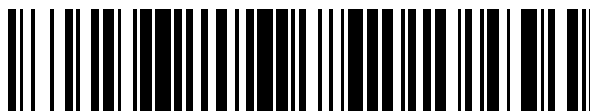


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 119**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)  
**A23L 19/00** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12P 1/04** (2006.01)  
**A23L 33/105** (2006.01)  
**A23L 13/60** (2006.01)  
**A23L 13/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2011 PCT/CN2011/077173**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012 WO12097576**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2011 E 11856061 (4)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2666370**

54 Título: **Método de preparación de solución de fermentación vegetal**

30 Prioridad:

**21.01.2011 CN 201110023826**

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

**30.07.2018**

73 Titular/es:

**JILIN ZIXIN PHARMACEUTICAL RESEARCH  
 INSTITUTION LLC (100.0%)  
 No.5 Dongtoudao Str. Nanguan Changchun  
 Jilin 130041, CN**

72 Inventor/es:

**SUN, DEJUN;  
 YIN, JINLONG;  
 SUN, MIAONAN;  
 ZHAO, YIZHUO;  
 GUO, CHUNSHENG;  
 GAO, YANHUI y  
 LI, XUE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
 Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
 la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 677 119 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

Método de preparación de solución de fermentación vegetal

5 Antecedentes de la presente invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de preparación de caldo de fermentación de frutas y verduras.

10 Descripción de las técnicas relacionadas

En las investigaciones anteriores, se muestra que la enzima de frutas y verduras tiene las siguientes funciones fisiológicas de:

- 15
- (1) limpiar el interior del cuerpo humano, purificar la sangre, mejorar el estado físico, descomponer y eliminar la materia extraña, y prevenir las enfermedades crónicas y las enfermedades degenerativas;
  - (2) mejorar la capacidad de carga de los glóbulos blancos, potenciar las funciones de los glóbulos blancos, y mejorar la capacidad antiinflamatoria, la capacidad antibacteriana y la capacidad de autocuración del organismo;
  - 20 (3) tomar parte en la digestión y descomposición de los alimentos, y potenciar la recuperación de la fuerza corporal, de modo que los múltiples factores enzimáticos participen en la digestión y descomposición de los alimentos, de manera que los alimentos se digieran y descompongan más fácilmente;
  - (4) potenciar el metabolismo de las células, producir energía y potenciar la regeneración de las células con mal estado de salud;
  - 25 (5) revivir las células reproductoras que se han descompuesto y mejorar la función reproductora;
  - (6) aliviar la resaca y evitar el estado de embriaguez; y
  - (7) complementar la nutrición y la energía.

30 En un método convencional para preparar la enzima, se rompen en trozos frutas y verduras, y se fermentan con agua en condiciones anaeróbicas. En esta fermentación, no es posible controlar el curso de la fermentación ni las cepas de las bacterias que participan en la fermentación, de manera que algunas bacterias pueden producir algunas sustancias nocivas para el cuerpo humano, y el período de fermentación es largo (en general, de 3~6 meses). El documento EP1169925A1 se refiere a un proceso de preparación de productos alimentarios que tienen altas características nutricionales, que contienen un producto a base de leche fermentada y una matriz vegetal fermentada por separado con bacterias lácticas y bifidobacterias.

35

El documento CN1395876A desvela una bebida fermentada de frutas y verduras que tiene un alto valor nutritivo, preparada a partir de zumo de fruta fresca, zumo de verdura fresca, bifidobacteria cultivada, *Lactobacillus* y estreptococo termófilo, estabilizante y aromatizantes.

40 Sumario de la presente invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de preparación de caldo de fermentación de frutas y verduras.

45 El método proporcionado por la presente invención comprende las siguientes etapas de: mezclar frutas, verduras, líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus*, líquido de bacterias *Bifidobacterium longum*, líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus* y líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus*, y procesar la fermentación, obteniéndose un producto de fermentación, es decir, el caldo de fermentación de frutas y verduras.

50 Una temperatura de fermentación es de 118 °C-37 °C, siendo una realización preferida aquella en la que la temperatura de fermentación es de 18 °C, 23 °C o 37 °C. Un período de fermentación es de 10 días a 180 días, siendo una realización preferida aquella en la que el período de fermentación es de 10 días, 15 días o 180 días. Un método de fermentación comprende la agitación durante la fermentación.

55 El método comprende además triturar las frutas y las verduras en trozos de malla 40~50 antes de la etapa de fermentación.

60 El método comprende además filtrar el producto de fermentación después de la etapa de fermentación, recoger la fracción filtrada, realizar la ultrafiltración y recoger el líquido producido mediante la ultrafiltración, es decir, el caldo de fermentación de frutas y verduras.

La etapa de ultrafiltración comprende ultrafiltrar la fracción filtrada en un peso molecular de 100.000, en la que la presión de entrada del líquido es de 1,3 kg y la presión de salida del líquido es de 0,5 kg.

65

Las frutas y las verduras se refieren a una mezcla de los siguientes 54 tipos de frutas y verduras, que son konjak, berenjena, espárrago, espinaca, brotes de soja, brócoli, repollo, rábano, pepino, guisantes, pimiento rojo, apio, cebollín, ajo, uvas, pomelo, sandía, melocotón, tangerina, arándanos, naranja dulce, plátano, lichi, pera balsámica, puerro, granada, pitaya, zanahoria, tomate, repollo chino, perejil, pimiento, lechuga, pera, jengibre, taro, frijol, calabaza, raíz de loto, cereza, kiwi, ciruela, fresa, higo, kumquat, mandarina, pera Nanguo, cantalupo, melón Hami, papaya, cebolla, mora, remolacha azucarera y limón.

La masa de cada fruta o verdura es igual entre sí.

Una proporción del líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus*, líquido de bacterias *Bifidobacterium longum*, líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus*, líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus*, las frutas y verduras, y el agua es de (2.000-8.000) ml:(2.000-8.000) ml:(2.000-8.000) ml:(2.000-8.000) ml:(1.000-1.500) kg:(1.000-1.500) kg. Una realización preferida es aquella en la que la proporción del líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus*, líquido de bacterias *Bifidobacterium longum*, líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus*, líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus*, las frutas y verduras, y el agua son de (2.000, 5.000 u 8.000) ml:(2.000, 5.000 u 8.000) ml:(2.000, 5.000 u 8.000) ml:(2.000, 5.000 u 8.000) ml:(1.000, 1.200 o 1.500) kg:(1.000, 1.200 o 1.500) kg.

El líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus* se prepara mediante el siguiente método que comprende: fermentar y cultivar *Lactobacillus acidophilus*, obteniéndose un producto fermentado, es decir, líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus*. Una temperatura de fermentación es de 20 °C a 41 °C, siendo una realización preferida aquella en la que la temperatura de fermentación es de 20 °C, 37 °C o 41 °C. Un período de fermentación es de 15 h a 36 h, siendo una realización preferida aquella en la que el período de fermentación es de 15 h, 16 h o 36 h.

El líquido de bacterias *Bifidobacterium longum* se prepara mediante el siguiente método que comprende: fermentar y cultivar *Bifidobacterium longum*, obteniéndose un producto fermentado, es decir, el líquido de bacterias *Bifidobacterium longum*. Una temperatura de fermentación es de 20 °C a 41 °C, siendo una realización preferida aquella en la que la temperatura de fermentación es de 20 °C, 37 °C o 41 °C. Un período de fermentación es de 15 h a 36 h, siendo una realización preferida aquella en la que el período de fermentación es de 15 h, 16 h o 36 h.

El líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus* se prepara mediante el siguiente método que comprende las etapas de: fermentar y cultivar *Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus*, obteniéndose un producto fermentado, es decir, el líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus*. Una temperatura de fermentación es de 20 °C a 41 °C, siendo una realización preferida aquella en la que la temperatura de fermentación es de 20 °C, 37 °C o 41 °C. Un período de fermentación es de 15 h a 36 h, siendo una realización preferida aquella en la que el período de fermentación es de 15 h, 16 h o 36 h.

El líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus* se prepara mediante el siguiente método que comprende las etapas de: fermentar y cultivar *Streptococcus thermophilus*, obteniéndose un producto fermentado, es decir, el líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus*. Una temperatura de fermentación es de 20 °C a 41 °C, siendo una realización preferida aquella en la que la temperatura de fermentación es de 20 °C, 37 °C o 41 °C. Un período de fermentación es de 15 h a 36 h, siendo una realización preferida aquella en la que el período de fermentación es de 15 h, 16 h o 36 h.

En una realización preferida, el *Lactobacillus acidophilus* es *Lactobacillus acidophilus* CGMCC 1.1854, el *Bifidobacterium longum* es *Bifidobacterium longum* CGMCC 1.2186, el *Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus* es *Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus* CGMCC 1.1480 y el *Streptococcus thermophilus* es *Streptococcus thermophilus* CGMCC 1.2471.

Un medio de fermentación y cultivo se prepara mediante un método que comprende: mezclar 10 g de peptona, 10 g de extracto de carne, 5 g de extracto de levadura, 20 g de glucosa, 1 g de tween-80, 2 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g de tween-80, 5 g de NaAC, 2 g de citrato de amonio tribásico, 0,2 g de MgSO<sub>4</sub>, 0,05 g de MnSO<sub>4</sub> y agua, en el que un volumen del medio es de hasta 1 l mediante la adición de agua.

El caldo de fermentación de frutas y verduras preparado mediante el método anterior también está en un intervalo de protección de la presente invención.

Una aplicación del método anterior o del caldo de fermentación de frutas y verduras en un medicamento para mejorar la inmunidad, reducir la fatiga, fortalecer el bazo y el estómago, o eliminar el cloasma también está en un intervalo de protección de la presente invención.

Mediante experimentos, en la presente invención, se demuestra que se seleccionan 4 tipos de probióticos que comprenden *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* para formar parte en la fermentación, de manera que se pueda controlar el curso de la fermentación y se reduzca el período de fermentación a 15 días. Los metabolitos de los probióticos son beneficiosos para el cuerpo humano. La enzima de frutas y verduras (el caldo de fermentación) de la presente invención es un

alimento natural completamente funcional producido por la fermentación de extractos de 80 tipos de verduras y frutas naturales y los probióticos. El caldo de fermentación contiene vitaminas completas, sustancias minerales y aminoácidos. El caldo de fermentación podría proporcionar nutrientes completos a las células para repararlas y aumentar la eficacia de las reacciones bioquímicas en las que las células reaccionan para formar otros componentes beneficiosos.

Estos y otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos adjuntos y las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la realización preferida

Los métodos experimentales usados en las siguientes realizaciones son todos métodos convencionales, si no hay instrucciones especiales.

El material, los reactivos, etc. usados en las siguientes realizaciones se podrían obtener todos de una manera comercial, si no hay instrucciones especiales.

Ejemplo 1. Preparación del caldo de fermentación de frutas y verduras

Método 1

I. Frutas y verduras seleccionadas

Se enumeran los siguientes 54 tipos de frutas y verduras.

Tabla 1. Frutas y verduras

Material	Ingrediente nutricional	Material	Ingrediente nutricional
Konjac	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Zanahoria	Vitamina A, caroteno, producto de fermentación
Berenjena	Vitamina A, B1, B2, C, producto de fermentación	Tomate	Vitamina A, caroteno, ácido cítrico, producto de fermentación
Espárragos	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Col china	Vitaminas, sustancias minerales, producto de fermentación
Espinacas	Vitamina A, C, hierro, calcio, producto de fermentación	Perejil	Vitaminas, sustancias minerales, fibras, producto de fermentación
Brotos de soja	Vitamina, jabón, aminoácido, producto de fermentación	Pimiento	Vitamina C, sustancias minerales, producto de fermentación
Brócoli	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Lechuga	Vitamina A, sustancias minerales, producto de fermentación
Repollo	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Pera	Fructosa, sustancias minerales, producto de fermentación
Rábano	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Jengibre	Vitaminas, sustancias minerales, producto de fermentación
Pepino	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Taro	Vitamina B1, B2, C, sustancias minerales, producto de fermentación
Guisante	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Frijoles	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación
Pimiento rojo	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Calabaza	Caroteno, sustancias minerales, producto de fermentación
Apio	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Raíz de loto	Hierro, tanino, producto de fermentación
Cebollino	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de	Cereza	Sustancias minerales, producto de fermentación

Material	Ingrediente nutricional	Material	Ingrediente nutricional
	fermentación		
Ajo	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Kiwi	Vitamina C, producto de fermentación
Uvas	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Ciruela	Ácido orgánico, vitaminas, producto de fermentación
Pomelo	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Fresa	Vitamina C, sustancias minerales, ácido elálgico, producto de fermentación
Sandía	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Higo	Producto de fermentación, vitaminas, sustancias minerales
Melocotón	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Naranja china	Vitamina B1, B2, C, producto de fermentación
Tangerina	Vitamina B1, B2, C, producto de fermentación	Mandarina	Vitamina C, ácido cítrico, producto de fermentación
Arándano	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Pera Nanguo	Vitamina B1, B2, C, ácido cítrico, producto de fermentación
Naranja dulce	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Cantalupo	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación
Plátano	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Melón Hami	Fructosa, potasio, vitamina A, producto de fermentación
Lichi	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Papaya	Vitamina B, C, E, ácido cítrico, caroteno, producto de fermentación
Pera balsámica	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Cebolla	Vitamina B, C, caroteno, producto de fermentación
Puerro	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Mora	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación
Granada	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Remolacha azucarera	Betaína, producto de fermentación
Pitaya	Vitamina B1, B2, ácido cítrico, producto de fermentación	Limón	Ácido cítrico, producto de fermentación

## II. Fermentación de las frutas y las verduras

### 1. Selección y adquisición de cepas

5 Las cepas probióticas se adquieren en el instituto de microbiología de la Academia de Ciencias de China, los probióticos son *Lactobacillus acidophilus* CGMCC 1.1854, *Bifidobacterium longum* CGMCC 1.2186, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* CGMCC 1.1480 y *Streptococcus thermophilus* CGMCC 1.2471. Todas las cepas se conservan en tubos de arena y se usan como cepas originales.

### 2. Preparación de semillas maestras

10 La preparación de las semillas maestras de los probióticos (las generaciones de transferencia de las semillas maestras no son más de 10, y las generaciones en la presente invención son 4) comprende:

15 (1) tomar 1/10 del tubo de arena de *Lactobacillus acidophilus* CGMCC 1.1854, *Bifidobacterium longum* CGMCC 1.2186, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* CGMCC 1.1480 y *Streptococcus thermophilus* CGMCC 1.2471 con una cuchara de acero inoxidable estéril, siendo el resto de los probióticos criopreservados, respectivamente inoculando los probióticos en 50 ml de medio líquido MRS (frasco triangular de 250) (10 g/l de peptona, 10 g/l de extracto de carne, 5 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de glucosa, 1 g/l de tween-80, 2 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/l de tween-80, 5 g/l de NaAC, 2 g/l de citrato de amonio tribásico, 0,2 g/l de MgSO<sub>4</sub>, 0,05 g/l de

MnSO<sub>4</sub>, esterilización a una temperatura de 121 °C durante 20 min), y cultivar los probióticos en una mesa de agitación a una velocidad de 100 r/min y una temperatura de 37 °C durante 16 h;

5 (2) tomar respectivamente un asa de cada probiótico con un asa de siembra, sembrar en estrías los probióticos respectivamente en medio sólido MRS (10 g/l de peptona, 10 g/l de extracto de carne, 5 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de glucosa, 1 g/l Tween-80, 2 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/l de Tween-80, 5 g/l de NaAC, 2 g/l de citrato de amonio tribásico, 0,2 g/l de MgSO<sub>4</sub>, 0,05 g/l de MnSO<sub>4</sub>, agar al 1,5 %, esterilización a una temperatura de 121 °C durante 20 min), cultivar los probióticos en una incubadora a una temperatura de 37 °C durante 16 h;

10 (3) tomar respectivamente la colonia bacteriana que sea más eugenésica en cada probiótico, inocular respectivamente la colonia bacteriana en 50 ml del medio líquido MRS y cultivar la colonia bacteriana en una mesa de agitación a una velocidad de 100 r/min y una temperatura de 37 °C durante 16 h;

15 (4) inocular respectivamente la colonia bacteriana en 500 ml del medio líquido MRS, cultivar la colonia bacteriana en la mesa de agitación a una velocidad de 100 r/min y una temperatura de 37 °C durante 16 h, añadir glicerol a una concentración del 20 %, agitar, almacenar los probióticos en 1 ml en tubos de congelación, que se usan como semillas maestras de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* y *Streptococcus thermophilus*, conservar a una temperatura de -40 °C.

### 20 3. Preparación de las semillas de trabajo

La preparación de las semillas de trabajo de los probióticos comprende las etapas de: (las generaciones de transferencia de las semillas de trabajo no son más de 5, y las generaciones de transferencia en la presente invención son 4):

25 (1) tomar respectivamente las semillas maestras de *Lactobacillus acidophilus* CGMCC 1.1854, *Bifidobacterium longum* CGMCC 1.2186, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* CGMCC 1.1480 y *Streptococcus thermophilus* CGMCC 1.2471 con el asa de siembra estéril, sembrar en estrías respectivamente las semillas maestras en el medio sólido MRS y cultivar las semillas maestras en la incubadora a una temperatura de 37 °C durante 16 h;

30 (2) tomar respectivamente la colonia bacteriana que sea más eugenésica en cada probiótico, inocular respectivamente la colonia bacteriana en 50 ml del medio líquido MRS y cultivar la colonia bacteriana en la mesa de agitación a una velocidad de 100 r/min y una temperatura de 37 °C durante 16 h;

35 (3) inocular respectivamente la colonia bacteriana en 500 ml del medio líquido MRS y cultivar la colonia bacteriana en la mesa de agitación a una velocidad de 100 r/min y una temperatura de 37 °C durante 16 h; y

40 (4) inocular respectivamente la colonia bacteriana en 5.000 ml del medio líquido MRS y cultivar la colonia bacteriana en la mesa de agitación a una velocidad de 100 r/min y una temperatura de 37 °C durante 16 h, obteniéndose el líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus* CGMCC 1.1854, el líquido de bacterias *Bifidobacterium longum* CGMCC 1.2186, el líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* CGMCC 1.1480 y el líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus* CGMCC 1.2471, siendo todos los líquidos de bacterias anteriores productos de fermentación completos en el recipiente de fermentación.

### 45 4. Fermentación de las frutas y las verduras

La fermentación de las frutas y las verduras comprende las etapas de:

50 1) pesar los materiales de la Tabla 1 anterior y tomar 15 kg de cada tipo;

2) lavar los materiales, secar y pesar;

55 3) romper los materiales en trozos de 0,297 mm-0,42 mm (mallas 40-50), añadir los materiales a un fermentador, en el que la cantidad práctica de alimentación es de 2.400 kg para un fermentador de 3 t (peso de disolventes efectivos = 3 t x 0,8 = 2,4 t), y la proporción de las frutas y verduras y el agua es de 1:1, por ejemplo, el peso de las frutas y verduras es de 1.200 kg, y el peso del agua es de 1.200 kg;

60 4) añadir 5.000 ml de cada uno de líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus* CGMCC 1.1854, líquido de bacterias *Bifidobacterium longum* CGMCC 1.2186, líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* CGMCC 1.1480 y líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus* CGMCC 1.2471 en el fermentador, controlando que la temperatura de fermentación sea de 23 °C, y agitando durante 15 d;

65 5) filtrar el producto de fermentación con una tela filtrante de malla 200, y retirar los residuos de las frutas y verduras para obtener la fracción filtrada; y

6) ultrafiltrar la fracción filtrada en un peso molecular de 100.000 (la presión de entrada de líquido es de 1,3 kg y la presión de salida de líquido de 0,5 kg), obteniéndose 1.200~1.500 kg de líquido transparente, cerrar herméticamente el líquido transparente y preservarlo a una temperatura de 4 °C, obteniéndose el caldo de fermentación de frutas y verduras.

5 III. Detección

10 El caldo de fermentación de frutas y verduras comprende principalmente: ácido láctico y ácido acético, por lo que la acidez se identifica como los componentes característicos del caldo de fermentación de frutas y verduras, que se realiza preferentemente de la siguiente manera.

15 La acidez del caldo de fermentación de frutas y verduras se refiere al número de ml/volumen de solución de NaOH de 0,1 N consumidos para valorar 100 ml del caldo de fermentación de frutas y verduras, y normalmente, en la detección, se usan 10 ml de muestra del caldo de fermentación de frutas y verduras.

20 La detección comprende las etapas de: tomar 10 ml del caldo de fermentación de frutas y verduras, 20 ml de agua y 0,5 ml de indicador de fenolftaleína, procesar la titulación con solución patrón de NaOH de 0,1 N hasta que la mezcla se vuelva rojiza sin desteñirse en un período de 30 segundos. Fórmula de cálculo: Acidez = volumen consumido de la solución patrón de NaOH de 0,1 N x 10.

Resultado: la acidez del producto es de 42.

#### Método 2

25 I. Las frutas y verduras seleccionadas son las mismas que en el método 1.

#### II. Fermentación de las frutas y las verduras

30 El método de extracción es principalmente igual que el método 1, excepto que se añaden 2.000 ml de cada uno de líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus* CGMCC 1.1854, líquido de bacterias *Bifidobacterium longum* CGMCC 1.2186, líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* CGMCC 1.1480 y líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus* CGMCC 1.2471, siendo el peso de las frutas y verduras añadidas de 1.000 kg y siendo el peso del agua de 1.000 kg.

35 La temperatura de fermentación del caldo de fermentación de frutas y verduras es de 18 °C, y el período de fermentación es de 10 días.

40 En las preparaciones del líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus*, el líquido de bacterias *Bifidobacterium longum*, el líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y el líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus*, las temperaturas de fermentación son todas de 20 °C y los períodos de fermentación son todos de 15 h.

#### III. Detección

45 El método de detección es el mismo que el del método 1, y no hay ninguna diferencia notable en el resultado ni en las etapas.

#### Método 3

50 I. Las frutas y verduras seleccionadas son las mismas que en el método 1.

#### II. Fermentación de las frutas y las verduras

55 El método de extracción es principalmente el mismo que el método 1, excepto que se añaden 8.000 ml de cada uno de líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus* CGMCC 1.1854, líquido de bacterias *Bifidobacterium longum* CGMCC 1.2186, líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* CGMCC 1.1480 y líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus* CGMCC 1.2471, siendo el peso de las frutas y verduras añadidas de 1.500 kg y siendo el peso del agua de 1.500 kg.

60 La temperatura de fermentación del caldo de fermentación de frutas y verduras es de 37 °C y el período de fermentación es 180 días.

65 En las preparaciones del líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus*, el líquido de bacterias *Bifidobacterium longum*, el líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y el líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus*, las temperaturas de fermentación son todas de 41 °C y los períodos de fermentación son todos de 36 h.

III. Detección

El método de detección es el mismo que el del método 1 y no hay ninguna diferencia notable en el resultado ni en las etapas.

5



## REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de caldo de fermentación de frutas y verduras que comprende las etapas de:

5 mezclar frutas, verduras, líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus*, líquido de bacterias *Bifidobacterium longum*, líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus*, y procesar la fermentación, obteniéndose un producto de fermentación, es decir, el caldo de fermentación de frutas y verduras, en el que el período de fermentación es de 10 días a 180 días, y en el que las frutas y verduras se refieren a una mezcla de 54 tipos de frutas y verduras, que son  
10 konjak, berenjena, espárrago, espinaca, brotes de soja, brócoli, repollo, rábano, pepino, guisantes, pimiento rojo, apio, cebollín, ajo, uvas, pomelo, sandía, melocotón, tangerina, arándanos, naranja dulce, plátano, lichi, pera balsámica, puerro, granada, pitaya, zanahoria, tomate, repollo chino, perejil, pimiento, lechuga, pera, jengibre, taro, frijol, calabaza, raíz de loto, cereza, kiwi, ciruela, fresa, higo, kumquat, mandarina, pera Nanguo, cantalupo, melón Hami, papaya, cebolla, mora, remolacha azucarera y limón.

15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de fermentación es de 18 °C-37 °C, y un método de fermentación comprende agitar durante la fermentación.

20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende además: romper las frutas y las verduras en trozos de 0,297 mm-0,42 mm (mallas 40-50) antes de la etapa de fermentación, filtrar el producto de fermentación después de la etapa de fermentación, recoger la fracción filtrada, realizar la ultrafiltración y recoger el líquido producido por ultrafiltración, es decir, el caldo de fermentación de frutas y verduras.

25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en el que la masa de cada fruta o verdura es igual entre sí.

30 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en el que una proporción del líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus*, del líquido de bacterias *Bifidobacterium longum*, del líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, del líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus*, de las frutas y verduras, y del agua es de (2.000-8.000) ml:(2.000-8.000) ml:(2.000-8.000) ml:(2.000-8.000) ml:(1.000-1.500) kg:(1.000-1.500) kg.

35 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5, en el que el líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus* se prepara mediante un método que comprende: fermentar y cultivar *Lactobacillus acidophilus*, obteniéndose un producto fermentado, es decir, el líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus*, siendo una temperatura de fermentación del líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus* de 20 °C-41 °C y siendo un período de fermentación del líquido de bacterias *Lactobacillus acidophilus* de 15 h-36 h;

40 el líquido de bacterias *Bifidobacterium longum* se prepara mediante un método que comprende: fermentar y cultivar *Bifidobacterium longum*, obteniéndose un producto fermentado, es decir, el líquido de bacterias *Bifidobacterium longum*, siendo una temperatura de fermentación del líquido de bacterias *Bifidobacterium longum* de 20 °C-41 °C, y siendo un período de fermentación del líquido de bacterias *Bifidobacterium longum* de 15 h-36 h;

45 el líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* se prepara mediante un método que comprende las etapas de: fermentar y cultivar *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, obteniéndose un producto fermentado, es decir, el líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, siendo una temperatura de fermentación del líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* de 20 °C-41 °C y siendo un período de fermentación del líquido de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* de 15 h a 36 h;

50 el líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus* se prepara mediante un método que comprende las etapas de: fermentar y cultivar *Streptococcus thermophilus*, obteniéndose un producto fermentado, es decir, el líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus*, siendo una temperatura de fermentación del líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus* de 20 °C-41 °C y siendo un período de fermentación del líquido de bacterias *Streptococcus thermophilus* de 15 h-36 h.

55 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en el que *Lactobacillus acidophilus* es *Lactobacillus acidophilus* CGMCC 1.1854, *Bifidobacterium longum* es *Bifidobacterium longum* CGMCC 1.2186, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* es *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* CGMCC 1.1480, y *Streptococcus thermophilus* es *Streptococcus thermophilus* CGMCC 1.2471.

60 8. El caldo de fermentación de frutas y verduras preparado mediante el método de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

9. El caldo de fermentación de frutas y verduras de acuerdo con la reivindicación 8, o una sal medicinalmente aceptable del mismo, para su uso como medicamento para mejorar la inmunidad.