



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 204 316**

② Número de solicitud: 200202181

⑤ Int. Cl.7: **C12N 11/16**

C12P 39/00

C12P 7/08

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **25.09.2002**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2004**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.04.2004**

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Córdoba  
Rectorado Universidad de Córdoba,  
Alfonso XIII, 13  
14001 Córdoba, ES**

⑦ Inventor/es: **Peinado Amores, Rafael Andrés;  
García Mauricio, Juan Carlos;  
Moreno Vígara, Juan José  
Ortega Ruiz, José María;  
Medina Carnicer, Manuel;  
Mérida García, Julieta;  
Millán Pérez, María Carmen;  
Mayen Riego, Manuel;  
Zea Calero, Luis;  
Moyano Cañete, María de Lourdes;  
Valero Blanco, Eva María;  
Muñoz Rodríguez, David;  
López Toledano, Azahara y  
Maestre Delgado, Oscar**

⑦ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤ Título: **Procedimiento de obtención de biocápsulas de levaduras, biocápsulas así obtenidas y aplicaciones.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de obtención de biocápsulas de levaduras, biocápsulas así obtenidas y aplicaciones.

Dicho procedimiento comprende la operación de provocar una co-inmovilización espontánea entre un hongo filamentoso y una levadura, creando artificialmente las condiciones adecuadas para inducir la correspondiente simbiosis entre ambas, en ausencia de soportes físico-químicos.

Dichas biocápsulas tienen forma de esferas huecas, cuya pared presenta una superficie lisa compuesta por micelio de dicho hongo y células de dicha levadura atrapadas, que limita un espacio interior ocupado parcialmente por células de levaduras libres y otras asociadas a hifas.

Las citadas biocápsulas tienen aplicación en procesos fermentativos industriales.

ES 2 204 316 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de biocápsulas de levaduras, biocápsulas así obtenidas y aplicaciones.

### Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la Biotecnología y Microbiología Industrial, y más concretamente dentro del sector de la inmovilización de biocatalizadores para procesos fermentativos, o para procesos de degradación u obtención de productos químicos.

Más específicamente, la presente invención proporciona un procedimiento para la obtención de biocápsulas, que presentan importantes ventajas técnicas dentro del campo de la inmovilización de biocatalizadores y de sus aplicaciones.

### Estado de la técnica anterior a la invención

Los mohos y las levaduras son hongos ampliamente distribuidos en la Naturaleza. Los mohos u hongos filamentosos se presentan como largos filamentos de células (hifas) que forman un micelio, masa enredada más o menos compacta. Las levaduras son hongos unicelulares, normalmente de forma oval o cilíndrica. Los mohos como *Penicillium* y *Aspergillus* son aerobios y debido a sus actividades químicas son muy importantes en la industria (producción de: antibióticos, quesos, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido gálico y numerosas enzimas que se aplican a multitud de procesos industriales como sacarificaciones). *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura anaerobia facultativa y tiene una gran importancia económica porque interviene en procesos de fermentación alcohólica para la obtención de etanol y bebidas alcohólicas. Determinadas razas de *S.cerevisiae* pueden formar un velo o flor en la superficie del vino una vez terminada la fermentación alcohólica y agotados los azúcares fermentables, una forma de inmovilización espontánea.

Estas son las levaduras de flor (Martínez et al., 1997). Para más información sobre hongos filamentosos y levaduras de uso industrial ver Leveau y Bouix (2000).

Según Chibata (1978) la inmovilización de enzimas es aquella en la que "las enzimas se encuentran físicamente confinadas o localizadas en una región definida de espacio manteniendo su actividad catalítica, y pueden ser repetida y continuamente utilizadas". El término de "inmovilización" también es aplicable a orgánulos celulares y a células tanto microbianas como de plantas o de animales. La inmovilización de células tiene una serie de ventajas para los procesos industriales de fermentación como: aumento de la productividad, estabilidad celular y reducción de los costes del proceso debido a la fácil recuperación y reciclaje de las células (Groboillot et al., 1994). Tanaka y Kawamoto (1999) describen numerosos métodos de inmovilización y los clasifican en cuatro categorías:

- 1) Métodos de unión de biocatalizador a un sustrato portador o soporte insoluble en agua, mediante uniones iónicas, covalentes, adsorción física o uniones bioespecíficas. Los materiales más empleados son: polisacáridos insolubles en agua (celulosa, dextrano y derivados de la agarosa), proteínas (gelatina y albúmina), polímeros sintéticos (derivados del poliestireno, resinas de intercambio iónico y poliuretano) y materiales inorgánicos (arcilla, cristal, arena, cerá-

mica y magnetita) éstos soportes se pueden utilizar directamente o después de una activación.

- 2) Métodos de los enlaces cruzados, mediante la utilización de compuestos biomultifuncionales (ej. el reactivo más utilizado es el glutaraldehído que entrecruza grupos amino mediante uniones base de Schiff, también se emplean diisocianato de tolueno y de hexametileno) que van a dar lugar a redes insolubles en agua de los biocatalizadores.
- 3) Métodos de atrapamiento, mediante la retención del biocatalizador en un enrejado producido por una matriz de uno o varios polímeros (gel de poliacrilamida, gel de alginato, gel de carragenato, resinas sintéticas), o mediante la encapsulación: en microcápsulas de un polímero sintético semipermeable, en liposomas, membranas o micelas inversas.
- 4) Una combinación de los tres métodos anteriores:

Se han obtenido de manera natural inmovilizaciones de un único microorganismo, mediante la agregación de células en pequeños pellets o microesferas, como levaduras floculantes, bacterias o micelios de hongos. (Webb et al., 1986; Fontana et al. 1991; Wiczorek and Michalski, 1994; Paiva et al., 1996). También se han obtenido microesferas no huecas (150-200 um) utilizando distintos polímeros como carragenato, Sephadex G-25-50, colágeno, celulosa, etc. (Perusich et al., 1991; Szajani et al., 1996, Nigam, 2000). También se han realizado microencapsulaciones, sobre todo para la inmovilización de enzimas porque una gran cantidad de enzimas pueden ser atrapadas con polímeros sintéticos (talato de acetato de celulosa) sin que se desnaturalicen o sufran modificaciones químicas (Tzan et al., 1991; Gibbs et al., 1999). Otras técnicas han conseguido la co-inmovilización de *Aspergillus awamori* y *Saccharomyces pastorianus* utilizando varios soportes de celulosa (Fujii et al., 2001), para su aplicación en la obtención de etanol a partir de almidón, mediante una sacarificación y fermentación simultánea. También se han co-inmovilizado las levaduras *S. cerevisiae* y *Candida shehatae* en una estructura de membrana de microporos/capa de agar, que se ha aplicado en la fermentación alcohólica continua de mezcla de glucosa/xilosa (Lebeau et al., 1998).

En los párrafos anteriores se ha hecho referencia a las citas bibliográficas de forma abreviada, para no hacer demasiado farragosa la exposición. Seguidamente, se hace una enumeración de dichas citas bibliográficas indicando todos los datos necesarios para poder localizarlas fácilmente, si fuera preciso.

### Bibliografía

**Chibata, I.** (1978). Immobilized Enzymes-Research and Development. John Wiley & Sons., Inc., New York.

**Fontana, A.; Chraibi, M.; Guiraud, J.P. and Ghommidh, C.** (1991). Diffusivity measurement in a flocculating yeast layer. *Biotechn. Techniques*. 5:133-138).

**Fujii, N., Oki, T.; Sakurai, A.; Suye, S. and Sakakibara, M.** (2001) Ethanol production from starch by immobilized *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces pastorianus* using cellulose carriers. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27:52-57.

**Gibbs, B.F. Kermasha, S., Alli, I, and Mulligan.**

C.N. (1999). Encapsulation in the food industry; a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50:213-224.

**Groboillot, A.; Boadi, D.K.; Poncelet, D. and Neufeld, R.J.** (1994). Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* 14:75-107.

**Lebeau, T.; Jouenne, T. and Junter, G.A.** (1998). Continuous alcoholic fermentation of glucose/xylose mixtures by co-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 50:309-313.

**Leveau, J.Y. y Bouix, M.** (2000). Microbiología Industrial. Los microorganismos de interés industrial. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.

**Martínez, P., Pérez, L. and Benítez, T.** (1997). Evolution of flor yeast population during the biological aging of fine Sherry wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 48:160-168.

**Nigam, J.N.** (2000). Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *J. Biotechnol.* 80:189-193.

**Paiva, T.C.; Sato, S.; Visconti, A.E. and Castro, L.A.** (1996) Continuous alcoholic fermentation process in a tower reactor with recycling of flocculating yeast. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57-58:535-541.

**Perusich, C.M.; Goetghebeur, S. and Hu, W.S.** (1991). Virus production in microsphere-induced aggregate culture of animal cells. *Biotechnol. Techniques.* 5:145-148.

**Szajani, B.; Buzas, S; Dallmann, K; Gimesi, I.; Krisch, J. and Toth, M.** (1996). Continuous production of ethanol using yeast cells immobilized in preformed cellulose beads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:122-125.

**Tanaka, A. and Kawamoto, T.** (1999). Cell and enzyme immobilization. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Second Edition. (Eds A.L. Demain and J.E. Davies; R.M. Atlas, G. Cohen, Ch. L. Hershberger, Wei-Shou Hu, D.H. Sherman, R.C. Wilson, J.H. David Wu). ASM PRESS, Washington, D.C. pp.94-102.

**Tzan, Y.L.; Lin, S.Y.; Weng, C.N. and Lee, C.J.** (1991). Preparation of enteric-coated microspheres of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine with cellulose acetate phthalate; the effect of swine serum on micro-metric properties. *Biotechnol. Techniques* 5:139-144.

**Webb, C. Black, G.M. and Atkinson, B.** (1986). Process engineering aspects of immobilised cell systems. Published by The Institution of Chemical Engineers. Pergamon Press. Ltd., Headington Hii Hall Oxford, England.

**Wieczorek, A. and Michalski, H.** (1994). Continuous ethanol production by flocculating yeast in the fluidised bed bioreactor. *FEMS Microbiol. Rev.* 14:69-74.

El solicitante ha encaminado sus esfuerzos investigadores en el sector de la inmovilización de biocatalizadores que constituye un campo de la Biotecnología de gran interés por sus múltiples aplicaciones industriales.

Como resultado de dichos esfuerzos ha conseguido poner a punto un nuevo proceso de inmovilización de biocatalizadores que aporta importantes ventajas en el campo. Este hallazgo constituye la base de la presente invención la cual se expone con todo detalle en los siguientes apartados de la presente memoria descriptiva.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se expone en su enunciado, se refiere a un procedimiento para la obtención de biocápsulas de levaduras, a las propias biocápsulas así obtenidas y a sus aplicaciones.

La originalidad de la presente invención consiste en provocar una co-inmovilización espontánea de dos microorganismos: un hongo filamentosos y una levadura, mediante una inducción simbiótica, en ausencia de compuestos químicos de unión y de soportes externos, creando artificialmente las condiciones adecuadas para favorecer la correspondiente simbiosis.

Dicha co-inmovilización se consigue añadiendo al medio de cultivo un nutriente no utilizable por la levadura y sí por el hongo filamentosos en un medio tamponado y agitado.

Mediante dicha técnica se obtienen biocápsulas huecas, cuya pared está compuesta por micelio y células de levaduras atrapadas, unidas probablemente por fenómenos de adsorción bioespecífica. A este respecto, el solicitante ha podido comprobar que las levaduras de flor se adhieren más eficientemente que las levaduras que no poseen esta propiedad, para proporcionar cápsulas huecas de forma esférica y superficie lisa, cuyas paredes limitan un espacio interior parcialmente ocupado por células de levaduras libres y otras asociadas a hifas, formando racimos, quedando el medio de cultivo transparente.

De acuerdo con lo anterior, es de destacar que la novedad de la presente invención reside fundamentalmente en utilizar como sustrato inmovilizador un organismo vivo (el citado hongo filamentosos) en lugar de un soporte físico-químico inerte, como en la técnica anterior.

Las biocápsulas de levaduras de la presente invención son muy útiles en diversas aplicaciones industriales.

La operación de co-inmovilización que constituye la base de la presente invención está caracterizada por el cultivo de hongos filamentosos y levaduras en medios tamponados, en ausencia de soportes físicos externos inertes, conteniendo dichos medios nutrientes utilizables por los hongos filamentosos y no utilizables por las levaduras.

Básicamente la técnica desarrollada por la presente invención consiste en crear las condiciones adecuadas para que se produzca dicha simbiosis. Dichas condiciones son fundamentalmente las siguientes:

- 1) Un medio de cultivo provisto de una fuente de carbono utilizable por el hongo filamentosos y no utilizable por la levadura. Entre las fuentes de carbono que cumplen estos requisitos pueden citarse el ácido glucónico, almidón, celulosa, inulina y otras moléculas coloidales similares.
- 2) Un medio de cultivo tamponado de tal modo que el pH no disminuya durante el proceso como consecuencia de la excreción de ácidos por el hongo filamentosos (tales como ácido cítrico, ácido glucónico, etc.). Es muy importante controlar adecuadamente el pH del medio para evitar que las células de levadura mueran, en cuyo caso, las biocápsulas formadas estarían constituidas solamente por el hongo filamentosos, que daría lugar a unas esferas laxas y fibrosas no lisas. En concreto dicho pH debe mantenerse entre 3 y 7.

- 3) Un medio de cultivo agitado permanentemente para que no mueran las células de hongo filamentoso y puedan producirse las biocápsulas. La agitación se puede llevar a cabo con un agitador orbital, en un fermentador con un sistema de agitación-aireación, o con cualquier otro medio que resulte adecuado para la agitación requerida. El tamaño de las biocápsulas con forma de esfera depende fundamentalmente de factores externos como la velocidad y el tiempo de agitación, pudiendo variar su diámetro entre unos milímetros y varios centímetros. Otro factor importante es la temperatura de incubación.

Básicamente, como resumen de lo expuesto anteriormente, la obtención de biocápsulas de células de levadura depende de factores internos, como son los microorganismos de partida empleados y la composición química del medio; y de factores externos que deben estar controlados, como son la temperatura de incubación, la velocidad de agitación y el tiempo de agitación.

Entre los factores internos y externos se hace seguidamente una enumeración de los que son especialmente adecuados para la ejecución de la invención:

*Factores internos:*

- a) Microorganismos
  - Razas de *Saccharomyces cerevisiae* como *capensis*, *bayanus*, etc.
  - Especies de hongos filamentosos *Aspergillus*, *Penicillium*, etc.
- b) Composición del medio
  - YNB (“yeast nitrogen base”) sin aminoácidos.
  - Fuente de carbono utilizada por el hongo filamentoso y no por la levadura (almidón, celulosa, inulina, ácido glucónico, etc.).
  - Medio tamponado.
  - pH entre 3 y 7

*Factores externos:*

- Temperatura de incubación comprendida entre 20 y 30°C.
- Velocidad de agitación entre 90-270 rpm.
- Tiempo 24 ó más horas, de cultivo.

Si bien la descripción hecha en lo que antecede es suficientemente evidente cómo para que un experto en el campo pueda apreciar las ventajas de la presente invención, seguidamente se insiste sobre las mismas de forma más específica.

Las técnicas anteriores para la co-inmovilización utilizan soportes como celulosa, membranas semipermeables de polímeros sintéticos, liposomas, etc. En la presente invención, el soporte, la matriz, es uno de los microorganismos que se va a inmovilizar, por lo tanto se elimina el gasto de la inmovilización ya que no se utiliza ningún soporte inerte externo. Así pues, se trata de un método sencillo, fácil y barato, sin la necesidad de un portador inerte externo. Por otro lado, las uniones e interacciones que se producen entre los organismos son naturales, por lo que sus actividades catalíticas no deben de afectarse ya que no se trata de una inmovilización forzada.

Se consigue una “co-inmovilización” en la que se puede utilizar a los dos microorganismos activos para procesos simultáneos como una sacarificación y una fermentación, o bien solamente a la levadura activa en procesos sin aireación (fermentación), donde el hongo filamentoso actuaría de soporte inerte.

Una ventaja adicional, consiste en la posibilidad de vaciar el interior de la biocápsula y rellenarla con otros tipos de células o biocatalizadores para realizar otros procesos mediante confinamiento de una gran densidad de células dentro de la biocápsula. Se trata pues de una fuente renovable de células, ya que las células crecen en el interior de las esferas y parte se van liberando al medio regenerándose continuamente funcionando como transportadores y fuentes de células. Además, por lo general son fácilmente separables del medio en que se lleve a cabo el proceso lo que además de agilizarlo lo abarata.

Las biocápsulas de la presente invención tienen una amplia diversidad de aplicaciones industriales especialmente en el campo de los procesos fermentativos y en la industria de la alimentación.

Como ilustrativas de alguna de dichas aplicaciones, en concreto pueden mencionarse las siguientes:

- 1) Procesos fermentativos para la producción de etanol a partir de distintos sustratos carbonados; melazas, almidón, celulosa, inulina, entre otros.
- 2) Utilización como soporte para otros biocatalizadores en procesos de obtención y recuperación de productos de alto valor añadido.
- 3) Obtención de bebidas fermentadas.
- 4) Clarificación de líquidos.

Además, las biocápsulas de la presente invención pueden utilizarse en los mencionados procesos, tanto si se llevan a cabo en forma continua o por tandas o lotes.

**Breve descripción de la figura**

La Figura 1 y única anexa es una representación gráfica de la evolución de la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> de las células de levadura inmovilizadas y libres (testigo) sobre el medio de melazas (9% azúcares, 0,3% sulfato amónico, Ph=7), correspondiente a la realización del Ejemplo 2.

**Modos de realización de la invención**

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no deben considerarse, en absoluto, como limitantes del alcance de la invención, definido única y exclusivamente por la nota reivindicatoria adjunta.

**Ejemplo 1:**

*Obtención de biocápsulas de S.cerevisiae (capensis) y A.niger.*

Para la obtención de biocápsulas de *S.cerevisiae (capensis)* y *A. niger*, se emplearon las siguientes condiciones:

- 1) Composición del medio
  - YNB sin aminoácidos
  - Acido glucónico
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NaOH
- 2) Preparación del medio
  - Disolución del YNB en agua destilada se-

gún las indicaciones del fabricante y adición de ácido glucónico hasta aproximadamente 5 g/L.

- Ajuste del pH hasta un valor de 7 con sales de ácido fosfórico y con hidróxido sódico.
- 3) Esterilización del medio en autoclave (120°C, 15 min) e inoculación con células de levadura ( $1 \times 10^6$  cel/mL) y esporas de hongo filamentoso (varias asas de siembra).
- 4) Termostatación a 28°C y agitación a 90 rpm en agitador orbital durante 48 h.

Se obtuvieron así biocápsulas esféricas con un diámetro medio de esfera de 15 mm de diámetro y se recogieron con un tamiz de 0,2 mm.

Ejemplo 2:

*Aplicación de biocápsulas para la obtención de etanol.*

Se emplearon las biocápsulas obtenidas a partir de *S. cerevisiae (capensis)* y una especie de *Penicillium*, por un proceso análogo al descrito en el Ejemplo 1 anterior, en la obtención de etanol a partir de la fermentación de melazas, reutilizándose en siete ocasiones sin que se observase una disminución de su actividad fermentativa.

Se comparó el efecto de la inmovilización sobre la cinética de fermentación, cuyos resultados se muestran en la Figura 1 adjunta.

Dicha Figura representa gráficamente la evolución de la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> de las células de levaduras inmovilizadas y libres (testigo) sobre un

medio de dichas melazas constituido por 9% de azúcares, 0,3% de sulfato amónico, pH=7; los datos se han obtenido por diferencia de peso con respecto al peso total inicial de melazas.

En dicha Figura 1 puede observarse que:

(1). El perfil de la curva de fermentación en el medio de melazas fermentado con células libres es distinto a los observados cuando se utilizan células inmovilizadas, que son más suaves y similares entre sí. El retraso observado, la primera vez que se fermentó con células inmovilizadas, se debe a un periodo de adaptación al medio de fermentación. (2). La velocidad máxima de fermentación se alcanzó con las células de levadura libres cuando se inoculan en plena actividad fermentativa. (3). La duración del proceso (alrededor de 5 días) y el contenido de etanol alcanzado ( $41 \text{ g l}^{-1}$ ) son similares en todos los casos.

Las cápsulas utilizadas en este experimento son cápsulas típicas de la presente invención con forma de esferas huecas de hongo filamentoso y células de levadura, de varios tamaños, flexibles, elásticas y muy estables a situaciones drásticas. Estas bolas permiten el crecimiento de las células de levadura y su regeneración constante, funcionando como cápsulas de células de levadura, sin que se altere las propiedades del portador, y pudiéndose reutilizar un número elevado de veces en condiciones adecuadas y sin pérdida de actividad ni de viabilidad de las células de levadura. El hongo filamentoso sirve como mero portador.

El tamaño de las esferas utilizadas osciló entre 2 y 20 mm de diámetro, con espesores de 0,5 y 1,5 mm respectivamente.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de biocápsulas de levaduras, **caracterizado** porque comprende la operación de provocar una co-inmovilización espontánea entre dos microorganismos, a saber, un hongo filamentoso y una levadura, creando artificialmente las condiciones adecuadas para inducir la correspondiente simbiosis entre ambos microorganismos, y todo ello en ausencia de soportes físico-químicos convencionales.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque una primera de entre las citadas condiciones adecuadas para inducir dicha simbiosis, es el empleo de un medio de cultivo provisto de una fuente de carbono utilizable por dicho hongo filamentoso y no utilizable por dicha levadura.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque dicha fuente de carbono está seleccionada entre ácido glucónico, almidón, celulosa, inulina y otras moléculas coloidales relacionadas.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque una segunda de entre las citadas condiciones adecuadas para inducir dicha simbiosis, es el empleo de un medio de cultivo tamponado, para controlar que el pH no baje hasta un valor en el que mueran las células de levadura.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque una tercera de entre las citadas condiciones adecuadas para inducir dicha simbiosis, es el empleo de un medio de cultivo permanentemente agitado que permita la formación de dichas biocápsulas que tienen forma esférica con un diámetro comprendido entre unos milímetros y varios centímetros.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho hongo filamentoso se escoge entre los de las especies *Aspergillus* y *Penicillium*.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicha levadura se selecciona entre las razas de *Saccharomyces cerevisiae*.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque dicha raza de levadura es *capensis*.

9. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque dicha raza de levadura es *bayanus*.

10. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque dicho pH se mantiene entre 3 y 7 durante la operación de co-inmovilización por simbiosis de dicho hongo y dicha levadura.

11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque otras condiciones adicionales para inducir dichas simbiosis, incluyen llevar a cabo el cultivo a una temperatura de incubación de 20-30°C a una velocidad de agitación de 90-270 rpm, y durante un periodo de tiempo de 24 horas a 120 horas.

12. Biocápsulas obtenidas por el procedimiento definido por una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 anteriores, **caracterizadas** por tener forma de esferas huecas, cuya pared presenta una superficie lisa compuesta por micelio de dicho hongo y células de dicha levadura atrapadas, limitando dicha pared un espacio interior parcialmente ocupado por células de levadura libres y otras asociadas a hifas, formando racimos.

13. Biocápsulas según la reivindicación 12, **caracterizadas** porque dichas esferas tienen un diámetro comprendido entre 0,2 mm y 5 cm.

14. Utilización de las biocápsulas definidas en las precedentes reivindicaciones 12 y 13, como agentes de fermentación en procesos fermentativos industriales.

15. Utilización según la reivindicación 14, **caracterizada** porque dichos procesos fermentativos están destinados a la producción de etanol a partir de una fuente de carbono seleccionada entre melazas, almidón, celulosa e inulina.

16. Utilización de las biocápsulas definidas en las precedentes reivindicaciones 12 y 13, como soporte para otros biocatalizadores en procesos de obtención y recuperación de productos industriales de alto valor añadido.

17. Utilización de las biocápsulas definidas en las precedentes reivindicaciones 12 y 13, para la obtención de bebidas fermentadas.

18. Utilización de las biocápsulas definidas en las precedentes reivindicaciones 12 y 13, para la clarificación de líquidos en procesos industriales.

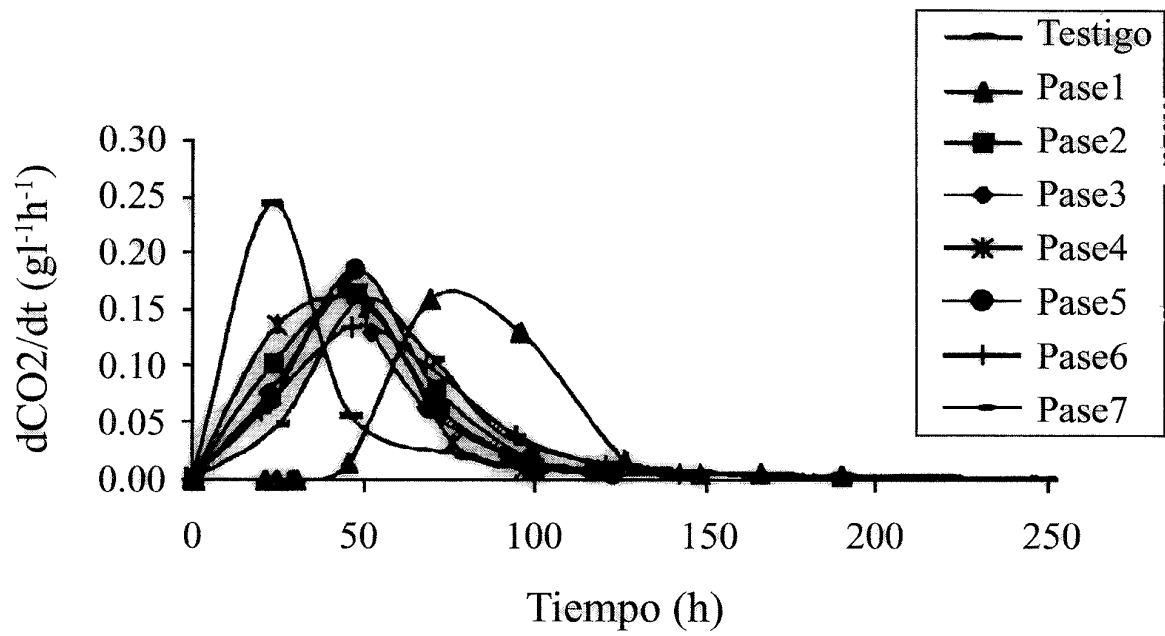


FIG.1



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 204 316

② Nº de solicitud: 200202181

③ Fecha de presentación de la solicitud: 25.09.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 11/16, C12P 39/00, 7/08

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ABOUZIED MM et al. Direct fermentation of potato starch to etanol by cocultures of <i>Aspergillus niger</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Appl. Environ. Microbiol., Noviembre 1986, Vol. 52, Nº 5, páginas 1055-1059.	1-4,6,7,10
Y	US 5037740 A (TANAKA HIDEO et al.) 06.08.1991, columna 2; reivindicaciones.	1-10,12-18
Y	ABATE C et al. Ethanol production by a mixed culture of flocculent strains of <i>Zymomonas mobilis</i> and <i>Saccharomyces</i> sp. Appl. Microbiol. Biotechnol., Junio 1996, Vol. 45, nº 5, páginas 580-583.	1-10,12-18
A		11

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

14.10.2003

**Examinador**

J. Manso Tomico

**Página**

1/1