

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 614**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

A61K 36/064 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 35/744 (2015.01)

A61K 35/741 (2015.01)

A61K 35/745 (2015.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A23L 33/135 (2006.01)

A23L 33/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2012 PCT/FR2012/052859**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13088045**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2012 E 12818796 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2791313**

54 Título: **Composición que comprende una biomasa microbiana activa**

30 Prioridad:

16.12.2011 FR 1103902

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

15.01.2018

73 Titular/es:

**LESAFFRE ET COMPAGNIE (100.0%)
41, rue Etienne Marcel
75001 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LEJEUNE, PASCAL y
SOUICI, JEAN-BERNARD**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 649 614 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende una biomasa microbiana activa

5 La invención se refiere al campo de las composiciones alimentarias que comprenden una masa microbiana, a un procedimiento para su preparación así como a activadores de fermentación o "iniciadores", y más particularmente al campo de la panificación, de la lechería y/o de los complementos alimentarios de tipo "probiótico" que comprenden dichas composiciones.

La presente invención se refiere de forma general a una composición mejorada producida mediante un procedimiento de pulverización -también denominado en adelante "esprayado"- de un alto índice de biomasa microbiana, en particular de biomasa bacteriana, sobre un soporte.

10 Dicho soporte de la composición según la invención es principalmente un soporte de tipo granular (por ejemplo, gránulos o esferoides), especialmente apto para mantener una alta viabilidad de la biomasa microbiana y una buena conservación de esta viabilidad a lo largo del tiempo (preservación/persistencia de la viabilidad). Dicha composición, que comprende microorganismos vivos, en particular bacterias pulverizadas sobre dicho soporte, en las condiciones habituales de utilización de la técnica se utiliza generalmente como iniciador/masa madre en forma de polvos secos.

15 El campo técnico que se pretende en la presente invención es en particular el de una composición secada según un procedimiento perfeccionado y adaptado a la producción de una biomasa microbiana viva en forma seca a partir de un soporte de tipo granular apto para ser recubierto de forma regular por una biomasa microbiana concentrada, pudiendo representar dicha biomasa de 10 a 30% de materia seca de la materia seca total del soporte recubierto.

20 Las dos principales técnicas de conservación de biomasa bacteriana viva en forma seca son la liofilización y la pulverización sobre soporte.

La patente EP 0636692 A1 de la solicitante describe una "Biomasa estable a base de células de levaduras y de bacterias lácteas y procedimiento de preparación".

La liofilización es una técnica cara, compleja y los rendimientos de secado a veces son bajos en función de las cepas y de las técnicas utilizadas.

25 La pulverización o esprayado de bacterias sobre soporte también es conocido de la patente EP 0636692 A1. Pero, estas técnicas siguen siendo limitadas en cuanto a la cantidad de biomasa que se puede depositar sobre el soporte [inferior a 0,5% MS P/P en el caso de EP 0636692 A1, por encima de este valor se observa aglomeración (apelmazamiento) del polvo y una pérdida de viabilidad en conservación] lo que limita por consiguiente las prestaciones de las composiciones anteriores producidas de esta manera.

30 Las biomazas microbianas comercializadas actualmente como iniciadores para masas madre se obtienen bien por pulverización, bien por mezcla de una gran cantidad de liofilizado y de gránulos de levadura o bien por mezcla de una gran cantidad de liofilizado con un soporte disolvente y se conservan en ausencia de oxígeno a -20°C, para tener una duración de vida de 2 años. En ausencia de estas condiciones de conservación, la duración de utilización de los iniciadores no excede de 3 meses.

35 Las operaciones de mezcla, la necesidad de una atmósfera sin oxígeno, la utilización de una película de embalaje estanco tipo "cuadruplex" y el modo de conservación son otros tantos parámetros que todavía resultan difíciles de controlar, en algunos países en particular en lo que se refiere al respeto de la cadena del frío. Esto acarrea problemas de calidad sin hablar de los temas de costes industriales y medioambientales que hay que tener en cuenta.

40 Esto también supone otro problema que es recurrente y que está ligado a la forma actual de los iniciadores para masas madre, como el de la existencia de un tiempo de latencia importante durante el sembrado de la harina de masa madre, provocando a la vez una prolongación de los tiempos de fermentación, una variabilidad de la duración de la masa madre y un riesgo de desarrollo de la flora no controlada de la harina.

45 El conjunto de estos problemas limita el desarrollo de la aplicación de los iniciadores/masas madre en panificación mientras que su utilización permite la producción de panes de alta calidad aromática y nutricional.

Más recientemente, se ha podido utilizar también la biomasa bacteriana viva como probiótico, con los problemas ligados por una parte a la necesidad de una alta concentración de biomasa viva y por otra parte a la supervivencia de los microorganismos después del paso por el estómago y su pH muy ácido.

Por otra parte, los inventores han observado que:

50 - las composiciones del estado de la técnica presentan una heterogeneidad debido a la presencia de aglomerados y en consecuencia una dificultad de manipulación de estas composiciones que forman aglomerados;

- las composiciones anteriores presentan tiempos de latencia altos que conllevan tiempos de masa madre altos- generalmente de 16 horas a 24 horas y que necesitan, por lo tanto, la utilización de instalaciones de grandes dimensiones para efectuar estas fermentaciones; por otra parte, estos tiempos elevados aumentan sensiblemente el riesgo de desarrollo de una flora no deseable que puede generar perturbaciones en el gusto, problemas de panificación incluso el desarrollo de bacterias patógenas;
- las composiciones anteriores tal como se han descrito en la patente EP 0636692 A1 permiten alcanzar, inmediatamente después de su producción, por lo tanto sin conservación, un pH de 5,7 en 3 horas en prueba de acidificación, lo que es insuficiente; se busca una acidificación para alcanzar un pH generalmente inferior a 5,4 después de un año de conservación a 20°C.

10 Resumen de la invención

La presente invención se propone resolver los problemas enunciados anteriormente y superar las dificultades mencionadas aquí y encontradas en las composiciones anteriores.

Los inventores han demostrado que, en efecto, todavía existe la necesidad de una composición de productos secos a base de un soporte apto para ser recubierto y que permita que se pulverice en él una concentración muy alta de bacterias vivas, pudiendo utilizarse dicha composición principalmente como activador de fermentación/iniciador o probiótico.

En este sentido dicha composición se mejora de forma que permita una protección efectiva de las bacterias vivas pulverizadas sobre dicho soporte en particular frente a una serie de "estrés" del tipo "estrés de temperatura" - conservándose dicho iniciador a una temperatura positiva incluso a temperatura ambiente-, "estrés ácido" -en particular en la aplicación probiótica, corresponde a la resistencia al pH gástrico- y "estrés de oxígeno" -durante la conservación al aire.

La presente invención también pretende satisfacer esta necesidad expresada durante mucho tiempo de una composición que presente las calidades mencionadas anteriormente.

La presente invención se refiere a una composición que comprende un soporte apto para ser recubierto de forma regular por una biomasa microbiana, preferentemente de concentración muy alta, representando dicha biomasa porcentajes muy elevados de bacterias en materia seca de la materia seca total del soporte recubierto.

La invención se refiere más particularmente a una composición que comprende un soporte apto para ser recubierto de forma regular por una biomasa microbiana, representando dicha biomasa de 10 a 30% en materia seca de la materia seca total del soporte recubierto.

La invención también se refiere a un procedimiento de preparación de una composición que comprende las siguientes etapas que consisten en:

- i. introducir un soporte apto para ser recubierto en un mezclador atravesado por una corriente ascendente de aire caliente,
- ii. pulverizar una suspensión de biomasa microbiana que comprende más de 5% de materia seca de bacterias (P/P),
- iii. secar por corriente de aire caliente cuya temperatura y caudal están fijados de forma que la temperatura de dicha composición no sobrepase 40°C,
- iv. recuperar un soporte recubierto, y
- v. obtener dicha composición.

La invención también se refiere a un "activador de fermentación" o "iniciador" que comprende la composición de la invención o tal como se obtiene según el procedimiento de la invención, en particular de tipo fermento panario o de tipo fermento de vinificación o incluso de tipo fermento lácteo.

La invención también se refiere a un "probiótico" que comprende la composición de la invención o tal como se obtiene según el procedimiento de la invención.

La Figura 1 representa los resultados de una prueba de acidificación realizada con una composición preferida de la invención, la SPRAY_A, que se ha conservado 1 año a 20°C en aire (A1) y a vacío (V1) por comparación con los obtenidos con una composición testigo (T) comercial y conservada en las mejores condiciones, es decir -20°C a vacío. La Figura 1 describe la evaluación del pH en función del tiempo de conservación en meses.

La Figura 2 representa los resultados de una prueba de acidificación realizada con una composición preferida de la invención, la SPRAY_C llamada prueba de "sobrepulverización" que se ha conservado 1 año a 20°C en aire (A2) y a vacío (V2) por comparación con los obtenidos con un testigo (T) comercial y conservado en las mejores condiciones, es decir -20°C a vacío. La Figura 2 describe la evaluación del pH en función del tiempo de conservación en meses.

Descripción detallada de la invención

La invención tiene como objetivo una composición tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

5 En la presente invención se describe una composición que comprende un soporte apto para ser recubierto de forma regular por una biomasa microbiana, representando dicha biomasa de a 10 a 30% en materia seca de la materia seca total del soporte recubierto.

10 Los inventores de la presente invención han dedicado especialmente sus esfuerzos a desarrollar una composición mejorada que comprende una biomasa que es estable y eficaz y han desarrollado un procedimiento de preparación específico de dicha composición de forma que responda favorablemente a criterios particularmente discriminantes y significativos en los campos de aplicación que se contemplan y citados anteriormente.

La eficacia de las composiciones según la invención se controla mediante pruebas específicas que los inventores han puesto a punto para algunas de ellas y utilizados durante sus investigaciones.

Estas pruebas, en adelante denominadas "pruebas de evaluación", se centran en torno a la viabilidad y eficacia acidificante de las composiciones en particular:

- 15
- la prueba de acidificación por observación de la bajada del pH en 3 horas de un medio a base de maltosa + sales minerales realizada a 35°C después de sembrado de una cantidad determinada de la composición;
 - la determinación de la viabilidad bacteriana por medida del número de colonias bacterianas que se desarrollan en un medio estándar por dispersión de una disolución que contiene una cantidad conocida de la composición.

20 Los tiempos de exposición al calor en el transcurso de la fabricación de la composición de la invención también es un parámetro que se tiene en cuenta.

Los inventores han efectuado a continuación medidas de los parámetros de conservación de dicha composición después de su producción según el procedimiento de la presente invención definiendo así porcentajes de preservación/persistencia de la viabilidad y de la eficacia acidificante.

25 Se han realizado así una serie de pruebas de conservación en la composición de la invención en diferentes condiciones principalmente de temperatura, exposición al aire y duración. En particular, se han realizado pruebas de eficacia de dicha composición. En particular son las siguientes pruebas:

- 30
- al aire y a vacío a -20°C (temperatura de almacenamiento de referencia para este tipo de producto)
 - al aire y a vacío a 4°C, y
 - al aire y a vacío a temperatura ambiente (20°C).

También se han determinado:

- 35
- la cantidad final de materia seca añadida de tipo bacterias en la composición por gránulo formado (MS bacterias/g de composición). (Recordatorio: esta cantidad depende de la tasa de pulverización);
 - la humedad final de la composición de la invención;
 - la distribución granulométrica (granulometría laser) del soporte de la composición según la invención.

La composición descrita en la invención presenta las siguientes características complementarias o alternativas:

- 40
- preferentemente, dicha biomasa representa de 13 a 26% en materia seca de la materia seca total del soporte recubierto;
 - el soporte recubierto comprende además ventajosamente una capa de protección que comprende al menos un compuesto elegido entre los hidrocoloides, gomas, dextrinas principalmente las maltodextrinas, los poli-, di- o monosacáridos y sus derivados;
 - dicho soporte se presenta de forma preferida en forma de gránulos y/o esferoides;
 - dichos esferoides presentan preferentemente un diámetro medio d(0,5) comprendido entre 150 y 2.000 µm, preferentemente entre 150 µm y 1.200 µm y todavía más preferentemente entre 150 µm y 700 µm;
 - 45 • dichos gránulos presentan ventajosamente una longitud media comprendida entre 1,8 y 2,2 mm y un diámetro medio comprendido entre 0,4 y 0,7 mm;
 - dicho soporte se elige de forma ventajosa entre las levaduras secas activas y las sémolas de cereales;
 - dichas levaduras presentan preferentemente una tasa de materia seca superior a 94%, preferentemente superior a 96%, teniendo dichos gránulos de levadura de forma ventajosa un efecto beneficioso como
 - 50 • absorbedor de humedad;
 - dichas sémolas presentan preferentemente una tasa de humedad inferior o igual a 8%.

De forma ventajosa, dichas levaduras son del género *Saccharomyces* que comprenden preferentemente la especie *S. chevalieri*.

5 La biomasa microbiana comprende al menos bacterias elegidas en el grupo formado por bacterias que pertenecen a uno de los siguientes géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* y *Bacillus*.

Dichas bacterias se eligen ventajosamente en el grupo que comprende: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus amylovorum*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus acidilactici*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoc oenos*, *Leuconostoc mesenteroïdes* y *Bacillus subtilis*.

10 El soporte recubierto comprende preferentemente además una capa que consiste en una crema de levadura pulverizada sobre él, preferentemente una crema de *S.chevalieri*, formando una capa protectora. Se observa entonces una mejora en la protección de las bacterias durante la prueba de conservación al aire.

15 La composición presenta ventajosamente una tasa de mortalidad bacteriana inferior o igual a 0,5 Log U.F.C./g después de una conservación de un año a una temperatura de 20°C a vacío y/o después de una conservación de un año a una temperatura de 4°C al aire.

Preferentemente la composición presenta, después de 1 año de conservación a una temperatura positiva incluso a temperatura ambiente, durante una prueba de acidificación en un medio de maltosa, una disminución de pH de 6,5 a al menos 5,7 después de solamente 3 horas.

20 Ventajosamente, la composición según la invención y que comprende un soporte que consiste en levaduras secas activas comprende además al menos un aditivo, o auxiliar tecnológico, llamado de secado que, de forma ventajosa, se elige en el grupo que comprende mono- y diglicéridos de ácidos grasos modificados, ésteres de ácidos grasos y sorbitán, tal como el monoestearato de sorbitán, ésteres ácidos grasos y glicerol, ésteres de ácidos grasos y propilenglicol, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y/o una mezcla de estos últimos.

25 La presente invención también tiene como objetivo un procedimiento de preparación tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.

El procedimiento de preparación descrito en la invención comprende las siguientes etapas que consisten en:

- 30
- i. introducir un soporte apto para ser recubierto en un mezclador atravesado por una corriente ascendente de aire caliente,
 - ii. pulverizar una suspensión de biomasa microbiana que comprende más de 5% en materia seca de bacterias (P/P),
 - iii. secar por corriente de aire caliente cuya temperatura y caudal están fijados de forma que la temperatura de dicha composición no sobrepase 40°C,
 - iv. recuperar un soporte recubierto, y
 - v. obtener dicha composición.

35 El mezclador que se ha utilizado en la etapa (i) es ventajosamente un lecho de aire fluidizado (LAF) que permite un "esprayado" y un secado simultáneos, asegurando de esta forma una protección por recubrimiento. Por otra parte este procedimiento favorece una mejor conservación de la composición según la invención que es más estable con el paso del tiempo, sobre todo teniendo en cuenta una mejor preservación de la viabilidad de la biomasa, incluso a temperatura ambiente.

40 El procedimiento descrito en la invención presenta también las siguientes características complementarias o alternativas:

- 45
- Preferentemente, el contenido de materia seca de bacterias pulverizadas en la etapa (ii) del procedimiento está comprendido entre 10 y 26% y preferentemente entre 13 y 26% en materia seca de la materia seca total de la composición (P/P).
 - Las etapas i y iii del procedimiento son preferentemente simultáneas.
 - El procedimiento comprende además ventajosamente una etapa en el transcurso de la cual el soporte recubierto es revestido por pulverización con una crema de levadura y/o por uno o varios compuestos elegidos entre el grupo formado por hidrocoloides, tales como goma arábiga, goma de algarroba, goma guar, gellan, xantano, alginato, celulosa; almidones tales como almidón natural, almidón pregelatinizado,
 - 50 almidones modificados; dextrinas tales como maltodextrinas; mono- y disacáridos tales como glucosa, trehalosa, sacarosa; solos o en mezcla.
 - Esta "sobrepulverización" por depósito de capa protectora permite mejorar la conservación en las condiciones al aire y a 20°C, en particular el "estrés de oxígeno" que sufre la composición de la invención está muy reducido debido a esta protección.

Además, la presente invención tiene como objetivos un activador de fermentación de tipo "iniciador" tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 17, 19 a 21, y un probiótico tal como se describe en la reivindicación 18.

La presente invención también describe:

- 5
- un "activador de fermentación" o "iniciador" que comprende la composición de la invención o tal como se obtiene según el procedimiento de la invención, en particular de tipo fermento panario o de tipo fermento de vinificación o incluso de tipo fermento lácteo y
 - un "probiótico" que comprende la composición de la invención o tal como se obtiene según el procedimiento de la invención.
- 10 En particular la invención procura una composición con propiedades de interés particularmente deseadas en la técnica.

15 En efecto, las investigaciones de los inventores han permitido el desarrollo de una composición que comprende un soporte que permite aumentar de una forma sorprendente la biomasa microbiana viva que es pulverizada sobre él para alcanzar una concentración microbiana principalmente bacteriana todavía no alcanzada nunca hasta el día de hoy permaneciendo dicha composición estable con el tiempo. Los inventores también han observado, de forma sorprendente, una mejora sustancial de la eficacia acidificante de dicha composición en relación con los productos equivalentes existentes, así como una excelente supervivencia, incluso después de 1 año de conservación a temperatura ambiente o de conservación al aire.

Ejemplos de realización

20 La presente invención se va a describir ahora en detalle en sus otras características y ventajas por medio de ejemplos de realización dados a modo puramente ilustrativo y no limitativo y con referencia a las tablas y dibujos anexos.

I. Materiales y métodos

Pruebas de evaluación

25 **A] Prueba de acidificación con maltosa**

1) Material y reactivo:

- Vaso de precipitado de 250 ml

- Baño maría con sistema de agitación, temperatura establecida a 35°C

- pH-metro con registrador

30 - Medio maltosa + sales:

Ingrediente	(g)
Agua destilada	1.000
Maltosa, H ₂ O	28,25
K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,37
MnSO ₄ , H ₂ O	0,055

Si no se utiliza durante el día, este medio debe ser esterilizado.

- HCl 1 N.

2) Modo de operación medio maltosa + sales:

35 - Poner el baño maría a calentar a 35°C

- Calibrar el pH-metro con los tampones de pH y las sondas de temperatura

- Poner 150 ± 0,1 g de medio en el vaso de precipitado de 250 ml

- Introducir el vaso de precipitado en el baño maría, colocar una barra imantada de 25 mm, e
 - Iniciar la agitación a 500 r.p.m.
 - Colocar el electrodo del pH-metro en el medio
 - Pesar la muestra:
- 5
- Pesar 1 g de composición o 10 g de testigo para 150 ml de medio
 - Iniciar el cronómetro y anotar el pH inicial
 - Después de 5 minutos, añadir la muestra en lluvia fina evitando la formación de grumos.
 - Esperar ½ hora y añadir el HCl 1N para bajar el pH a $6,20 \pm 0,05$
 - Registrar el pH durante aproximadamente 20 horas y anotar el pH a $t = 3$ horas.
- 10
- B] Prueba de viabilidad**
- 1) Material:
- Medio microbiológico: M.R.S. agar de DIFCO
 - Actidiona al 1,5% esterilizada
 - Disolución de púrpura de bromocresol al 4%
- 15
- Placas de Petri estériles de 90 mm
 - Estufa a 30°C
 - Vasijas anaerobias + bolsas para anaerobiosis Gen-box
 - Pipetas de plástico estériles
 - Extendedores estériles
- 20
- 2) Técnica
- Diluir 1 g de muestra qsp 100 ml de agua estéril
 - Homogeneizar bien; esta preparación es la dilución 10^{-1}
 - Hacer diluciones sucesivas hasta 10^{-9} en tubos de agua estéril
 - Extender 0,1 ml en superficie sobre M.R.S. en placa de Petri con las diluciones adecuadas.
- 25
- 3) Lectura:
- Incubar las placas de Petri en una vasija anaerobia, en una estufa a 30°C durante 24 a 72 horas.
 - Contar el número de colonias aparecidas en las placas y determinar el número de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) por ml (o por g) en función de la dilución.
- C] Medida del pH y de la T.T.A. (Acidez Total Titulable)**
- 30
- Tomar una muestra de $10 \pm 0,1$ g de miga en un vaso de precipitado de 250 ml.
 - Preparar un volumen de 100 ml de agua destilada a temperatura ambiente.
 - Añadir aproximadamente 40 ml de agua destilada en el vaso de precipitado y mezclar hasta homogeneización (si es necesario, por medio de un mezclador de alta velocidad de rotor/estator tipo Ultraturax). Completar con el resto del agua utilizando instrumentos de mezcla para el lavado.
- 35
- Añadir una barra magnética y colocar el vaso de precipitado sobre una placa agitadora.
 - Medir el pH (esperar a la estabilización del pH que debe durar al menos un minuto).
 - Anotar el pH.

- Por medio de una bureta de 15 ml graduada a 0,1 ml, verter una disolución de NaOH N/10 hasta pH = $6,6 \pm 0,1$, esperar 5 minutos, ajustar el pH hasta estabilización a pH $6,6 \pm 0,1$ durante 1 minuto.

- Anotar el volumen añadido de ml (= T.T.A.)

D] Testigo comercial

5 Testigo: Saf Levain LV1, Lesaffre International S.A.R.L. 137 rue Gabriel Péri, 59700 Marcq-en-Baroeul, Francia.

Este iniciador contiene 5×10^9 U.F.C. de bacterias/g de tipo *Lactobacillus casei*.

E] Tipos de soportes granulares

- Levadura Seca Instantánea: Saf Instant S.I.Lesaffre, 137 de la calle Gabriel Péri, 59700 Marcq-en-Baroeul, Francia.
- 10 • Sémola de trigo duro clara fina, biológica (Moulin des moines, Meckert-Diemer S.A., 101, route de Wingersheim, 67170 Krautwiller) sobresecada en secadora de lecho de aire fluidizado, en lotes de 25 kg durante 20 minutos en un flujo de aire de $1.000 \text{ m}^3/\text{h}$ a 78°C .

F] Tipos de bacterias

- *Lactobacillus casei*: CNCM MA43/6V

15 II- Ejemplos

Ejemplo 1: Composición según la invención

Ejemplo 1.1: Preparación de una crema de bacterias

- La cepa de bacteria *Lactobacillus casei* se propaga en un fermentador según un procedimiento clásico, por otra parte, bien conocido, empleando un medio M.R.S. para los precultivos y el cultivo final, tal como se han descrito en "BERGEY'S Manual of systematic bacteriology - Volume 2", SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. y HOLT, J.G. (Eds), WILLIAMS and WILKINS (Publ), 1986, Baltimore.
- 20 • Al final de la fermentación se obtienen concentraciones celulares de aproximadamente 10^{10} U.F.C./ml (U.F.C. = número de células que pueden reproducirse por unidad, en este caso por ml); el mosto de fermentación se centrifuga a continuación para proporcionar una crema de bacterias con aproximadamente 20% de materia seca total y aproximadamente $1,5 \times 10^{11}$ U.F.C./ml.
- 25 • Esta crema se conserva en frío (4°C) en espera de ser utilizada para la siguiente etapa. Este tiempo de espera no excede algunas horas.

Ejemplo 1.2: Preparación del soporte recubierto por pulverización según el procedimiento de la invención de la crema tal como se ha obtenido en el ejemplo 1.1.

- 30 • La crema de bacterias de la etapa 1 se pulveriza sobre el soporte granular de levadura seca instantánea y se seca en una corriente de aire caliente.
- Se introducen 425 g de levadura Saf-Instant al 95,5% de materia seca en un lecho de aire fluidizado Glatt GPCG1.1. El aparato está en configuración Wurster y equipado con una boquilla bi-fluido de pulverización de 0,8 mm en posición *bottom*.
- 35 • Se depositan de esta forma 690 g de crema de bacterias al 22,0% de materia seca sobre el soporte y los parámetros de funcionamiento del aparato (caudal y temperatura del aire de fluidización, caudal de suspensión de pulverización) se eligen de forma que la temperatura del producto, en todo momento de la operación, sea de media $39,2^\circ\text{C}$.
- La duración de la pulverización y del secado en el lecho de aire fluidizado así es de 124 minutos.

40 Ejemplo 1.3: Composición según la invención (soporte + bacterias)

En las condiciones descritas anteriormente se obtiene una composición final denominada "SPRAY_A" al 5,3% de humedad y cuyo contenido de bacterias es de 27,2% de materia seca/materia seca total.

- Dicha composición contiene inicialmente después de secado $5,0 \times 10^{10}$ U.F.C. de bacterias/g.

Resultados

Tabla 1.a.: Población bacteriana del SPRAY_A en conservación a 20°C

	Inicial	3 meses	6 meses	12 meses
	U.F.C./g	U.F.C./g	U.F.C./g	U.F.C./g
Composición conservada al aire	5,0E+10	1,9E+10	2,8E+10	1,1E+10
Composición conservada a vacío	5,0E+10	2,5E+10	8,0E+10	5,6E+10

5 Se observa en la tabla 1.a la pérdida muy baja de población bacteriana viva en conservación durante 1 año a 20°C en conservación al aire y la ausencia de pérdida de biomasa bacteriana viva en conservación a vacío -el aumento aparente de la biomasa en conservación es un artefacto ligado a la incertidumbre del método analítico utilizado.

Tal como se ilustra en la figura 1, se observa una mejor acidificación con la composición "SPRAY_A" de la invención, incluso después de una conservación durante 1 año a una temperatura de 20°C por comparación con el testigo comercial, conservado en las condiciones óptimas (-20°C a vacío) en condiciones de biomasa bacteriana utilizada equivalente.

10 Tal como se indica en la tabla 1.b estos resultados son particularmente ventajosos en comparación con los obtenidos con el testigo (Saf Levain LV1) y esto en condiciones de estrés de temperatura (conservación a 20°C) o de estrés oxidativo (conservación al aire).

Tabla 1.b: Resultados de la prueba de acidificación del SPRAY_A en conservación a 20°C

	Inicial	3 meses	6 meses	12 meses
	pH después de horas	pH después de 3 horas	pH después de 3 horas	pH después de 3 horas
10 g de Testigo	5,7	5,7	5,7	5,7
1 g de composición conservada al aire	4,15	5,15	5,19	5,18
1 g de composición conservada a vacío	4,15	4,72	4,71	4,61

15 Demuestran el interés de la pulverización de una alta tasa de bacterias según el procedimiento de la invención en relación a los procedimientos conocidos, ya que mejora la conservación de la biomasa bacteriana viva y su poder acidificante en condiciones de estrés de temperatura o de presencia de oxígeno.

Hay que destacar que se han obtenido resultados similares con una sémola de trigo duro.

Ejemplo 2: Preparación de una composición "sobrepulverizada" según la presente invención que comprende un soporte recubierto como un soporte y una capa superficial de protección.

20 La crema de bacterias, obtenida según un modo de operación idéntico al de la etapa 1 del ejemplo 1 se pulveriza sobre el soporte granular de levadura seca instantánea y se seca en una corriente de aire caliente. La composición intermedia resultante se recubre a continuación con una capa protectora depositada por sobrepulverización de una suspensión (crema) de levaduras.

Etapla 1: Pulverización de la crema de bacterias (composición SPRAY_B)

25 La composición de sobrepulverización se obtiene en las siguientes condiciones:

Se depositan 935 g de crema de bacterias al 20,6% de materias secas sobre 600 g de soporte Saf-Instant. La operación se efectúa en un lecho de aire fluidizado en las mismas condiciones que en el ejemplo 1.

Se obtiene una composición de pulverización "SPRAY_B" con 5,2% de humedad y cuyo contenido de bacterias es del 25,2% de materia seca/materia seca total.

30 Etapla 2: Sobrepulverización con una crema de levaduras (composición SPRAY_C)

Se introducen 500 g de la composición anterior "SPRAY_B" en el lecho de aire fluidizado Glatt GPCG1.1, dispuesto en configuración Wurster y equipado con una boquilla bi-fluido de pulverización de 0,8 mm en posición *bottom*.

Se sobrepulverizan 235 g de una crema de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) al 24% de materias secas sobre la composición "SPRAY_B" y los parámetros de funcionamiento del aparato (caudal y temperatura del aire de fluidización, caudal de la suspensión de pulverización) se eligen de forma que la temperatura del producto, en cualquier momento de la operación, sea de media 39,0°C. La duración de esta operación es de 37 minutos.

- 5 Se obtiene finalmente una composición "SPRAY_C" protegida por una capa de levaduras cuyo contenido de humedad es de 4,3% y que contiene 22,5% de materia seca/materia seca total.

RESULTADOS

Tabla 2.a.: Población bacteriana del SPRAY_C en conservación

	Inicial	3 meses	6 meses	12 meses
	U.F.C./g	U.F.C./g	U.F.C./g	U.F.C./g
Composición conservada al aire a 4°C	1,5E+10	1,5E+10	2,1E+10	1,6E+10
Composición conservada a vacío a 20°C	1,5E+10	1,1E+10	1,4E+10	1,4E+10

10 En la tabla 2.a Se observa la ausencia de pérdida significativa de población bacteriana viva en conservación durante 1 año a 4°C en conservación al aire y la ausencia de pérdida de biomasa bacteriana viva en conservación a 20°C a vacío.

15 Tal como se ilustra en la figura 2, se observa una mejor acidificación con la composición "SPRAY_C" según la invención, incluso después de una conservación durante 1 año a una temperatura positiva (4°C) por comparación con el testigo comercial, conservado en las condiciones óptimas (-20°C a vacío) en condiciones de biomasa bacteriana utilizada equivalente.

Tal como se indica en la tabla 2.b estos resultados son particularmente ventajosos en comparación con los obtenidos con el testigo (Saf Levain LV1) en condiciones de estrés de temperatura (conservación a 20°C) o de estrés oxidativo (conservación al aire). Estos resultados demuestran el interés de una sobrepulverización como protección de la biomasa de interés.

20 **Tabla 2.b: Resultados de la prueba de acidificación del SPRAY_C en conservación a 4°C**

	Inicial	3 meses	6 meses	12 meses
	pH después de 3 h			
10 g de Testigo	5,7	5,7	5,7	5,7
1 g de composición conservada al aire	4,78	5,19	5,56	5,33
1 g de composición conservada a vacío	4,78	5,09	5,58	5,31

Ejemplo 3: Aplicaciones

Fermento panario

Fabricación de un pan con masa madre a partir de la composición según la invención y descrita en el Ejemplo 1.

- 25 Se realizan dos ensayos de panificación según la fórmula y el procedimiento descrito a continuación.

Ensayo 1: pan de masa madre fabricado con el testigo Saf Levain LV1 con 3 meses de conservación a vacío a -20°C.

Ensayo 2: pan de masa madre fabricado con la composición del Ejemplo 1 con 1 año de conservación a vacío a 20°C (temperatura ambiente).

30

ES 2 649 614 T3

1) Fabricación de las masas madre:

Fórmula	Ensayo 1: Masa madre 1	Ensayo 2: Masa madre 2
Ingredientes	% de harina utilizada	% de harina utilizada
Harina de trigo T55	100	100
Agua	54	54
Sal	1,5	1,5
Saf Levain LV1	0,5	
Composición según el Ejemplo 1		0,05

Estas dos pastas, en adelante denominadas “masa madre” se dejan fermentar durante 20 horas a 30°C.

2) Fabricación de los panes

Composición de la pasta final

	Ensayo 1: Pasta 1	Ensayo 2: Pasta 2
	% de harina utilizada	% de harina utilizada
Harina de trigo T55	100	100
Agua	64	64
Sal	1,8	1,8
Masa madre 1	30	
Masa madre 2		30
Levadura prensada Hirondelle bleue Lesaffre	0,2	0,2

5

Esquema de fabricación

Amasado Artofex

Velocidad lenta (40. r.p.m.)	2 min
Velocidad rápida (60 r.p.m.)	13 min
Temperatura de la pasta	26°C

Punteado

Tiempo	160 min
Temperatura	Ambiente
Humedad	Ambiente

Pesado

Peso	500 g
Tiempo	10 min

10 Expansión

Tiempo	20 min
Temperatura	Ambiente

ES 2 649 614 T3

Humedad	Ambiente
---------	----------

Apresto

Tiempo	3h
Temperatura	Ambiente
Humedad	Ambiente

Cocción en horno de solera

Tiempo	45 min
Temperatura	225°C
Humedad	Niebla: 1+1

5

3) Resultados:

	Volumen específico cm ³ /g	pH de la miga	T.T.A. de la miga ml (10 g)	Apreciación organoléptica
	cm ³ /g		ml (10g)	
Ensayo 1	4,1	4,4	3,4	+++
Ensayo 2	3,9	4,3	4	+++

Estos resultados, juzgados similares tanto a nivel analítico como a nivel de degustación, demuestran el interés de la composición del ejemplo 1 en relación a un testigo comercial. En efecto, aunque conservado durante un año a temperatura ambiente y añadida en una dosis 10 veces menor en relación al testigo (ensayo 1), la composición del ejemplo 1, según la invención, produce un pan de características similares a las de un iniciador comercial conservado solamente 3 meses en condiciones óptimas (-20°C a vacío).

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende una levadura seca activa recubierta de forma regular por una biomasa bacteriana formada por bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, y/o *Bacillus*, representando dicha biomasa de 10 a 30% en materia seca de la materia seca total de la levadura recubierta (P/P).
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha biomasa representa de 13 a 26% en materia seca de la materia seca total de la levadura recubierta.
- 10 3. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada por que la levadura recubierta comprende además una capa superficial de protección que comprende al menos un compuesto elegido entre los hidrocoloides, gomas, dextrina, poli-, di- o monosacáridos y sus derivados.
4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha levadura se presenta en forma de gránulos y/o esferoides.
- 15 5. Composición según la reivindicación 4, caracterizada por que dichos esferoides presentan un diámetro medio $d(0,5)$ comprendido entre 150 μm y 2.000 μm , preferentemente entre 150 μm y 1.200 μm y todavía más preferentemente entre 150 μm y 700 μm .
6. Composición según la reivindicación 4, caracterizada por que dichos gránulos presentan una longitud media comprendida entre 1,8 y 2,2 mm y un diámetro medio comprendido entre 0,4 y 0,7 mm.
- 20 7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la levadura comprende un aditivo, o auxiliar de fabricación, elegido en el grupo formado por los mono- y diglicéridos de ácidos grasos modificados, ésteres de ácidos grasos y sorbitán, tal como el monoestearato de sorbitán, ésteres de ácidos grasos y glicerol, ésteres de ácidos grasos y propilenglicol, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y/o una mezcla de estos últimos.
8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la levadura presenta una tasa de materias secas activas superior a 94%, preferentemente superior a 96%.
- 25 9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la levadura es del género *Saccharomyces* que comprende principalmente la especie *Saccharomyces chevalieri*.
- 30 10. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que las bacterias se eligen en el grupo que comprende las especies: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus amylovorum*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus acidilactici*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoc oenos*, *Leuconostoc mesenteroïdes* y *Bacillus subtilis*.
11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la levadura recubierta comprende además una capa protectora que consiste en una crema de levaduras, preferentemente una crema de *S. chevalieri*.
- 35 12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada por que presenta una tasa de mortalidad bacteriana inferior o igual a 0,5 Log U.F.C./g después de una conservación de un año a una temperatura de 20°C a vacío y/o después de una conservación de un año a una temperatura de 4°C al aire.
13. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada por que presenta después de una conservación a vacío de 1 año a una temperatura de 20°C, durante una prueba de acidificación en un medio de maltosa, una disminución de pH de 6,5 a 5,7 después de 3 horas.
- 40 14. Procedimiento de preparación de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende las siguientes etapas que consisten en:
- i. introducir una levadura apta para ser recubierta en un mezclador atravesado por una corriente ascendente de aire caliente,
 - 45 ii. pulverizar una suspensión de biomasa bacteriana que comprende más de 5% en materia seca de bacterias, estando formada dicha biomasa bacteriana por bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, y/o *Bacillus*.
 - iii. secar por corriente de aire caliente cuya temperatura y caudal están fijados de forma que la temperatura de dicha biomasa no sobrepase 40°C, siendo las etapas (ii) y (iii) simultáneas,
 - iv. recuperar la levadura apta para ser recubierta, y
 - 50 v. obtener dicha composición.
15. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado por que el contenido de bacterias está comprendido entre 10 y 26% en materia seca y preferentemente entre 13 y 26% en materia seca de la materia seca total de la composición (P/P).

- 5 16. Procedimiento según la reivindicación 14 ó 15, caracterizado por que comprende además una etapa en el transcurso de la cual la levadura se recubre por pulverización de una crema de levaduras y/o de un compuesto elegido entre el grupo formado por hidrocoloides, tales como goma arábiga, goma de algarroba, goma guar, gellan, xantano, alginato, celulosa; almidones tales como almidón natural, almidón pregelatinizado, almidones modificados; dextrinas tales como maltodextrinas; mono- y disacáridos tales como glucosa, trehalosa, sacarosa; solos o en mezcla.
17. Activador de fermentación de tipo Iniciador que comprende una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
18. Probiótico que comprende una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 10 19. Activador según la reivindicación 17, caracterizado por que representa un fermento panario.
20. Activador según la reivindicación 17, caracterizado por que representa un fermento de vinificación.
21. Activador según la reivindicación 17, caracterizado por que representa un fermento lácteo.

Figura 1

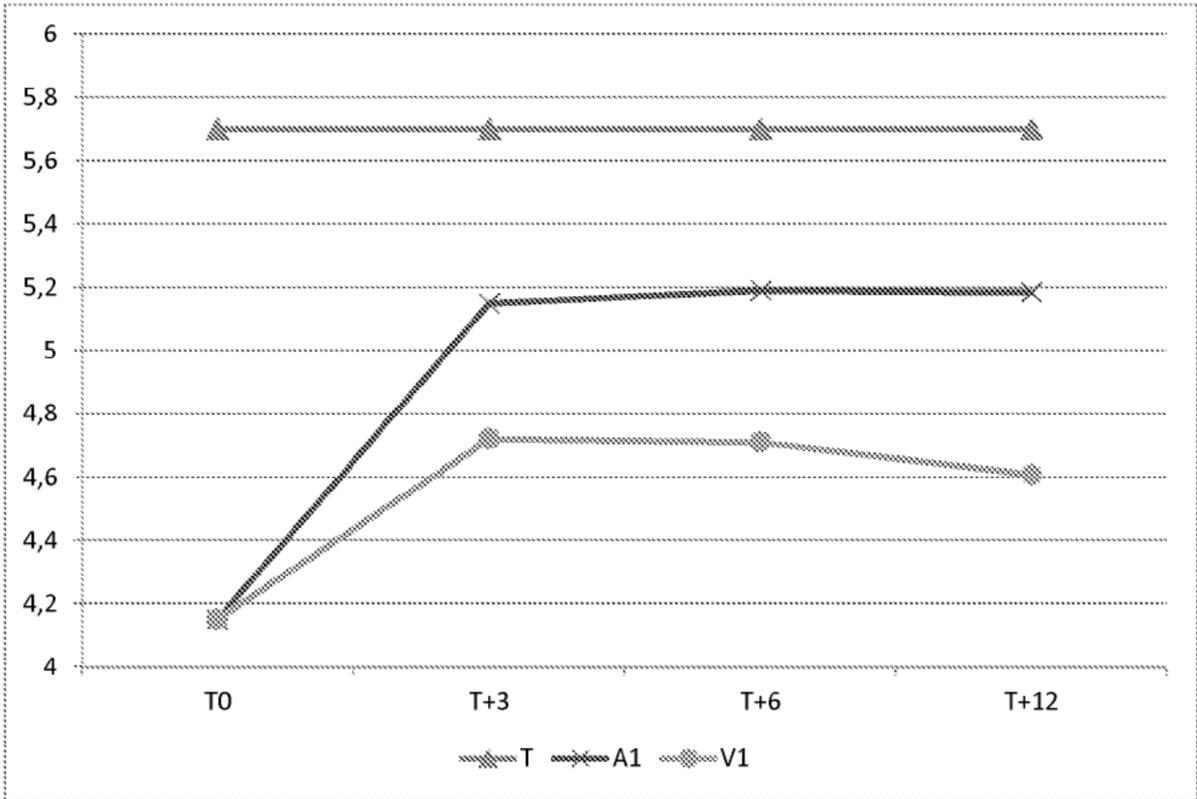


Figura 2

