivados lácteos y huevos). Otro grupo muy propenso a padecer esta deficiencia es el formado por las personas en edad avanzada (se ha estimado que entre el 10 y 30% de la población de más de 50 años tiene una capacidad de absorción de cobalamina
25 reducida). Finalmente, las personas que viven en países con un bajo consumo de productos de origen animal también están expuestas a esta deficiencia.

Debido a la ingesta insuficiente por los grupos de riesgo mencionados, algunas instituciones recomiendan el uso de suplementos vitamínicos y/o alimentos
30 enriquecidos con cianocobalamina, lo que supone un gasto adicional para esas personas. Según Pawlak *et al.* (2013), en Estados Unidos, muchos cereales y la leche de soja están fortificados con esta vitamina. La fortificación de estos alimentos viene dada por la adición de cianocobalamina, que es sintetizada a escala industrial en unos fermentadores para posteriormente ser purificada y añadida al alimento deseado. El
35 uso de microorganismos productores de Vitamina B₁₂ durante el proceso de

fermentación de algunos alimentos es una alternativa de fortificación más natural que se está estudiando en la actualidad.

Descripción de los dibujos

5

Para complementar la descripción que se está realizando, y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte integrante de la misma la figura 1 que muestra un gráfico con la concentración de Vitamina B₁₂ en los diferentes niveles de escalado de *Lactobacillus reuteri* DSM, *Lactobacillus reuteri* JCM, *Lactobacillus reuteri* CECT 9148 y *Lactobacillus reuteri* CECT 9224.

10

Realización preferente de la invención

15

Como conclusión a todas las pruebas del estudio realizado que se han detallado, una realización preferente de la invención sería la referente al uso de las dos cepas de aisladas de la especie *Lactobacillus reuteri* CECT 9148 y *Lactobacillus reuteri* CECT 9224 juntas o separadas indistintamente para su utilización en masas madres panarias.

20

Asimismo se procedería a la fabricación de pan a través de la inclusión de masa madre o *sourdough* producida por medio de estas cepas en la fabricación de cualquier producto alimenticio considerado alimento funcional o complemento nutricional y/o farmacéutico mediante la fuente concentrada de Vitamina B₁₂ para su ingestión o administración oral mediante el uso de estas cepas de *Lactobacillus reuteri* CECT 9148 y CECT 9224.

25

El proceso para la elaboración de las masas madre enriquecidas en Vitamina B₁₂ y el posterior uso de estas masas madre para la fabricación de pan o de alimento enriquecidos en Vitamina B₁₂ comprende los siguientes apartados:

30

- a) Preparación de inóculo de las cepas de *Lactobacillus reuteri* CECT 9148 y/o *Lactobacillus reuteri* CECT 9224 a 37°C durante 48h.

- b) Propagación en un medio de cultivo de las cepas de *Lactobacillus reuteri* CECT 9148 y/o *Lactobacillus reuteri* CECT 9224 a 37°C durante 48h para la obtención de la biomasa o pellet celular.
- c) Resuspensión o inoculación de la biomasa obtenida en sustratos o disoluciones harinosas (masas madre).
- d) Fermentación de los sustratos o disoluciones harinosas inoculados.

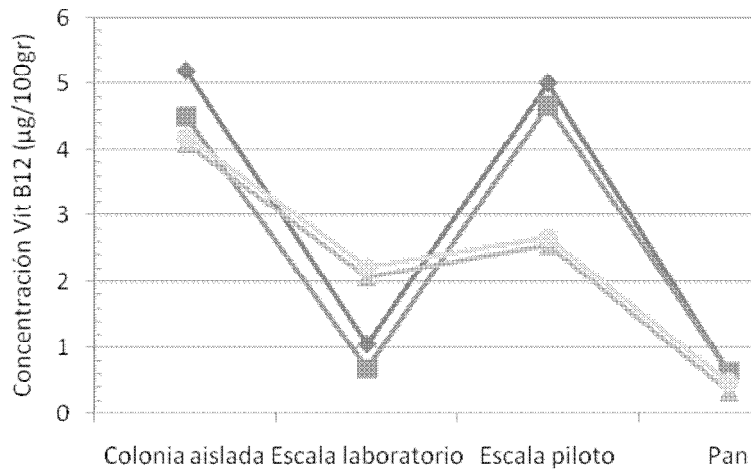
5

10

Reivindicaciones

- 1.- Nuevas cepas de la especie *Lactobacillus reuteri* para su utilización en masas
5 madres panarias caracterizadas por que las cepas CECT 9148 y CECT 9224 son de
Lactobacillus reuteri.
- 2.-Uso de las cepas de la reivindicación 1 para la fabricación de pan como alimento
10 funcional a través de la inclusión de masa madre o *sourdough* producida por medio de
estas cepas.
- 3.- Uso de las cepas de la reivindicación 1 para la fabricación de cualquier producto
alimenticio considerado alimento funcional o complemento nutricional y/o farmacéutico
15 mediante la fuente concentrada de Vitamina B₁₂ para su ingestión o administración
oral.
- 4.- Uso de las cepas según la reivindicación 1 para la elaboración de masas madre
enriquecidas en Vitamina B₁₂ mediante un proceso que comprende los siguientes
20 apartados:
- a) Preparación de inóculo de las cepas de *Lactobacillus reuteri* CECT 9148
y/o *Lactobacillus reuteri* CECT 9224 a 37°C durante 48h.
 - b) Propagación en un medio de cultivo de las cepas de *Lactobacillus reuteri*
CECT 9148 y/o *Lactobacillus reuteri* CECT 9224 a 37°C durante 48h para
la obtención de la biomasa o pellet celular.
 - 25 c) Resuspensión o inoculación de la biomasa obtenida en sustratos o
disoluciones harinosas.
 - d) Fermentación de los sustratos o disoluciones harinosas inoculados.

30



L. reuteri DSM (◆), *L. reuteri* JCM (■), *L. reuteri* 9148 (▲) y *L. reuteri* 9224 (●).

Fig. 1



②¹ N.º solicitud: 201631584

②² Fecha de presentación de la solicitud: 13.12.2016

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CO 5700171 A1 (CONSEJO NAC INVEST CIENT TEC CONICET) 30/11/2006, Todo el documento; en particular, reivindicaciones.	1-4
X	WO 2011154820 A2 (PROBIOTICAL SPA et al.) 15/12/2011, Todo el documento; en particular, reivindicación 3.	1-4
A	VARMANEN PEKKA et al. Letter to the editor on 'Enhancing vitamin B-12 content in Soy-yogurt by <i>Lactobacillus reuteri</i> , IJFM. 206:56-59'. International Journal of Food Microbiology (JUL 2016) vol: 228 Pagina: 33, ISSN 0168-1605 (print) ISSN 1879-3460 (electronic), doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.029	1-4
A	MOHAMMED Y et al.: "Capability of Lactobacillus reuteri to Produce an Active Form of Vitamin B12 under Optimized Fermentation Conditions", Journal of Academia and Industrial Research (JAIR), (2014), Vol. 2, (11), pp.: 617-621, en ResearchGate [online]. [Recuperado el 22/02/2017]. Recuperado de Internet: https://www.researchgate.net/publication/274951979 <u>Capability of Lactobacillus reuteri to Produce an Active Form of Vitamin B12 under Optimized Fermentation Conditions</u>	1-4

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 n.º:

Fecha de realización del informe
24.02.2017

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (2006.01)

A21D8/04 (2006.01)

C12P19/42 (2006.01)

A23L33/135 (2016.01)

A61K35/747 (2015.01)

C12R1/225 (2006.01)

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

C12N, A21D, C12P, A23L, A61K, 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, EMBASE, BIOSIS, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.02.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	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	CO 5700171 A1 (CONSEJO NAC INVEST CIENT TEC CONICET)	30.11.2006
D02	WO 2011154820 A2 (PROBIOTICAL SPA et al.)	15.12.2011
D03	VARMANEN PEKKA et al. Letter to the editor on 'Enhancing vitamin B-12 content in soy-yogurt by <i>Lactobacillus reuteri</i> , IJFM. 206:56-59'. International Journal of Food Microbiology JUL 2 2016 00/07/2016 VOL: 228 Paginas: 33 ISSN 0168-1605 (print) ISSN 1879-3460 (electronic) doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.029	Julio 2016
D04	MOHAMMED Y et al.: "Capability of <i>Lactobacillus reuteri</i> to Produce an Active Form of Vitamin B12 under Optimized Fermentation Conditions", Journal of Academia and Industrial Research (JAIR), (2014), Vol. 2, (11), pp.: 617-621, en ResearchGate [online]. [Recuperado el /02/2017]. Recuperado de Internet: https://www.researchgate.net/publication/274951979 <u>Capability of <i>Lactobacillus reuteri</i> to Produce an Active Form of Vitamin B12 under Optimized Fermentation Conditions</u>	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 solicitud reivindica dos cepas de la especie *Lactobacillus reuteri* (CECT 9148 y CECT 9224) capaces de producir vitamina B12 también conocida como cobalamina. La solicitud reivindica asimismo el uso de estas cepas para la fabricación de pan mediante la inclusión en la masa madre de dichos microorganismos (reivindicaciones 2 y 4) y su uso en la elaboración de alimentos funcionales ricos en vitamina B12, complementos nutricionales y/o farmacéuticos (reivindicación 3).

D01-D04 representan el estado de la técnica anterior.

D01 reivindica una cepa de *Lactobacillus reuteri* (CRL 1098, DSMZ 15599) capaz de producir cobalamina y divulga su uso en la fabricación de alimentos que se quieren enriquecer en dicha vitamina. Dentro de estos últimos se reivindica la adición de esta cepa a harinas productos derivados de los cereales.

D02 describe el uso de tres cepas de *Lactobacillus reuteri* (ATCC 55730, DSM 17938 y DSM 16143) en la elaboración de alimentos, suplementos alimenticios y composiciones farmacéuticas. Estas cepas son capaces de producir cobalamina.

D03 y D04 hacen referencia al potencial que encierra el uso de cepas de *Lactobacillus reuteri* productoras de cobalamina en la elaboración de alimentos fortificados o enriquecidos en dicha vitamina.

Ninguno de los documentos citados en el estado de la técnica describe una cepa con el mismo número de depósito que la de la reivindicación 1 por lo que se considera que dicha cepa es nueva.

Los documentos del estado de la técnica muestran la existencia de cepas de *Lactobacillus reuteri* productoras de vitamina B12 o cobalamina. En dos de ellos se utilizan dichas cepas para enriquecer o fortificar distintos alimentos y/o complementos farmacéuticos.

Se considera a D01 como el más cercano. Al igual que la solicitud, el problema técnico que plantea es el de enriquecer alimentos y/o complementos farmacéuticos con vitamina B12. La forma de solucionar dicho problema es la misma en ambos casos, utilizar cepas de *Lactobacillus reuteri* productoras de dicha vitamina y añadirlo al alimento y/o al complemento farmacéutico. La diferencia entre la primera reivindicación de la solicitud y el documento D01 es que se mencionan distintas cepas de la misma especie. Sin embargo, las nuevas cepas seleccionadas en la solicitud tienen las mismas características que la cepa citada en D01. Se trata de cepas de la misma especie (*Lactobacillus reuteri*) con capacidad de producir vitamina B12 o cobalamina. Por tanto solucionan el mismo problema de forma equivalente.

En principio, y salvo que las cepas seleccionadas en la invención tengan un efecto sorprendente (p. ej.: que produzcan de forma clara, en las mismas condiciones de cultivo, más cobalamina que la seleccionada en D01), se considera que dichas cepas, son cepas alternativas a las ya existentes y que, por tanto, su obtención y selección carece de actividad inventiva.

De la misma forma, se considera que las reivindicaciones 2 a 4, que se refieren a usos de las cepas, se derivan de manera evidente a partir de lo divulgado en D01 (utilización para enriquecer con cobalamina alimentos y complementos nutricionales y/o farmacéuticos), por lo que dichas reivindicaciones no cumplen el requisito de actividad inventiva a la luz del documento D01.

El mismo razonamiento se aplica a D02.

Así pues, se considera que las reivindicaciones 1-4 de la solicitud cumplen el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986, pero no el de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986.