(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 773 522**

(21) Número de solicitud: 201930018

(51) Int. CI.:

A23F 5/24	(2006.01)	***C12N 1/20***	(2006.01)
C12P 1/04	(2006.01)	*C12R 1/125*	(2006.01)
C12P 21/02	(2006.01)		
A23L 33/105	(2006.01)		
A23L 29/10	(2006.01)		
A62D 3/33	(2007.01)		
C09K 17/00	(2006.01)		
A61K 36/74	(2006.01)		

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

10.01.2019

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

13.07.2020

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
HOSPITAL REAL. AVDA. DEL HOSPICIO S/N
18071 GRANADA ES

(72) Inventor/es:

RUFIÁN HENARES, José Ángel;
GARCÍA ROMÁN, Miguel;
ALTMAJER VAZ, Deisi;
FERNÁNDEZ ARTEAGA, Alejandro;
PASTORIZA DE LA CUEVA, Silvia y
PEGALAJAR ROBLES, María Encarnación

(54) Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE SUBPRODUCTOS A PARTIR DE RESIDUOS DE CAFÉ Y APLICACIONES DE LOS MISMOS**

(57) Resumen:

Procedimiento de obtención de subproductos a partir de residuos de café y aplicaciones de los mismos.

La presente invención consiste en un proceso de fermentación a partir de los posos del café que da lugar a un extracto rico en surfactantes y melanoidinas que puede ser utilizado como tal, o bien puede ser purificado para obtener compuestos aislados con un alto valor, que pueden ser utilizados en el campo de los alimentos funcionales, cosmética, biorremediación de suelos y aguas contaminados por metales pesados o aceites industriales.

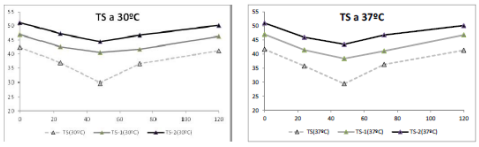


Figura 1

ES 2 773 522 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE SUBPRODUCTOS A PARTIR DE RESIDUOS DE CAFÉ Y APLICACIONES DE LSO MISMOS

CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se enmarca en el campo de la ingeniería química, en particular, dentro del campo de los procesos biotecnológicos, y más concretamente en aquellos que emplean residuos de café como material de partida.

Los productos obtenidos según los procedimientos indicados en la presente invención se destinan al sector de los procesos de-descontaminación de suelos y aguas, en particular en lo que se refiere en la eliminación de metales pesados y compuestos hidrofóbicos. Por otra parte, dichos productos también pueden emplearse para la formulación de alimentos funcionales, formulación de cosméticos, como transportadores de fármacos o para la elaboración de fertilizantes con propiedades biofortificantes.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Características de los residuos de la industria del café

La industria del café genera cantidades significativas de subproductos del café. Entre ellos, los posos de café (SCG, del inglés "*spent coffee grounds*") son el residuo sólido obtenido principalmente del tratamiento del polvo de café crudo con agua caliente o vapor para la preparación del café instantáneo [Mussatto et al., 2011; Mussatto, S.I., Carneirob, L.M., Silvab, J.P.A., Robertob, I.C., Teixeiraa, J.A. (2011)a. *A study on chemical constituents and sugars extraction from spent. Carbohydrate Polymers* 83: 368-374.]. Se estima que a partir de una tonelada de café verde se producen, de media, alrededor de 650 kg de posos de café. [Murthy et al. 2012; Murthy, P.S., Naidu, M.M. (2012). Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products . Food and Bioprocess Technology, 5(3), 897-903].

Se considera que los SCGs son una fuente rica de carbohidratos (45,3%; principalmente manosa y galactosa, [Mussatto et al., 2011], proteínas (13,6%, [Mussatto et al., 2011], así como compuestos bioactivos como polifenoles y melanoidinas [Murthy y Madhava, Naidu, 2010; Murthy, P.S., Naidu, M.M. (2012). *Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional*

Compounds from Coffee Industry By-Products. Food and Bioprocess Technology, 5(3), 897-903],[Rufián-Henares et al., 2007; Ruffian-Henares J.A. y Morales F.J. (2007). *Effect of in vitro enzymatic digestion on anti-oxidant activity of coffee melanoidins and fractions*. Journal of Agricultural Food Chemistry. 55: 10016-10021.]. La extracción de diferentes compuestos a partir de SCG, como polisacáridos, aceite y antioxidantes naturales, se ha descrito anteriormente, por ejemplo en [Simões et al., 2013; Simões, J., Nunes, F.M., Domingues, M.R., Coimbra, M.A. (2013) *Extractability and structure of spent coffee ground polysaccharides by roasting pre-treatments. Carbohydrate Polymers,* 97 (1): 81-89], [Barbosa et al., 2014; Barbosa, H.M.A., De Melo, M.M.R., Coimba M.A., Passos, C.P., Silva, C.M. (2014). *Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology*. Journal of Supercritical Fluids 85: 165-172.], [Ranic et al. 2014; Ranic, M., et al. (2014). *Optimization of microwave-assisted extraction of natural antioxi-dants from spent espresso coffee grounds by response surface methodology*, Journal of Cleaner Production 80: 69–79.], o [Jiménez-Zamora et al., 2015; Jiménez-Zamora, A., Pastoriza, S., Rufián-Henares, J.A. (2015) *Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties*. LWT - Food Science and Technology, 61 (1): 12-18].

También se han hecho varios intentos para agregar valor a los posos de café. Por ejemplo, algunos estudios consideraron su aplicación para la producción de enzimas, polihidroxialcanoatos [Murthy y Naidu, 2012; Murthy, P.S., Naidu, M.M. (2012). *Production and Application of Xylanase from Penicillium sp. Utilizing Coffee By-products*. Food and Bioprocess Technology, 5(2): 657-664] y biocombustibles [Rocha et al., 2014; Rocha, M.V.P., et al. (2014). *Ultrasound-assisted production of biodiesel and ethanol from spent coffee grounds*. Bioresource Technology 167: 343-348], entre otros bioproductos. También se ha descrito su uso como adsorbente [Franca et al., 2009; Franca, A.S., Oliveira, L.S., Ferreira, M.E. (2009) *Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds.* Desalination, 249 (1): 267-272] y como componente en productos alimenticios y bebidas (Sampaio et al., 2011; Sampaio, A.R.M., Mussatto, S.I., Dragone, G., Oliveira, J.M.M., Teixeira, J.A. (2011) E*laboration of distilled beverage from spent coffee ground*.6th International CIGR Technical Symposium - Towards a Sustainable Food Chain: Food Process, Bioprocessing and Food Quality Management, 4 p).

Por otro lado, varios investigadores han realizado estudios sobre las propiedades químicas, funcionales y estructurales de los SCG, así como sobre su biodegradabilidad [Ballesteros et al., 2014; Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I. (2014) *Chemical, Functional, and*

Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. Food and Bioprocess Technology 7 (12): 3493-3503.; Simões et al., 2013; Simões, J., Nunes, F.M., Domingues, M.R., Coimbra, M.A. (2013) *Extractability and structure of spent coffee ground polysaccharides by roasting pre-treatments*. Carbohydrate Polymers 97 (1): 81-89; Pujol et al., 2013; Pujol, D., Liu, C., Gominho,J., Olivella, M.A., Fiol, N., Villaescusa, I., Pereira, H. (2013). *The chemical composition of exhausted coffee waste. Industrial Crops and Products* 50: 423-429.].

Sin embargo, el solicitante no conoce ningún documento que describa la producción de biosurfactantes, y en particular de lipopéptidos, empleando SCG como principal fuente de carbono.

Aplicaciones de los componentes de los posos de café

La capacidad quelante de los lipopeptidos, y en particular de la surfactina, ha sido reportada en distintos artículos científicos [Singh & Cameotra, 2014; Singh, A.K., Dhanjal, S., Cameotra, S.S. (2014) S*urfactin restores and enhances swarming motility under heavy metal stress*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 116: 26-31.], [Singh & Cameotra, 2013; Singh, A.K., Cameotra, S.S. (2013) *Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil.* Environmental Science and Pollution Research 20 (10): 7367-7376] o [Chen et al. 2011; Chen, H.-R., Chen, C.-C., Reddy, A.S., Chen, C.-Y., Li, W.R., Tseng, M.-J., Liu, H.-T., Pan, W., Maity, J.P., Atla, S.B. (2011) *Removal of mercury by foam fractionation using surfactin, a biosurfactant.* International Journal of Molecular Sciences, 12 (11): 8245-8258]. Por ejemplo, en [Singh & Cameotra (2013); Singh, A.K., Cameotra, S.S. (2013) E*fficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil.* Environmental Science and Pollution Research 20 (10): 7367-7376] se muestran estudios de descontaminación de suelos contaminados con hidrocarburos y metales pesados. De acuerdo con estos investigadores, el uso de disoluciones de surfactina próximas a la CMC conllevó a una reducción significativa en la concentración de los siguientes metales: cadmio (44.2 %), cobalto (35.4 %), plomo (40.3 %), niquel (32.2 %), cobre (26.2 %) y zinc (32.07 %). Por otro lado, en [Chen et al. (2011)] se muestran ensayos en columna de burbujeo usando un agua contaminada con mercurio y diferentes surfactantes (SDS, Tween 80 y surfactina). Los mejores resultados de eficiencia de recuperación del mercurio han sido obtenidos con la surfactina, a concentraciones equivalentes a 10 veces su concentración micelar crítica (CMC).

Por otro lado, las melanoidinas provenientes de los posos de café presentan conocida actividad secuestrante de metales pesados, y más específicamente hierro. En este sentido, se destacan los trabajos [Morales, F. J.; Fernandez-Fraguas, C.; Jiménez-Pérez, S. I*ron binding ability of melanoidins from food and model systems*. Food Chem. 2005, 90, 821–827] o [Rufián-Henares, J.A.; de la Cueva, S.P. *Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins – A Study of Their Metal-Chelating Properties.* J. Agric. Food Chem. 2009, 57(2), 432-438)].

No se conocen documentos que relacionen la capacidad quelante de las melanoidinas con otros metales pesados, los cuales tienen una potencial actividad tóxica a nivel humano y medioambiental.

Procedimientos de aprovechamiento industrial de los residuos del café

Actualmente, existen diversas aplicaciones para la valorización de los residuos del café. Entre ellas destacan las siguientes:

- Uso como alimento para animales (como rumiantes, cerdos, gallinas y conejos) debido al gran contenido de proteínas y minerales que presentan, pero el inconveniente es que la cantidad de lignina que presentan hacen que esta sea perjudicial ya que les reduce la producción de leche y carne.
- Producción de bioetanol. La presencia en los posos de hemicelulosa, celulosa y lignina permite que este residuo pueda ser utilizado para la producción de etanol mediante su fermentación. Pero, el principal problema es la estructura lignocelulosa que posee una compleja degradación y que gran cantidad de residuos poseen características que permiten su uso para la fabricación de etanol.
- Producción de biodiesel. Los posos de café son potencialmente útiles para la producción de biodiesel debido a su alto contenido en lípidos. Estudios realizados muestran que el biodiesel obtenido a partir de los posos de café mezclado con petroleo en las proporciones 5% biodiesel y 95% petróleo (B5) y 20% biodiesel y 80% petróleo (B20) cumple con las especificaciones de las normas de ASTM (American Society for Testing Materials) y EN (Estándares Europeos), aunque el biodiesel puro, no. Estas investigaciones están dejando paso a implantaciones de empresas con estos fines, como es el caso de la empresa inglesa Bio-Bean que produce biodiesel a partir de los residuos generados por un grupo de cafeteras de Londres. Sin embargo la dispersión del producto de partida necesitaría de un precio de venta superior al biodiesel obtenido por otras fuentes para rentabilizar el proyecto en ciudades de un tamaño normal.

- Uso como bioadsorbente. La presencia de minerales extractivos, polisacáridos, lignina, polifenoles y taninos condensados hace del poso de café un potente bioadsorbente, por ello se están investigando su uso en la eliminación de metales pesados como el cobre. [Brienzo, M., Chiyanzu, I., García-Aparicio. M.P., Görgens. J. (2014) Spent coffee ground mass solubisation by steam explosion and enzymatic hydrolysis. Appl Biochem Biotechnol], [EP0366837 B1].
- En la formulación de cosméticos por sus propiedades emolientes, anticelulíticas, antienvejecimiento, antimicrobiano, antifúngicas, etc. de alguno de sus componentes, tras los procesos de extracción y purificación.
- Uso en productos de alimentación saludable (bebidas adelgazantes, energizantes, etc).
- Para la producción de enzimas a partir de los residuos del café, aunque todavía está en un estado de técnica embrionario.
- Aprovechamiento energético. Tuvo un breve desarrollo a principios de los 90 en Holanda pero se abandonó la línea, dada la escasa viabilidad económica en comparación con otras fuentes de energía.
- Obtención de biochar. En esta aplicación se presentan problemas similares a la anterior. Todavía no hay nada desarrollado en escala productiva.

Puede encontrarse una revisión sobre estas aplicaciones en [ISBN: 978-0-12-811290-8. *Handbook of Coffee Processing By-Products*].

Talasemia

Las personas con beta talasemia grave necesitarán transfusiones de sangre. Y dado que este tratamiento puede provocar la sobrecarga de hierro, también tendrán que recibir tratamiento para eliminar el exceso de hierro. En la actualidad existe un medicamento por vía oral llamado deferasirox puede ayudar a eliminar el exceso de hierro. Este fármaco está compuesto por deferoxamina, ligando tridentado que se une al Fe con una alta afinidad (en una proporción de 2:1), promoviendo la excreción de Fe, principalmente por heces.

Sería conveniente disponer de nuevos fármacos o composiciones farmacéuticas o nutracéuticas que permitan capturar una mayor cantidad de Fe y favorecer su eliminación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de subproductos, que contienen biosurfactantes (surfactina) y melanoidinas, a partir de posos del café mediante un proceso de fermentación.

Aunque dicho producto puede ser obtenido en presencia de cualquier cepa de bacterias de la especie *Bacillus subtilis,* se destaca el uso de la cepa CECT 9462 (número de depósito CECT 9462) depositada el 26 de Octubre de 2017 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por la Universidad de Granada.

A diferencia de la mayoría de métodos actualmente conocidos, en la presente invención se presenta de forma novedosa un proceso de producción relativamente sencillo y rápido, cuya materia prima básica (posos del café) se constituye en una fuente residual abundante de la industria alimentaria y la hostelería y que permite obtener de forma simultánea biosurfactantes y melanoidinas.

Precisamente, como los subproductos obtenidos por el procedimiento que se describe en esta invención son ricos en melanoidinas y biosurfactantes, también son objeto de la invención procedimientos de obtención separada de melanoidinas o surfactinas a partir del subproducto obtenido por el procedimiento del primer aspecto de la invención.

En otro aspecto, la invención describe un procedimiento para obtener subproductos ricos en surfactantes y melanoidinas que añade biosurfactantes producidos a partir de otras fuentes de carbono diferentes a los posos de café al subproducto obtenido por el procedimiento del primer aspecto de la invención.

Los subproductos obtenidos presentan alto valor añadido, bien sea por su actividad antioxidante, actividad prebiótica, capacidad emulsionante, capacidad quelante de metales, pudiendo ser empleados directamente tanto en el campo de los alimentos funcionales, como en la cosmética, biorremediación de suelos y aguas, biofortificación agronómica, entre otros.

Debido a la capacidad secuestrante de ambos compuestos (melanoidinas y surfactina), dichos subproductos son capaces de eliminar cantidades importantes de metales pesados por simple mezclado y, una vez secuestrados, los metales pesados y el producto pueden ser

retirados del efluente por simple precipitación ácida, lo que supone un importante avance en el tratamiento de las aguas residuales generadas en dicha operación. Asimismo, debido a su acción interfacial, su uso está también especialmente indicado en procesos de descontaminación de suelos contaminados conjuntamente con compuestos hidrofóbicos y metales pesados, pudiendo ser recuperado o separado tras su uso mediante procesos de flotación o fraccionamiento por espumas.

En ese sentido, en otro aspecto, la invención también se refiere a un método de descontaminación de aguas y otros efluentes que comprende la puesta en contacto del líquido contaminado con metales pesados con los subproductos obtenibles por los procedimientos objeto de la invención, y en particular con melanoidinas.

En otro aspecto, la invención también se refiere al uso de los subproductos obtenibles por los procedimientos objeto de la invención, en particular al uso de melanoidinas, para el tratamiento de talasemia y otras enfermedades que cursan con un exceso de hierro en la sangre.

Otros aspectos de la invención son:

- Alimentos funcionales que comprenden el extracto obtenido por el procedimiento de fermentación de la invención.
- Cosméticos que comprenden el extracto obtenido por el procedimiento de fermentación de la invención
- Abonos para biofortificación agronómica de alimentos de origen vegetal (hortalizas, legumbres y cereales) que comprenden el extracto obtenido por el procedimiento de fermentación de la invención.

La aplicación de dicho subproducto puede ser realizada tanto a partir del extracto crudo obtenido tras fermentación y libre de sólidos, como del mismo concentrado y purificado.

Finalmente, también es objeto de la invención la *c*epa CECT 9462, cepa depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo el 26/10/2017, con número de depósito CECT 9462. Así como microorganismos con un alto grado de homología con la cepa cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 90%, 95%, 99%, 99.5%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa CECT 9462, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Evolución temporal de la tensión superficial durante la fermentación con *B. subtilis* CECT 9462: (izquierda) resultados a 30°C; (derecha) resultados a 37°C.
TS: Tensión superficial del medio de cultivo (sobrenadante sin células) (mN/m); TS-1: Tensión superficial de la dilución 1/10 del medio de cultivo (mN/m); TS-2: Tensión superficial de la dilución 1/100 del medio de cultivo (mN/m).

Figura 2. Evolución temporal de la concentración de melanoidinas en el medio de cultivo durante la fermentación con *B. subtilis* CECT 9462. Se muestra en ambos casos en el eje de ordenadas la absorbancia a 420 nm. (izquierda) dilución 1/10 del medio de cultivo (mN/m); (derecha) dilución 1/100 del medio de cultivo.

Figura 3. Actividad interfacial del crudo de surfactina recuperada a las 48 h de fermentación con 8.3 $g.L^{-1}$ de posos de café: (a) relación entre la tension superficial y la concentración de surfactante, (b) valores de la tensión interfacial (IT), ángulo de contacto (AC) e índice de emulsión (E24) a diferentes concentraciones de surfactante.

Figura 4. Cromatograma obtenido para una muestra de biosurfactante crudo liofilizado. A efectos de comparación se ha incluido el cromatograma de un patrón comercial (standard) de surfactina (pureza > 98%).

Figura 5. Caracterización de las melanoidinas obtenidas tras la fermentación en el primer subproducto descrito.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

Se entiende por "*biosurfactante*" cualquier molécula producida por organismos vivos que presente actividad interfacial. Dicha propiedad les confiere diversas aplicaciones, entre las que destacan la detergencia, poder emulgente, lubricación, capacidad espumante y solubilización y dispersión de fases.

El término "*surfactina*" se refiere a una familia de lipopéptidos de origen bacteriano, con un peso molecular de alrededor de 1000 Da, producidos normalmente por bacterias del género

Bacillus que presentan propiedades tensioactivas así como actividad antimicrobiana, antitumoral y fibrinolítica.

El término "*poso de café*" o "*SCG*" (del inglés "*Spent coffee ground*") hace referencia a cualquier residuo molido obtenido durante el proceso de macerado del café, ya sea mediante simple cocción con agua a presión atmosférica o en equipos de presión elevada. Este tipo de residuos conforman el principal residuo de la industria del café, que produce anualmente unos 6 millones de toneladas de SCG. En una realización particular equivalente, este término se puede considerar extendido a un hidrolizado de posos de café.

Se denomina "bacteria *Bacillus subtilis*" a una bacteria del género *Bacillus* y de la especie *subtilis*, Gram positiva. En particular, "*Bacillus subtilis CECT 9462*" o *"Cepa CECT 9462"* es una cepa depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo el 26/10/2017, con número de depósito CECT 9462.

En una realización particular, el término *"Bacilus subtilis* CECT 9462" se empleará también para identificar a microorganismos con un alto grado de homología con la cepa cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 90%, 95%, 99%, 99.5%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa CECT 9462, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.

El término "*concentración micelar crítica*" o "*CMC*" hace referencia al punto de ruptura en la tensión superficial correspondiente frente al logaritmo de concentración de biosurfactante. La tensión superficial se determina según el método UNE-EN 14370:2005. Agentes de superficie. Determinación de la tensión superficial.

Procedimiento de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un producto con alto contenido en surfactantes y melanoidinas a partir de posos de café, en adelante, "*primer procedimiento de la invención*", que comprende la fermentación de los mismos en presencia de microorganismos de la especie *Bacillus subtilis*.

De forma equivalente, el procedimiento de la invención se puede realizar sobre un hidrolizado de posos de café, en lugar de emplear los posos directamente, y fermentar dicho hidrolizado en presencia de la cepa CECT 9462 para obtener productos con alto contenido

en surfactantes y melanoidinas, por lo que el término "*posos de café*" podrá referirse, en una realización particular, a dicho hidrolizado.

En una realización particular, los microorganismos empleados en el proceso de fermentación pertenecen a la cepa *Bacillus subtilis* con número de depósito CECT 9462.

En otra realización particular, los microorganismos empleados en el proceso de fermentación tienen un alto grado de homología con la cepa *Bacillus subtilis* CECT 9462 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 90%, 95%, 99%, 99.5%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa CECT 9462, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.

En otra realización particular, el primer procedimiento de la invención comprende los siguientes pasos:

- inoculación de los microorganismos en un medio de cultivo que contiene los posos de café,
- fermentación,
- separación de los sólidos para la obtención de un extracto líquido crudo, exento de sólidos.

A continuación se describen con mayor detalle cada una de las etapas, así como distintas realizaciones particulares.

Inoculación

El inóculo se administra en una proporción de entre el 5 y el 15% (v/v), preferentemente un 5% (v/v), sobre el volumen total del medio de cultivo.

El término "*medio de cultivo*" se refiere a una solución acuosa, que comprende los posos del café, que permite el crecimiento del microorganismo y la fermentación del sustrato.

En una realización particular, el medio de cultivo está compuesto por 5,0 g L^{-1} de extracto de levadura, 1,0 g L^{-1} de KH_2PO_4, 0,5 g L^{-1} de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g L^{-1} de $CaCl_2$, 0,1 g L^{-1} de NaCl y 0,7 g L^{-1} de peptona, con una concentración de posos de café de entre 5 g L_{-1} a 50 g L^{-1} (db), preferentemente de entre 8 y 18 g L^{-1}.

En una realización particular, en la que se emplea un hidrolizado de posos de café como material de partida, el medio de cultivo será el propio hidrolizado.

Fermentación

En otra realización particular, la temperatura a la que se produce la fermentación está entre 20 y 37ºC, preferentemente, a aproximadamente 30ºC.

En otra realización particular, la fermentación se realiza a pH > 5,5, preferentemente pH = 7, lo que facilita el crecimiento del microorganismo.

En otra realización particular, la fermentación se realiza durante un tiempo comprendido entre 24 y 72 horas, preferentemente comprendido entre 48 y 72h.

De forma preferente, el proceso de fermentación se realiza en matraces bajo sistema de agitación orbital, preferentemente a 160 rpm.

Separación de los sólidos

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación deseado, se separan los sólidos (posos de café y microorganismos) presentes en el caldo de fermentación. Para ello, se pueden emplear distintas formas de separación sólido-líquido, siendo preferente el uso de la centrifugación o más preferentemente por ultra centrifugación a una velocidad igual o superior a 9000 rpm.

En este momento, el medio comprende una cantidad de melanoidinas de hasta el 10 % y de surfactantes superior a su concentración micelar crítica, y se puede aplicar directamente en la elaboración de productos para descontaminación de suelos, o tras su purificación, como emulgente en la elaboración de cosméticos, alimentos funcionales, entre otros.

Esta mezcla se denominará en adelante “*primer extracto de la invención*” o *“primer subproducto de la invención*” y también es objeto de la misma.

En el primer subproducto de la invención la concentración de surfactantes oscila entre 0.02 g/L y 0.3 g/L. Es decir, por cada litro de medio de cultivo se pueden obtener entre 0.02 g y 0. 3g de biosurfactante puro.

En particular, la concentración de surfactinas es de entre 1,5 y 50 veces superior a su concentración micelar crítica.

Asimismo, en dicho subproducto la concentración de melanoidinas es de entre 0,1 y 10% p/p.

El procedimiento de la invención ofrece los siguientes datos de rendimiento medio de cada subproducto respecto al peso total de los posos de café de partida:

- Melanoidinas: alrededor del 1 % (p/p)
- Surfactantes: alrededor del 0,25% (p/p)
- Polifenoles: alrededor de 7 % (p/p)
- Posos de café “agotados”, aptos para su empleo como biomasa: 90 % (p/p)

En distintas realizaciones particulares, el procedimiento de la invención se puede completar con pasos adicionales, optativos:

Recuperación y conservación del subproducto.

En una realización preferente, el extracto crudo obtenido tras separación de los sólidos (posos de café y microorganismos), se somete a un proceso de acidificación, a pH de entre 1 y 4, preferentemente 2, y a temperaturas de entre 2ºC y 15ºC, preferentemente a 4ºC, durante 12 horas. Los surfactantes y las melanoidinas precipitadas se recuperan mediante centrifugación. A continuación, los sólidos colectados, en adelante “*segundo subproducto de la invención*” son disueltos con agua milli-Q y su pH ajustado a 7.

Opcionalmente, para su mejor conservación, el producto así obtenido se somete a un proceso de liofilización.

Purificación del producto.

Tras la precipitación ácida, el segundo subproducto de la invención puede ser purificado usando diferentes técnicas, entre las que se destaca los procesos de extracción con solventes y los procesos de filtración con membrana.

Con esta purificación se consigue que este segundo subproducto cumpla requisitos más exigentes para su uso en alimentación o cosmética.

Así, en una realización particular, las melanoidinas se extraerán del segundo subproducto de la invención con disolventes orgánicos polares a una temperatura comprendida entre 40 y100ºC.

De modo particular, las melanoidinas se extraerán del segundo subproducto de la invención empleando agua como disolvente polar. Preferentemente se emplea agua a una temperatura de entre 50 y 90ºC

El tiempo de extracción necesario está comprendido entre 5 a 45 minutos, preferentemente entre 10 y 20 minutos.

Posteriormente se separará el sobrenadante del residuo sólido mediante decantación, filtración o cualquier otro método físico-químico similar.

El aislamiento de las melanoidinas se puede llevar a cabo mediante diafiltración, ultrafiltración o cualquier otro procedimiento que permita separar compuestos con distinto peso molecular.

Preferiblemente se utilizará la diafiltración con una membrana que retenga compuestos de peso molecular mayor a 20 kDa, aunque se pueden utilizar membranas a menor tamaño molecular.

Este proceso de aislamiento se realizará preferentemente a temperatura ambiente y presión de entre 1 a 3 bar, aunque alternativamente se puede realizar a alta presión-temperatura para mejorar el rendimiento de la filtración.

Tras la anterior concentración del líquido se desecha el eluato y el retentato se lava con agua hasta llevarlo al volumen original. Se repite el proceso de concentración-lavado al menos 2 ciclos más.

Finalmente las melanoidinas se secarán mediante distintos mecanismos (desecación en estufa, liofilización o cualquier otro medio similar de eliminación del agua), alcanzando una pureza de hasta el 99 %.

Hidrólisis previa

Como se ha comentado previamente, en otra realización particular, especialmente diseñada para producir extractos ricos en surfactinas, los posos de café se someten a hidrólisis, preferentemente hidrólisis a alta presión, usando la fracción líquida de la mezcla resultante como medio de cultivo inicial para el procedimiento de la invención.

En otra realización particular, los posos de café se someten previamente a una extracción de melanoidinas antes del proceso de hidrólisis. Una vez fermentado el licor resultante de la hidrolisis de los posos de café, se pueden añadir las melanoidinas obtenidas previamente en la etapa de extracción.

La proporción de melanoidinas que se añade variará en función de la aplicación particular que se desee dar a este tercer subproducto de la invención.

Enriquecimiento del medio con melanoidinas.

En otra realización particular, el procedimiento comprende la adición de melanoidinas tras la parada del proceso de fermentación, consiguiendo así evitar la proliferación de nuevos microorganismos.

En una realización preferente, la adición de melanoidinas se realiza añadiendo un extracto de melanoidinas obtenido mediante una hidrólisis previa de los posos de café, en particular, según la etapa de hidrólisis previa descrita previamente

Consideraciones sobre el material de partida

En otra realización particular, el tamaño de partícula de los posos de café empleados varía entre menos de 50 micras y 2 mm, por lo que en una realización preferente, el procedimiento comprende un paso previo de tamizado en el que se homogeneiza el tamaño de partícula de los posos de café eliminando las partículas de más de 2 mm. En realización preferente, el procedimiento comprende un paso previo de tamizado en el que se homogeneiza el tamaño de partícula de los posos de café eliminando las partículas de más de 1 mm.

Esta homogeneización se puede realizar mediante triturado y tamizado de los posos de café.

Subproductos de la invención

También son objeto de la presente invención los distintos extractos o subproductos que se pueden obtener mediante el procedimiento de la invención (en adelante "*subproductos de la invención*").

Por un lado, la invención se refiere a un subproducto, tercer subproducto de la invención, obtenible mediante el procedimiento de la invención, que comprende entre un 0,1 y 1 % de surfactinas y entre un 3 y 5% de melanoidinas.

Por otro lado, la invención se refiere a un subproducto rico en surfactinas, cuarto subproducto de la invención, obtenible mediante el procedimiento de la invención que contiene más de un 0,1% (p/v), preferentemente más de un 0,5% (p/v) de surfactinas.

Por otro lado, la invención se refiere a un subproducto rico en melanoidinas, quinto subproducto de la invención, obtenible mediante el procedimiento de la invención y tras una etapa adicional de extracción, que contiene más de un 3% (p/v), preferentemente más de un 4% (p/v) de melanoidinas.

Los distintos subproductos de la invención tienen diferentes aplicaciones, entre las que destacan las siguientes, que también son objeto de la invención.

Biorremediación

La invención también se refiere a un método de descontaminación, mediante la eliminación de metales pesados, de suelos, aguas, y otros efluentes que comprende la puesta en contacto del material contaminado con metales pesados con los subproductos de la invención.

Equivalmentemente, la invención se refiere a un producto o composición que comprende alguno de los subproductos de la invención para la eliminación de metales pesados presentes en medios contaminados, como suelos, aguas, y otros efluentes.

En una realización particular, se emplearán volúmenes de 10 mL de disoluciones de 0,2-10 g/L de cualquier subproducto de la invención, preferentemente del tercer o quinto subproducto de la invención para descontaminar 10 g de suelo contaminado con metales pesados como por ejemplo cobre, plomo o arsénico. De esta manera la concentración en suelos varía de entre y un 0,02% y un 1% en peso de suelo a descontaminar.

La invención también se refiere al uso de melanoidinas para descontaminación de suelos, aguas, y otros efluentes que comprende la puesta en contacto del material contaminado con metales pesados con melanoidinas.

En una realización particular, se emplearán 0,2-10 g/L de melanoidinas para descontaminar 10 g de suelo contaminado con metales pesados como por ejemplo cobre, plomo o arsénico.

Elaboración de alimentos funcionales ricos en hierro y otros metales

La capacidad quelante de las melanoidinas las hace aptas para la elaboración de alimentos funcionales, por lo que también son objeto de la presente invención alimentos funcionales, en particular prebióticos, que comprenden melanoidinas, y en particular que comprenden alguno de los subproductos de la invención.

Para elaborar alimentos funcionales ricos en hierro y otros minerales, se aislarán en primer lugar las melanoidinas obtenidas de posos de café o de alguno de los subproductos de la invención, o bien se empleará directamente alguno de los subproductos de la invención, y se disolverán en una solución del mineral a enriquecer (hierro, cobre, cinc, selenio, yodo, etc.).

Tras dejar en incubación a temperatura ambiente durante 12 horas, se realiza una ultrafiltración con una membrana de 10 kDa, quedando las melanoidinas retenidas, y se lava 2 veces con agua. Finalmente el extracto de melanoidinas se secará por atomización.
Este último extracto se empleará como alimento funcional o formará parte de un alimento funcional. Un ejemplo del efecto de dichos alimentos se describe en la Tabla 1. Asimismo, la actividad prebiótica de un subproducto de la invención se puede ver en la tabla 2.

Fe (ppm) quelado inicial	**Cu (ppm) quelado inicial**	**Porcentaje de Fe quelado**	**Porcentaje de Cu quelado**	**Fe (ppm) liberado tras digestión y fermentación**	**Cu (ppm) liberado tras digestión y fermentación**
191,6	158	49,48	44,53	69,60	87,66

Tabla 1: ejemplo del electo de uno de los alimentos funcionales confeccionados con un subproducto de la invención.

Género bacteriano	Control (% del total de la microbiota)	Extracto (% del total de la microbiota)
Bifidobacterium	0,331	1,049

spp.		
Lactobacilus spp.	0,212	1,610

TABLA 2: Ejemplo de actividad prebiótica de un subproducto de la invención

Tratamiento de la talasemia

Las personas con beta talasemia grave necesitarán transfusiones de sangre. Y dado que este tratamiento puede provocar la sobrecarga de hierro, también tendrán que recibir tratamiento para eliminar el exceso de hierro. Un medicamento por vía oral llamado deferasirox puede ayudar a eliminar el exceso de hierro. Este fármaco está compuesto por deferoxamina, ligando tridentado que se une al Fe con una alta afinidad (en una proporción de 2:1), promoviendo la excreción de Fe, principalmente por heces. En este caso, las melanoidinas de café tienen igualmente una absorción digestiva baja y excreción por heces, similar a la de la deferoxamina. Sin embargo, mientras la deferoxamina es capaz de quelar 99,8 mg Fe/g, ensayos in vitro nos han permitido determinar que las melanoidinas de café son capaces de quelar 191,6 mg Fe/g, duplicando así la potencia de la deferoxamina.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de melanoidinas para el tratamiento de talasemia

En una realización particular, la invención se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los suproductos de la invención para el tratamiento de talasemia, preferentemente un extracto de melanoidinas con el 99% de pureza.

El uso como medicamento podría realizarse a través de cápsulas de gelatina blanda con melanoidinas extraídas de posos de café o de cualquier otro subproducto alimenticio que haya sido procesado térmicamente. Estas cápsulas se podrían ingerir con la comida, disgregándose en el estómago, de forma que quelarán el hierro de la dieta, favoreciendo su excreción. Estas cápsulas se podrían utilizar en todas aquellas patologías que cursen con una hemoscromatosis (contenido elevado en sangre de hierro).

MODOS DE REALIZACIÓN

Para la producción de biosurfactantes, particularmente lipopéptidos, empleando *Bacillus subtilis* CECT 9462, el tiempo de fermentación se siguió midiendo la concentración de biomasa celular, el pH y la tensión superficial del líquido sobrenadante libre de células

durante el proceso. También se evaluaron la estructura química del biosurfactante, así como sus propiedades interfaciales (como la concentración crítica de micelas, el ángulo de contacto y la tensión interfacial). Además, se evaluó la extracción de melanoidinas y polifenoles, estudiando su relación con la capacidad antioxidante.

El biosurfactante se produjo por fermentación líquida sumergida (SLF) en matraces Erlenmeyer de 500 ml llenos con 200 ml del caldo de cultivo. El biosurfactante se recuperó del sobrenadante libre de células mediante precipitación ácida. El biosurfactante crudo, tras liofilización de 48 horas, presenta un rendimiento de entre 0,35-0,40 g/L con la cepa CECT 9462.

Identificación del biosurfactante.

Para confirmar la presencia de surfactina en el extracto o subproductos, se realizan análisis de espectrometría de masas. La similitud de los espectros de los extractos o subproductos y la surfactina estándar (Sigma, 98% de pureza) es evidente (Figura 4). Por lo tanto, es posible afirmar que el biosurfactante producido es surfactina.

Identificación de las melanoidinas

La Figura muestra la caracterización de las melanoidinas obtenidas tras la fermentación en el primer subproducto descrito.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un producto con alto contenido en surfactantes y melanoidinas a partir de posos de café, que comprende la fermentación de los mismos en presencia de microorganismos de la especie *Bacillus subtilis*.
2. Procedimiento, según reivindicación anterior, en el que los microorganismos empleados en el proceso de fermentación pertenecen a la cepa Bacillus subtilis CECT 9462.
3. Procedimiento, según reivindicación 1, en el que los microorganismos empleados en el proceso de fermentación tienen un alto grado de homología con la cepa *Bacillus subtilis* CECT 9462, cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 90%, 95%, 99%, 99.5%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa CECT 9462, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende los siguientes pasos:
    a. inoculación de los microorganismos en un medio de cultivo que contiene los posos de café
    b. fermentación
    c. separación de los sólidos para la obtención de un extracto crudo, exento de sólidos.
5. Procedimiento, según reivindicación 4, caracterizado por que el inóculo se administra en una proporción de entre el 5 y el 15% (v/v), preferentemente un 5% (v/v), sobre el volumen total del medio de cultivo que comprende los posos de café.
6. Procedimiento, según reivindicaciones 4 o 5, caracterizado por que el medio de cultivo está compuesto por 5,0 g L^{-1} de extracto de levadura, 1,0 g L^{-1} de KH_2PO_4, 0,5 g L^{-1} de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g L^{-1} de $CaCl_2$, 0,1 g L^{-1} de NaCl y 0,7 g L^{-1} de peptona, con una concentración de posos de café de entre 5 g L_{-1} a 50 g L^{-1} (db), preferentemente de entre 8 y 18 g L^{-1}.
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado por que la fermentación se produce a una temperatura de entre 20 y 37ºC, preferentemente, aproximadamente 30ºC.

8. Procedimiento, según reivindicaciones 4 a 7, caracterizado por que la separación de sólidos se realiza por centrifugación o más preferentemente por ultracentrifugación a una velocidad igual o superior a 9000 rpm.
9. Producto obtenido por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Producto, según reivindicación anterior, caracterizado por que la concentración de surfactinas es de entre 1,5 y 50 veces superior a su concentración micelar crítica.
11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende una etapa de acidificación seguida de una etapa de centrifugación.
12. Procedimiento, según reivindicación anterior, caracterizado por que la acidificación se realiza a pH 2 a 4ºC durante 12 horas.
13. Producto obtenido por el procedimiento según reivindicaciones 11 o 12.
14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 11 o 12, que comprende una etapa previa consistente en someter los posos de café a hidrólisis, preferentemente hidrólisis a alta presión y emplear la fracción líquida de la mezcla resultante como medio de cultivo.
15. Procedimiento, según reivindicación anterior, que comprende una extracción de melanoidinas antes del proceso de hidrólisis.
16. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 11, 12, 14 o 15, que comprende la adición de melanoidinas tras la fermentación de los posos de café en presencia de los microorganismos.
17. Procedimiento, según reivindicación anterior, que comprende la adición de las melanoidinas obtenidas antes de la hidrólisis.
18. Producto obtenido por el procedimiento según reivindicaciones 14 a 17.
19. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 11, 12, o 14 a 17, que además comprende una etapa previa de tamizado de los posos de café en el que se eliminan partículas con tamaño superior a 2mm, preferentemente con tamaño superior a 1mm.
20. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 11, 12, 14 a 17 o 19, caracterizado por que su rendimiento es de al menos 20 mg de surfactante por litro de medio de cultivo.
21. Alimento funcional que comprende un producto según reivindicaciones 9, 10, 13 o 18.
22. Alimento funcional que comprende un producto según reivindicaciones 9, 10, 13 o 18 que comprende al menos un 99% de melanoidinas.

23. Composición para la eliminación de metales pesados en medios contaminados que comprende un producto según reivindicaciones 9, 10, 13 o 18.
24. Composición para la eliminación de metales pesados en medios contaminados que comprende un producto según reivindicaciones 9, 10, 13 o 18 que comprende al menos un 99% de melanoidinas.
25. Composición para el tratamiento de talasemia que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un producto según reivindicaciones 9, 10, 13 o 18.
26. Composición para el tratamiento de talasemia que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un producto según reivindicaciones 9, 10, 13 o 18 que comprende al menos un 99% de melanoidinas.
27. Microorganismo perteneciente a la especie *Bacillus subtilis* 9462 (número de depósito CECT 9462) depositada el 26/10/2017 por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y/o microorganismo con un alto grado de homología con la cepa CECT 9462 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 99,6%, 99,7%, 99,8% o el 99,9% con la secuencia de ADN de la cepa CECT 9462, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.

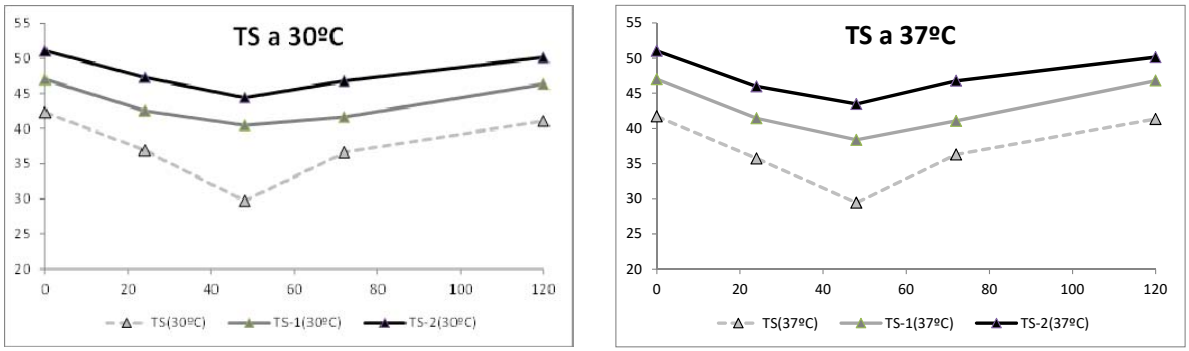


Figura 1

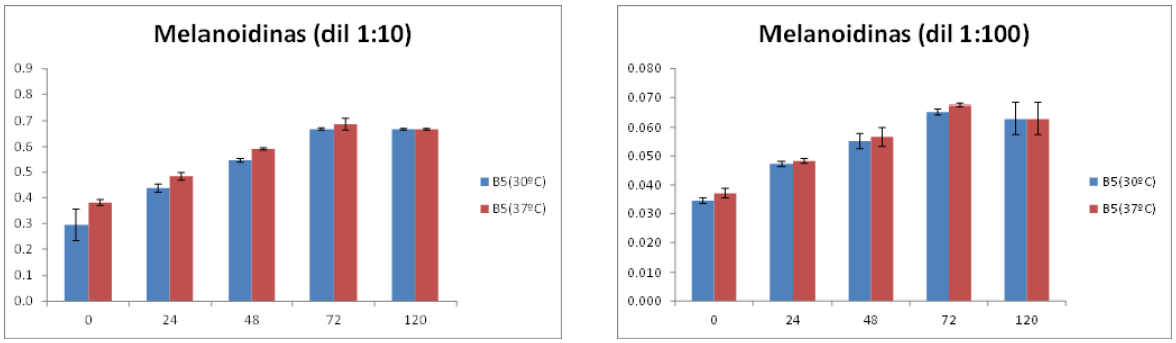
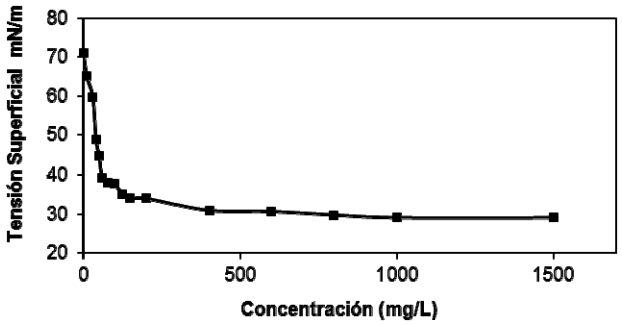
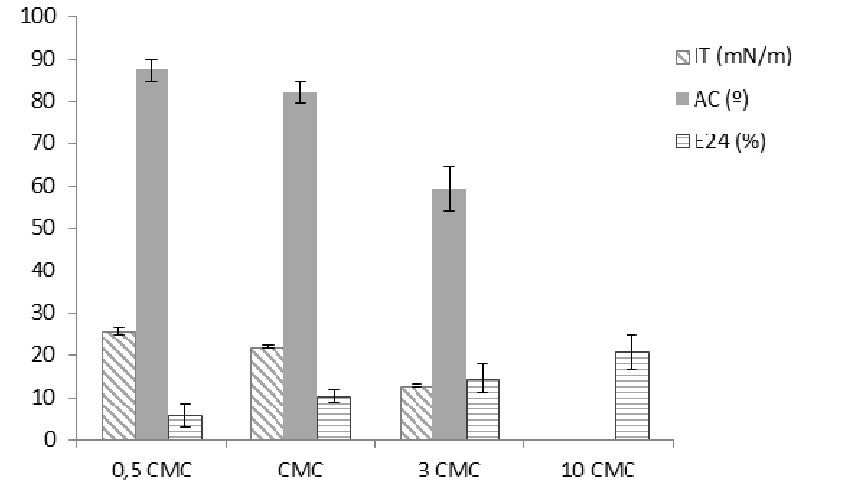


Figura 2


Tensión Superficial mN/m
80
70
60
50
40
30
20
0
500
1000
1500
Concentración (mg/L)

(a)


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
IT (mN/m)
AC (º)
E24 (%)
0,5 CMC
CMC
3 CMC
10 CMC

(b)

Figura3

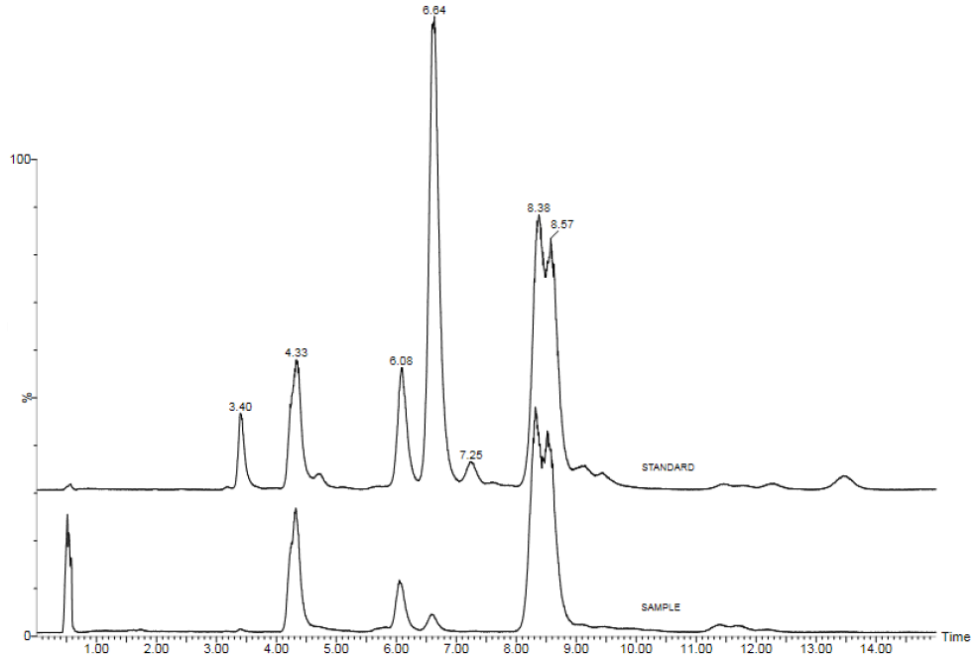


Figura 4

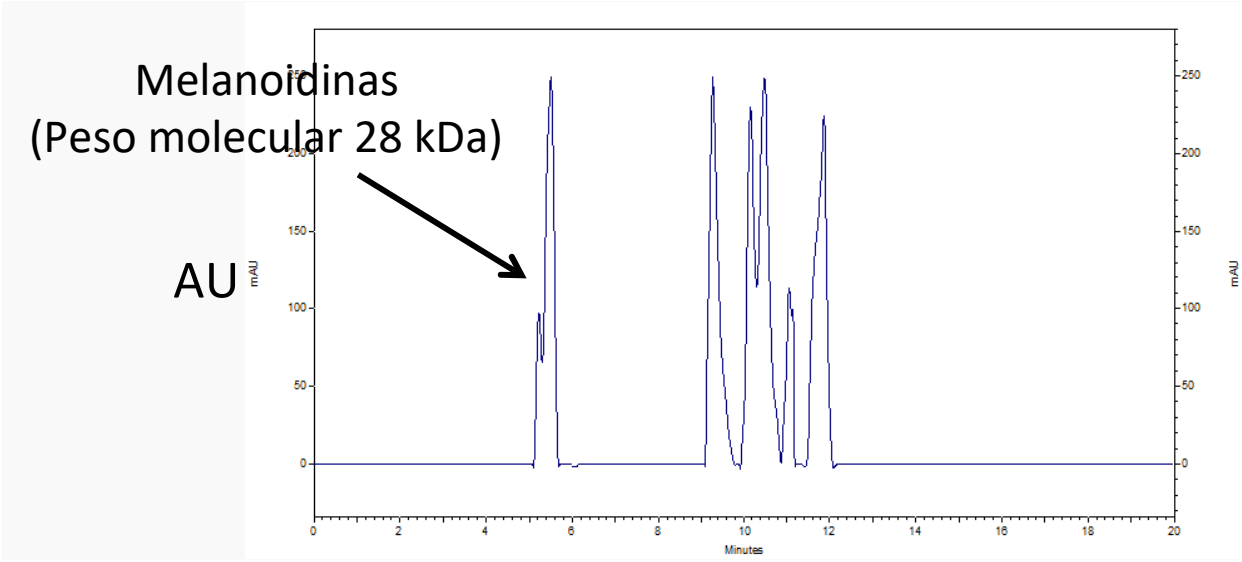


Figura 5

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201930018

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 10.01.2019

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KR 20170071066 A (UNIV KONKUK IND COOP CORP) 23/06/2017, resumen de la base de datos WPI en EPOQUE, reivindicaciones, párrafo 73.	1, 3-5, 7-10, 19, 21
Y		14-18
Y	KOVALCIK A et al. Valorization of spent coffee grounds: A review. Food and Bioproducts Processing, 2018, vol. 110, páginas 104-119, ISSN 0960-3085 (print), DOI:10.1016/j.fbp.2018.05.002. Apartados 3.3 y 3.4	14-18
Y	YAÑEZ-OCAMPO, G. et al. Utilization of agroindustrial waste for biosurfactant production by native bacteria from Chiapas. Open Agriculture, 2017, vol. 2, páginas 341-349, DOI: 10.1515/opag-2017-0038	1-13, 19, 20, 27
Y	NOGUEIRA FELIX A. et al. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. Colloids and surfaces. 27/11/2018 (on-line), vol. 175, páginas 256 - 263, ISSN 1873-4367 (Electronic), DOI:10.1016/j.colsurfb.2018.11.062 pubmed:30544045	1-13, 19, 20, 27
Y	PARASZKIEWICZ K. et al. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. Journal of Environmental Management, 2018, vol. 209, páginas 65-70, ISSN 0301-4797(print) ISSN 1095-8630(electronic), DOI:10.1016/j.jenvman.2017.12.033	1-13, 19, 20, 27
Y	GURJAR J. and SENGUPTA, B. Production of surfactin from rice mill polishing residue by submerged fermentation using *Bacillus subtilis* MTCC 2423. Bioresource technology, 2015, vol. 189, páginas 243-249, ISSN 1873-2976 (Electronic), DOI:10.1016/j.biortech.2015.04.013 pubmed:25898085	1-13, 19, 20, 27
X	RUFIÁN-HENARES J.et al. Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins-A Study of Their Metal-Chelating Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, vol. 57 (2), páginas 432-438, ISSN 0021-8561, DOI:10.1021/jf8027842	18, 21-26
X	MESÍAS, M. y DELGADO-ANDRADE, C. Melanoidins as a potential functional food ingredient. Current Opinion in Food Science, 2017, vol. 14, páginas 37-42.	18, 21-26

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	Examinador	Página
27.09.2019	A. I. Polo Diez	1/3

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201930018

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 10.01.2019

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :**	Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
A	VELAZQUEZ-ARADILLAS J.C. et al. Characterisation of a biosurfactant produced by a *Bacillus cereus* strain tolerant to cadmium and isolated from green coffee grain. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, vol. 27 (4), páginas 907-913, ISSN 0959-3993(print) ISSN 1573-0972(electronic), DOI:10.1007/s11274-010-0533-1	1-27

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	**Examinador**	**Página**
27.09.2019	A. I. Polo Diez	2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A23F5/24 (2006.01)
C12P1/04 (2006.01)
C12P21/02 (2006.01)
A23L33/105 (2016.01)
A23L29/10 (2016.01)
A62D3/33 (2007.01)
C09K17/00 (2006.01)
A61K36/74 (2006.01)
C12N1/20 (2006.01)
C12R1/125 (2006.01)

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

C12P, A23L, A23F, A62D, C09K, A61K, C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, INTERNET, CAPLUS, FSTA, MEDLINE,BIOSIS, COMPENDEX, BD-TXTE