

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 823**

51 Int. Cl.:

**A23F 3/10** (2006.01)

**A23F 3/16** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12R 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2015 PCT/US2015/043483**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16028483**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2015 E 15833398 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3182835**

54 Título: **Fermentación activa y bebidas y productos fermentados**

30 Prioridad:

**21.08.2014 US 201414465780**

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

**09.02.2021**

73 Titular/es:

**HSU, SHANTUNG (100.0%)  
P.O. Box 15233  
Seattle, WA 98115, US**

72 Inventor/es:

**HSU, SHANTUNG**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

ES 2 804 823 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

Fermentación activa y bebidas y productos fermentados

5 **Sector técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para elaborar un líquido fermentado, particularmente, un procedimiento basado en un cultivo líquido activo para elaborar las bebidas fermentadas.

10 **Estado de la técnica anterior**

La Kombucha es una bebida líquida con color amarillo-ámbar y sabor a sidra ligeramente ácido. La Kombucha se prepara mediante la fermentación de un líquido que contiene té por el llamado hongo "Kombucha". El término "Kombucha" es sinónimo de kombucha, kajnyj kvass (ruso), Kvass, Combuchetränk (alemán), Kargasoktee (alemán), komboecha-drink (holandés), Kombuchakwass (alemán), tea-beer (cerveza de té) y tea-cider (sidra de té) (inglés) en diversas culturas e idiomas. Se cree que la Kombucha tiene propiedades antibióticas y nutrientes que incluyen ácido glucónico, vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido fólico y ácido láctico D(+). El beneficio para la salud de la Kombucha ha sido conocido y apreciado durante generaciones en Asia Oriental, Europa Oriental y Rusia. Se ha probado el efecto terapéutico de la Kombucha en Asia y Rusia y se ha utilizado como medio terapéutico natural. En los últimos años, la Kombucha se ha popularizado en los Estados Unidos, y las bebidas Kombucha producidas comercialmente se distribuyen ampliamente en todo el país.

El "hongo" de Kombucha se refiere a un cuerpo de celulosa simbiótico similar a un hongo que consiste principalmente en levadura, acetobacter, gluconobacter y, a veces, una pequeña cantidad de bacterias del ácido láctico *Lactobacillus bulgaricum*. Las bacterias que se han aislado a partir de Kombucha incluyen *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter ketogenum*, *Acetobacter suboxydans*, *Gluconobacter liquefaciens*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*, entre las cuales *Acetobacter xylinum* es la más importante. Además, se han aislado levaduras a partir de Kombucha, entre las que se incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces inconspicuis*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Debaryomyces hansenii*, *Brettanomyces*, *Kloeckera* y *Zygosaccharomyces bailii*.

Durante el procedimiento de fermentación convencional para elaborar Kombucha, una o más cepas de bacterias ácidas y levaduras forman una relación simbiótica en el líquido de fermentación. En las primeras etapas de la fermentación, las levaduras degradan el azúcar en glucosa y fructosa y las fermentan adicionalmente a etanol, que se suministra a las acetobacterias en el cultivo para que se reproduzcan en grandes cantidades. Posteriormente, las acetobacterias oxidan la glucosa y la fructosa a ácido glucónico y ácido acético, y oxidan el etanol a ácido acético. Algunos estudios muestran que el etanol producido por las levaduras estimula el crecimiento de las acetobacterias para producir más membranas de acetato de celulosa, y ácido acético, mientras que el ácido acético, a su vez, estimula a las levaduras a producir más etanol. La existencia de ácido acético y etanol protege a las acetobacterias y las levaduras de ser infectadas por otros microorganismos. Además, las membranas de acetato de celulosa producidas por las acetobacterias forman el cuerpo flotante similar a un hongo en la parte superior del líquido de fermentación y soportan físicamente las levaduras y las bacterias para permitir una mejor exposición al aire y al oxígeno que se necesitan para la fermentación.

Como el procedimiento de fermentación convencional para elaborar la Kombucha depende de las combinaciones de levaduras y bacterias en el cultivo, el sabor, la calidad y el contenido de la Kombucha varían de un lote a otro. La inconsistencia en la calidad de los productos ha obstaculizado la producción a escala industrial de Kombucha. Además, el procedimiento de fermentación convencional mediante la utilización de la combinación de levaduras y bacterias generalmente tarda entre 7 días y 2 semanas, lo que dificulta aún más la producción a gran escala. Aunque el hongo Kombucha se produce durante el procedimiento de fermentación y se reutiliza para hacer más cultivo, finalmente no logra elaborar la bebida fermentada con el mismo sabor y calidad en unos pocos meses y necesita ser constantemente reemplazado mediante nuevos cultivos.

Además, la Kombucha puede venir con un fuerte sabor acético o alcohólico que disuade a algunos consumidores de beberla y disfrutar de sus beneficios.

La Patente CA 2,197,481 da a conocer un procedimiento para la preparación de una bebida fermentada en el que se prepara un extracto acuoso a partir del 0,5-2 % de té o café, el extracto acuoso, al que se añade azúcar, se recupera y se lleva a cabo una fermentación en una o más etapas, como mínimo, con una cepa de levadura y, como mínimo, una cepa bacteriana, los insolubles se separan de la bebida fermentada y esta se trata, a continuación, con calor. La presente invención también se refiere a la bebida fermentada obtenida utilizando el procedimiento; un procedimiento para la preparación de una bebida fermentada en el que se prepara un extracto acuoso a partir del 0,52 % de té o café, el extracto acuoso, al que se añade azúcar, se recupera y se lleva a cabo una fermentación en una o más etapas, como mínimo, con una cepa de levadura y, como mínimo, una cepa bacteriana, los insolubles se separan de la bebida fermentada y esta se trata, a continuación, con calor. La presente invención también se refiere a la bebida

fermentada obtenida utilizando el procedimiento.

Según la Patente CA 2,184,084 para obtener una bebida refrescante sin alcohol: a) se prepara una solución acuosa que contiene una fuente de nitrógeno para nutrir microorganismos y, si esta solución no contiene glucosa ni ningún otro azúcar o no contiene una cantidad suficiente de los mismos, se mezcla con glucosa y/o un azúcar del que se puede liberar glucosa, b) la solución obtenida en a) se mezcla con un microorganismo capaz de convertir glucosa en ácido glucónico, y la glucosa se fermenta, como mínimo, parcialmente; c) cuando se completa la fermentación, como mínimo, 15 mmol/l del ácido glucónico se convierten en el gluconato correspondiente mediante la adición de una sal mineral alcalinizante.

La presente invención da a conocer un procedimiento para elaborar un líquido fermentado. El procedimiento de la presente invención proporciona bebidas líquidas fermentadas con un sabor y efectos beneficiosos consistentes y superiores. El procedimiento de la presente invención es seguro, rápido, eficiente y adecuado para la producción industrial a gran escala.

Para este fin, la presente invención comprende el procedimiento con las características de la reivindicación 1, una bebida fermentada a base de té elaborada mediante el procedimiento y un suplemento dietético que comprende la sustancia seca elaborada mediante el procedimiento. Las realizaciones preferentes de la presente invención se caracterizan en las reivindicaciones dependientes.

El procedimiento para elaborar un líquido fermentado de la presente invención comprende separar y seleccionar una colonia de una cepa bacteriana adecuada, preparar un líquido de siembra que contiene un cultivo vivo de la colonia y cultivar el líquido de siembra en un cultivo líquido a gran escala para obtener un líquido fermentado. La cepa bacteriana adecuada es una especie dentro del género *Acetobacter* o *Gluconobacter*. El líquido de siembra se prepara cultivando la colonia en una superficie inclinada en un medio sólido y seguido de cultivos líquidos activos de múltiples etapas. Los cultivos líquidos activos de múltiples etapas tienen una etapa inicial de un cultivo líquido activo a pequeña escala y, como mínimo, un cultivo líquido activo a escala ampliada. Tanto el cultivo líquido activo inicial a pequeña escala como el cultivo líquido activo a escala ampliada se llevan a cabo, cada uno, en una condición aerobia con ventilación continua de aire y mezcla durante de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 24 horas. El líquido de siembra se selecciona del cultivo líquido activo a escala ampliada en función del sabor y olor afrutado abundante y fragante, el valor del pH del cultivo se reduce a de aproximadamente 2,5 a 2,8 al final del período de cultivo. Además, al final del cultivo líquido activo a escala ampliada, la DO640 puede ser de aproximadamente 0,15 a 0,20. El cultivo líquido a gran escala se lleva a cabo en una condición aerobia con ventilación continua de aire y mezcla durante menos de aproximadamente 30 horas, en el que el valor de pH es de aproximadamente 2,6 a 2,8 al final del período de cultivo. Además, al final del cultivo líquido a gran escala, la DO640 del líquido fermentado alcanza de aproximadamente 0,10 a 0,13.

En el procedimiento para elaborar un líquido fermentado de la presente invención, las cepas bacterianas adecuadas se cultivan y seleccionan en la placa de cultivo horizontal a de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 30 °C durante de aproximadamente 48 a 72 horas, y el pH del cultivo es de aproximadamente 6,0 a 6,5 para el crecimiento y la selección de la colonia.

El procedimiento para elaborar un líquido fermentado de la presente invención puede comprender además activar una cepa bacteriana conservada en un medio de cultivo sólido antes de la selección de la colonia. El medio de cultivo sólido contiene vitamina B y se lleva a cabo en una superficie inclinada a de aproximadamente 28 °C a 30 °C durante de aproximadamente 24 a 48 horas a un pH inicial de aproximadamente 6,0 a 6,5.

En el procedimiento para elaborar un líquido fermentado de la presente invención, el cultivo en superficie inclinada de la colonia se lleva a cabo en un medio de cultivo sólido que contiene vitaminas B a de aproximadamente 28 °C a 30 °C durante aproximadamente 48 horas a un pH de aproximadamente 6,0 a 6,5.

En el procedimiento para elaborar un líquido fermentado de la presente invención, el cultivo líquido activo de etapas múltiples para preparar el líquido de siembra comprende una etapa inicial de un cultivo líquido activo a pequeña escala y, como mínimo, un cultivo líquido activo a escala ampliada en un orden secuencial. La etapa inicial del cultivo líquido activo a pequeña escala se lleva a cabo en un recipiente a pequeña escala a de aproximadamente 28 °C a 30 °C a un pH de aproximadamente 6,0 a 6,5, y el cultivo líquido activo a escala ampliada se lleva a cabo en un tanque de preparación de líquido de siembra a escala media en un medio de cultivo líquido que contiene un extracto de té a una temperatura de aproximadamente 28 °C a 30 °C a un pH de aproximadamente 4,8 a 5,2.

En el procedimiento para elaborar un líquido fermentado de la presente invención, el volumen de cultivo se amplía aproximadamente 20 veces en cada etapa del cultivo líquido activo a escala ampliada.

En el procedimiento para elaborar un líquido fermentado de la presente invención, el cultivo líquido a gran escala se lleva a cabo a de aproximadamente 28 a 30 °C, tasa de ventilación de aire de aproximadamente 0,5 v/v/m, a un pH inicial de aproximadamente 4,8 a 5,2.

5 En el procedimiento para elaborar un líquido fermentado de la presente invención, cada uno del cultivo líquido activo a escala ampliada y el cultivo líquido a gran escala se llevan a cabo en un medio de cultivo líquido que contiene un extracto de té, y puede comprender además un ingrediente a base de hierbas que está hecho de goji (*Lycium chinense* Mill), raíz de astrágalo, ginseng o majuela. En el procedimiento para elaborar un líquido fermentado de la presente invención, cada uno del cultivo líquido activo a escala ampliada y el cultivo líquido a gran escala también se pueden llevar a cabo en un medio de cultivo líquido que contiene un ingrediente a base de hierbas que está hecho de goji (*Lycium chinense* Mill), raíz de astrágalo, ginseng o majuela.

10 En el procedimiento para elaborar un líquido fermentado de la presente invención, la fuente de azúcar en los medios de cultivo para cada uno del cultivo líquido activo a escala ampliada y el cultivo líquido a gran escala es de hasta aproximadamente el 10 % en porcentaje en volumen del líquido de cultivo, y la fuente de azúcar es glucosa, azúcar, miel y, opcionalmente, fruta.

15 El procedimiento para elaborar una bebida fermentada de la presente invención puede comprender, además, una etapa de eliminación de cepas bacterianas del líquido fermentado por filtración.

20 El procedimiento para elaborar una bebida fermentada de la presente invención puede comprender, además, una etapa de ajuste opcional de la acidez, el sabor y la textura del líquido fermentado para elaborar la bebida fermentada.

Además, se describe un líquido fermentado y bebidas tónicas elaboradas mediante el procedimiento.

25 Además, el procedimiento de la presente invención puede comprender, además, una etapa de secado del líquido fermentado para elaborar una sustancia seca. Además, la presente invención da a conocer un suplemento dietético que comprende la sustancia seca elaborada mediante el procedimiento.

### Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra el procedimiento de producción general de la bebida fermentada que incluye una realización del procedimiento de fermentación activa de la presente invención y la preparación y producción previas y posteriores a la fermentación.

35 La figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra la conservación y activación de cualquier cepa y colonia bacteriana conservada para elaborar el líquido de siembra de la presente invención.

### Modos para llevar a cabo la invención

40 El procedimiento de la presente invención se denomina procedimiento de “fermentación activa” o “cultivo activo”, que es un procedimiento de fermentación en capa profunda único en el que la cepa bacteriana se selecciona y se criba cuidadosamente mediante un procedimiento de cultivo ampliado paso a paso en el matraz/lecho giratorio, tanque de siembra y tanque de fermentación para asegurar la calidad y consistencia en el producto líquido fermentado final. Durante el procedimiento de fermentación activa, los cuerpos bacterianos de los microorganismos se distribuyen uniformemente en el medio de cultivo líquido mediante ventilación y mezcla continuas para que puedan absorber y utilizar completamente los nutrientes disueltos en el medio de cultivo. Todo el cultivo líquido es un cultivo líquido homogéneo con buena conductividad térmica, en contraste con el procedimiento estático convencional para elaborar Kombucha con el cuerpo de celulosa en forma de hongo flotando en la parte superior del líquido. En la presente invención, todos los cuerpos bacterianos participan plenamente en la síntesis y el metabolismo, de este modo, la velocidad de la fermentación es más rápida y más eficaz que el procedimiento convencional para elaborar Kombucha. Durante el procedimiento de fermentación de la presente invención, no se forma un hongo Kombucha en la parte superior del líquido, y todo el líquido de cultivo se agita y ventila constantemente para elaborar el líquido.

55 El recipiente de fermentación puede sellarse para minimizar la contaminación a partir de las otras bacterias. Además, el procedimiento es fácil de operar y gestionar, y el procedimiento puede llevarse a cabo de forma continua. El procedimiento de fermentación a gran escala no tarda más de 30 horas una vez que el líquido de siembra se selecciona y prepara adecuadamente. El líquido fermentado al final contiene una gran cantidad de bacterias de cultivo vivas y mantiene una actividad enzimática y un sabor a manzana verde abundantes.

60 Tal como se ilustra en la figura 1, el procedimiento de fermentación comienza con la cepa bacteriana adecuada. Las cepas bacterianas adecuadas utilizadas en la presente invención pertenecen a una única especie del género *Acetobacter* o *Gluconobacter*. Las especies específicas incluyen principalmente *Acetobacter aceti*, *Acetobacter xylinum*, *Gluconobacter oxydans* y *Gluconobacter cerinus*, y otras especies dentro de los dos géneros. La cepa bacteriana adecuada se preselecciona, separa, cultiva o trata. Preferentemente, la cepa bacteriana seleccionada debe tener las características de un ciclo de fermentación corto y abundantes productos de metabolitos para producir las bebidas fermentadas con alto valor nutricional y sabores abundantes. Es muy importante que se seleccione la cepa bacteriana adecuada como punto de partida del procedimiento de fermentación. Una vez que se

selecciona la cepa bacteriana ideal, que normalmente proviene de una única especie dentro de los géneros Acetobacter y Gluconobacter, es fácil ajustar y optimizar la condición de crecimiento en el cultivo de fermentación para lograr productos con sabor y gusto consistentes.

5 La conservación de la cepa bacteriana es conocida en la técnica. Se han utilizado procedimientos convencionales, entre los que se incluyen el almacenamiento en arena o arcilla, sellada con parafina en el medio de superficie inclinada o almacenamiento en glicerina. Los enfoques tecnológicos modernos también incluyen liofilización al vacío y almacenamiento en nitrógeno líquido a baja temperatura. Preferentemente, la cepa bacteriana se almacena en liofilización al vacío a -20 °C, y puede durar de aproximadamente 4 a 5 años. Tal como se muestra en la figura 2, las cepas bacterianas que se utilizan para la producción pueden sellarse con parafina y glicerina y conservarse durante 2 a 3 años, mientras que las cepas bacterianas para la producción en taller y la utilización en laboratorio pueden conservarse en cultivo en superficie inclinada a 4 °C durante 2 a 3 meses.

15 Tal como se ilustra en la figura 1, cuando sea necesario, se puede activar la cepa bacteriana almacenada en el congelador. La cepa bacteriana se cultiva en un medio de cultivo sólido sobre una superficie inclinada. El medio de cultivo sólido contiene vitaminas B, y el cultivo se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 28 °C a 30 °C durante de aproximadamente 24 a 48 horas a un pH inicial de aproximadamente 6,0 a 6,5.

20 A continuación, se selecciona una colonia de la cepa bacteriana activada o cepa bacteriana de cualquier otra fuente cultivando la cepa bacteriana en una placa horizontal a una temperatura de aproximadamente 28 °C a 30 °C durante de aproximadamente 48 horas a 72 horas a un pH de aproximadamente 6,0 a 6,5. Las colonias que crecen en el medio de cultivo sólido se seleccionan para preparación adicional. Las colonias generalmente contienen una única especie de cepa bacteriana, ocasionalmente dos o más, en los géneros Acetobacter y Gluconobacter.

25 El procedimiento para elaborar una bebida fermentada puede comprender el cultivo de las colonias seleccionadas a partir del cultivo en placa horizontal en un medio de cultivo sólido sobre una superficie inclinada antes de preparar el líquido de siembra en el cultivo líquido activo de múltiples etapas. La superficie inclinada es un medio fundamental para conservar y reproducir las cepas bacterianas durante generaciones. El cultivo en superficie inclinada puede considerarse el punto de partida de preparación del líquido de siembra para la producción industrial. El cultivo puede llevarse a cabo sobre las superficies inclinadas en tubos de ensayo de varios tamaños o matraces. Para un crecimiento y una producción industrial óptimos, se utilizan preferentemente cepas bacterianas frescas que se han cultivado durante de aproximadamente 24 a 48 horas, mientras que es necesario evitar las cepas bacterianas viejas que han estado en la superficie inclinada. El cultivo en la superficie inclinada se lleva a cabo en el medio de cultivo sólido que contiene vitaminas B a una temperatura de aproximadamente 28 °C a 30 °C durante aproximadamente 48 horas a un pH de aproximadamente 6,0 a 6,5.

40 Posteriormente, el cultivo bacteriano en la superficie inclinada se retira mediante lavado con agua esterilizada de la superficie inclinada y se añade a un cultivo líquido en un matraz de cultivo adecuado que se coloca, a continuación, en un lecho giratorio para un cultivo líquido activo en una cantidad de siembra de aproximadamente el 1 al 5 %. Preferentemente, el matraz contiene 100 ml de medio de cultivo líquido y se añade el 1 % en porcentaje en volumen de agua esterilizada que contiene la cepa bacteriana adecuada para el cultivo inicial. La temperatura para el cultivo es de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 30 °C, la velocidad del lecho giratorio se ajusta preferentemente a de aproximadamente 180 a 210 rpm durante aproximadamente 24 horas y a un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5.

45 A continuación, a través de una fermentación líquida activa de múltiples etapas, se prepara un líquido de siembra adecuado para la producción industrial a gran escala. Cada uno de los cultivos líquidos activos de etapas múltiples tiene un volumen de cultivo líquido ampliado a partir del cultivo anterior, y cada cultivo utiliza aproximadamente del 1 % al 10 % de cultivo líquido que contiene la cepa bacteriana del cultivo líquido activo anterior. Preferentemente, para el cultivo líquido a pequeña escala inicial, la cantidad de siembra es de aproximadamente el 1 % al 5 % de cultivo líquido a partir del cultivo líquido anterior, y, más preferentemente, el 1 %. En los siguientes cultivos líquidos a escala ampliada y a gran escala, preferentemente, aproximadamente el 5 % del cultivo líquido a partir del cultivo líquido anterior se utiliza en el siguiente cultivo de modo que el cultivo vivo se amplíe aproximadamente 20 veces en el siguiente cultivo. Cada uno de los cultivos líquidos activos de etapas múltiples se controla durante un período de tiempo de aproximadamente 24 horas o menos en las condiciones aerobias con ventilación de aire y mezcla continuas.

60 Durante el cultivo líquido activo de múltiples etapas puede comprender además uno o más cultivos líquidos que se llevan a cabo sucesivamente en las mismas condiciones de cultivo, y cada uno de los cultivos líquidos se lleva a cabo en un volumen de cultivo ampliado respecto al cultivo anterior inmediato. Por ejemplo, el primer cultivo líquido se lleva a cabo en un medio de cultivo líquido de 50 ml a 100 ml en un tanque de siembra, mientras que el segundo cultivo líquido se lleva a cabo en un tanque de siembra de 500 ml a 1.000 ml. Ambos cultivos se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 28 °C a 30 °C a un pH de aproximadamente 4,8 a 5,2 durante de aproximadamente 18 horas a 24 horas.

65 El cultivo de líquido activo a escala ampliada se lleva a cabo en un tanque de preparación de líquido de siembra a

escala media que es importante para seleccionar y preparar un líquido de siembra eficaz para la fermentación activa a gran escala. Los tanques de fermentación que se utilizan convencionalmente en las industrias farmacéutica, alimentaria y enzimológica se pueden utilizar para este fin. Los tanques de fermentación modernos a menudo están equipados con equipos de control automático y fermentación continua que mejoran la productividad y la calidad de los productos. El cultivo líquido activo a escala ampliada comprende uno o más cultivos líquidos que se llevan a cabo sucesivamente en las mismas condiciones de cultivo, y cada uno de los cultivos líquidos se lleva a cabo en un volumen de cultivo ampliado respecto al cultivo anterior inmediato. El cultivo se lleva a cabo en un medio de cultivo líquido que contiene un extracto de té a una temperatura de aproximadamente 28 °C a 30 °C a un pH de aproximadamente 4,8 a 5,2. En la etapa para preparar el líquido de siembra, se añade extracto de té al cultivo líquido, y se seleccionan cultivos bacterianos eficaces en función del sabor y el color del líquido resultante.

A través del cultivo de líquido activo y la selección continuos, la presente invención da a conocer un procedimiento eficaz para cribar la colonia bacteriana más eficaz de una cepa bacteriana de una única especie que es capaz de fermentar en de aproximadamente 24 a 30 horas con abundantes sabores y beneficios nutricionales. Es crítico seleccionar una cepa bacteriana adecuada, seguida de la preparación de un líquido de siembra eficaz para la producción a gran escala. El líquido de siembra no debe contener otras bacterias contaminantes excepto la cepa seleccionada, tiene una alta eficiencia de fermentación y un color amarillento claro, es semitransparente y contiene un sabor y olor afrutado abundante. El líquido de siembra se prepara y se toma del final del cultivo líquido activo a escala ampliada. Preferentemente, la densidad óptica (DO) a 640 nm del cultivo líquido activo a escala ampliada alcanza de aproximadamente 0,15 a 0,20 y el pH se reduce a un intervalo de aproximadamente 2,5 a 2,8 al final del período de tiempo de cultivo. El líquido de siembra bien preparado tendrá abundante sabor y olor afrutado al final del cultivo a escala ampliada.

El principio y el protocolo de ensayo de la DO como una indicación de la concentración bacteriana en el cultivo líquido se conocen en la técnica. En la presente invención, la DO se ensaya mediante el espectrofotómetro que puede ajustarse a una longitud de onda de 420 - 660 nm. La longitud de onda de ensayo debe estar estandarizada y es posible que deba ajustarse específicamente al material que se está ensayando. Diferentes cepas bacterianas pueden no tener la misma longitud de onda de absorbancia máxima. En una de las realizaciones de la presente invención, se utiliza una longitud de onda a 640 nm para ensayar la DO en la presente invención.

Posteriormente, la fermentación a gran escala se lleva a cabo en condiciones aerobias con ventilación de aire y mezcla continuas, el tiempo para la fermentación se controla a menos de aproximadamente 30 horas, y preferentemente, en aproximadamente 24 horas. El líquido de siembra que se añade al cultivo líquido es aproximadamente del 3 % al 10 % en porcentaje en volumen del volumen total del cultivo líquido de fermentación a gran escala y, preferentemente, aproximadamente el 5 % en porcentaje en volumen. La fermentación a gran escala se lleva a cabo en un medio de cultivo líquido que contiene el extracto de té, la temperatura para el cultivo es de aproximadamente 28 a 30 °C, la tasa de ventilación de aire es de aproximadamente 0,5 v/v/m, y el pH inicial en el cultivo líquido es de aproximadamente 4,8 a 5,2. Al final de la fermentación a gran escala, el líquido fermentado alcanza un pH de aproximadamente 2,6 a 2,8 y una turbidez bacteriana de aproximadamente 0,10 a 0,13 a DO 640. Al final del cultivo a gran escala, el líquido fermentado deberá retener el abundante sabor y olor afrutado del líquido de siembra.

Además, la fermentación a gran escala puede llevarse a cabo en múltiples etapas. Por ejemplo, la fermentación a gran escala puede llevarse a cabo en 2 etapas, en la que la primera etapa se lleva a cabo en un tanque de fermentación de 1 tonelada y la segunda etapa en un tanque de fermentación de 20 toneladas.

En el procedimiento para elaborar una bebida fermentada de la presente invención, el té utilizado para la fabricación de la bebida fermentada puede ser de cualquier tipo y de cualquier origen, particularmente, *Camellia sinensis*, variedades sinensis o assamica. Todas las variedades de té verde, té semifermentado, té negro, té negro ahumado, té amarillo, té oscuro, té blanco, té de hierbas de plantas o de frutas, infusión, pueden utilizarse como base para la fabricación de la bebida fermentada. Preferentemente, el extracto de té se puede preparar con té verde y agua. Cuando las bacterias se reproducen y crecen en el cultivo líquido de fermentación, el extracto de té proporciona el beneficio de una cantidad despreciable de minerales y nutrientes que promueven el crecimiento bacteriano que el azúcar y otras fuentes de carbono no pueden suministrar. La adición del extracto de té es necesaria para el crecimiento óptimo de las bacterias. El extracto de té se elabora en equipos industriales de utilización convencional en una proporción de aproximadamente 1 g de té : 25 ml de agua, sumergiéndolo dos veces en agua y mezclando ambas soluciones para que la proporción final sea de aproximadamente 1 g de té : 50 ml de agua. No existe un requisito estricto para la calidad del té y se puede utilizar té con menos calidad. Preferentemente, se utiliza té verde. La cantidad de extracto de té utilizada en el tanque de fermentación de siembra es mayor cuando se utilizan 25 litros de extracto de té por cada 100 litros de cultivo líquido (aproximadamente 500 g de extracto de té seco), mientras que, en el tanque de fermentación a gran escala, se utilizan 10 litros de extracto de té por cada 100 litros de cultivo líquido (aproximadamente 200 g de extracto de té seco).

Como alternativa, el extracto de té puede complementarse o sustituirse con ingredientes de hierbas populares en la medicina china, tales como goji (*Lycium chinense* Mill), raíz de astrágalo, ginseng, majuela, etc., para crear bebidas tónicas. Estas hierbas se añaden en forma de disolvente de extracción de agua o hierbas secas conocidas en la

práctica común.

En el cultivo, la fuente de azúcar debe proporcionarse como alimento para el crecimiento de las bacterias. Las fuentes de azúcar conocidas que incluyen glucosa, azúcar o miel pueden incluirse en el cultivo. Además, se pueden añadir diversas frutas para proporcionar las fuentes de azúcar. El contenido de azúcar en el líquido de cultivo es de hasta un 10 % en porcentaje en volumen.

Además, el procedimiento para elaborar una bebida fermentada puede comprender una etapa de eliminación de cepas bacterianas del líquido fermentado por filtración. Como el líquido fermentado contiene una gran cantidad de colonias bacterianas, estas colonias contienen abundantes proteínas que benefician al cuerpo humano. Sin embargo, para mantener la bebida fermentada almacenada de forma estable y segura, es necesario detener la fermentación posterior a la producción y estabilizar la acidez de la bebida. Por lo tanto, las bacterias se eliminan de la bebida fermentada para que puedan mantenerse durante un año con actividad enzimática y sabor conservados. Preferentemente, las bacterias se eliminan de la bebida fermentada por filtración a temperatura fría. Por ejemplo, los filtros de la serie Zeta Plus S de Cuno Co., se utilizan como prefiltro, y la membrana de filtración Zetapor ER de 0,5  $\mu$ l se utiliza para la filtración secundaria para obtener una bebida fermentada libre de bacterias. Después de filtrar la bebida fermentada para eliminar las bacterias, esta tiene un color ámbar amarillento muy claro y translúcido y huele a manzana verde fresca.

Opcionalmente, en el procedimiento para elaborar una bebida fermentada de la presente invención, la acidez, el sabor y la textura del líquido fermentado se pueden ajustar para elaborar una bebida fermentada más sabrosa. El procedimiento de fermentación depende de la reproducción y el metabolismo de los microorganismos. Durante la fabricación de la bebida fermentada, a pesar del estricto control de los parámetros de producción, el producto puede tener variaciones a diferencia de las bebidas químicamente mezcladas con contenidos uniformes. Para tener un producto de bebida consistente, la bebida fermentada puede mezclarse y ajustarse para el sabor, la textura y la acidez. Los productos de bebida de diferentes lotes o tanques de fermentación pueden mezclarse, y la dulzura, la acidez, la concentración y el sabor pueden ajustarse aún más según el gusto del consumidor. La acidez se puede ajustar ligeramente a una dilución del 2 % para mantener el sabor y la fragancia delicados de la bebida. Si se desea un sabor fuerte, se puede añadir cierto aditivo saborizante natural, tal como el agente saborizante de fresa natural, para complacer al consumidor. No importa qué medidas se tomen para mezclar y ajustar los productos de bebida finales, los productos siempre se basan en la bebida fermentada y elaborada naturalmente, a diferencia de la mayoría de las bebidas disponibles en el mercado que dependen completamente de la mezcla de ingredientes artificiales. Además, la bebida fermentada se puede envejecer como el vino. Después de un período prolongado de tiempo, la bebida fermentada puede ganar un sabor más abundante e incluso con mayor calidad y gusto.

La presente invención da a conocer, además, un líquido fermentado, líquido de siembra y bebida fermentada elaborada mediante los procedimientos de la presente invención. La bebida fermentada se puede secar para elaborar una sustancia seca y añadir o utilizar para diversos suplementos dietéticos. En la bebida fermentada preparada mediante el procedimiento de la presente invención, el gusto, el sabor y el valor nutritivo son superiores a cualquier bebida disponible en el mercado actual. Durante el procedimiento de fermentación y reproducción, los microorganismos producen grandes cantidades de metabolitos, entre los que se incluyen aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos y enzimas, que son beneficiosos para el cuerpo humano y conservan un sabor y un gusto penos.

La presente invención se ilustra, adicionalmente, en los siguientes ejemplos.

#### **Ejemplo 1. Activación de la cepa bacteriana**

La cepa bacteriana inicial o la cepa bacteriana que se ha conservado en el refrigerador o por liofilización necesitan ser activadas antes del cultivo y la selección adicionales de colonias individuales. Se prepara un medio de cultivo sólido sobre una superficie inclinada disolviendo 20,0 g de glucosa, 10,0 g de levadura en polvo, 3,0 g de extracto de carne de vacuno, 10,0 g de  $\text{CaCO}_3$ , 20 mg de mezcla de vitaminas B y 20,0 g de agar en 1.000 ml de agua a un pH natural de 6,0 a 6,5 en un recipiente grande en una condición calentada; vertiendo de 4 ml a 5 ml de solución disuelta en cada tubo de ensayo pequeño de 25 ml; sellando los tubos de ensayo con sellos de algodón y pasteurizando durante 30 minutos a 120 °C; colocando los tubos de ensayo en ángulo mientras están calientes para que la superficie inclinada del medio de cultivo sólido se forme en la parte superior. La cepa bacteriana se siembra en la superficie inclinada mediante un asa de siembra y se cultiva en una incubadora térmica a una temperatura de 28 °C a 30 °C durante 24 a 48 horas.

#### **Ejemplo 2. Purificación y selección de colonias individuales**

El medio de cultivo sólido se prepara en una superficie horizontal disolviendo 20,0 g de glucosa, 10,0 g de levadura en polvo, 3,0 g de extracto de carne de vacuno, 10,0 g de  $\text{CaCO}_3$ , 20 mg de mezcla de vitaminas B y 20,0 g de agar en 1.000 ml de agua a un pH natural de 6,0 a 6,5 en un recipiente grande; vertiendo 200 ml de solución disuelta en cada matraz de 500 ml; sellando los matraces con sellos de algodón y pasteurizando durante 30 minutos; enfriando la solución pasteurizada hasta de 50 °C a 60 °C y vertiendo 20 ml de solución en cada placa horizontal que tiene un diámetro de 9 cm para enfriar y formar el medio de cultivo en placa horizontal sólido.

A continuación, unas pocas colonias bacterianas del cultivo bacteriano activado en el ejemplo 1 se recogen mediante un asa de siembra y se siembran en la placa horizontal dibujando líneas separadas. Las placas horizontales se cultivan en una incubadora a una temperatura de 28 °C a 30 °C durante 48 a 72 horas. Se cultivan colonias individuales en el cultivo sólido y se escogen para su posterior preparación.

### **Ejemplo 3. Cultivo en superficie inclinada de colonias individuales.**

Las colonias individuales de cultivo vivo del ejemplo 2 se cultivan adicionalmente en la superficie inclinada. Las colonias individuales que crecieron en la placa horizontal se seleccionan mediante un asa de siembra y se siembran en la superficie inclinada preparada tal como en el ejemplo 1. Las colonias individuales que tienen un círculo transparente más grande alrededor son las colonias saludables y preferentes. A medida que las bacterias crecen y producen ácido, el ácido reacciona con  $\text{CaCO}_3$  en el medio; a medida que se reduce la cantidad de  $\text{CaCO}_3$ , se forma un círculo transparente alrededor de la colonia, lo que indica un crecimiento saludable.

Cada colonia individual se siembra en 2 a 3 cultivos en superficie inclinada, y los tubos de ensayo se cultivan en una incubadora a de 28 °C a 30 °C durante aproximadamente 48 horas. Las colonias individuales que crecen bien sin contaminación se mantienen en el refrigerador para su posterior preparación.

### **Ejemplo 4. Cultivo líquido en lecho giratorio de etapas múltiples.**

El medio de cultivo líquido se prepara disolviendo 20,0 g de glucosa, 10,0 g de levadura en polvo, 3,0 g de extracto de carne de vacuno, 1,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  en 1.000 ml de agua a un pH natural de 6,0 a 6,5 en un recipiente; vertiendo 100 ml de solución disuelta en cada matraz triangular de 500 ml; sellando los matraces con sellos de algodón y pasteurizando durante 30 minutos a 120 °C. El medio de cultivo líquido se prepara cuando se ha enfriado. Las colonias bacterianas del cultivo en superficie inclinada del ejemplo 3 se lavan con 5 ml de agua estéril y se siembran en los 100 ml de medio de cultivo líquido en un matraz triangular de 500 ml. El cultivo se lleva a cabo a de 28 °C a 30 °C durante aproximadamente 24 horas en un lecho giratorio con una velocidad de rotación de 180 rpm a 210 rpm.

A continuación, se siembra el 1 % de cultivo líquido del cultivo anterior en el matraz triangular de 500 ml en 200 ml de medio de cultivo líquido en un matraz triangular de 1.000 ml. El medio de cultivo es el mismo que el preparado anteriormente, excepto con proporciones y volumen aumentados. El cultivo se lleva a cabo a de 28 °C a 30 °C durante aproximadamente 24 horas en un lecho giratorio con una velocidad de rotación de 180 rpm a 210 rpm para obtener un cultivo vivo adecuado para preparar un líquido de siembra.

### **Ejemplo 5. Fermentación de cultivo líquido en tanque de siembra**

El medio de cultivo líquido se prepara disolviendo 3,0 kg de glucosa y 6,0 kg de azúcar en 75 kg de agua estéril en el tanque de fermentación esterilizado con autoclave. El tanque se calienta a 100 °C y se mantiene a la temperatura durante 15 minutos. Cuando la temperatura se deja enfriar, se añaden 25 kg de extracto de té y 900 ml de etanol de calidad alimentaria al tanque. A continuación, el cultivo líquido vivo, al 1 % en porcentaje en volumen del ejemplo 4 se añade al tanque. El valor de pH en el cultivo líquido se ajusta a  $5,0 \pm 0,2$  mediante la adición de NaOH. El cultivo se lleva a cabo a de 28 °C a 30 °C durante de aproximadamente 18 a 24 horas en un lecho giratorio con una velocidad de rotación de 57 rpm. El cultivo se lleva a cabo con ventilación de aire y la tasa de ventilación por minuto es de aproximadamente 0,5 volumen de aire/volumen de cultivo/minuto (v/v/m). Al final de la etapa, el valor de DO de turbidez bacteriana es de aproximadamente 0,150 a 0,200, el valor de pH se reduce de aproximadamente 2,5 a 2,8, se pueden saborear un sabor afrutado y un gusto abundante. A continuación, el líquido de siembra está listo.

### **Ejemplo 6. Cultivo de fermentación a gran escala**

El medio de cultivo líquido se prepara disolviendo 1,0 kg de glucosa y 11,0 kg de azúcar en 80 kg de agua estéril en el tanque de fermentación esterilizado con autoclave. El tanque se calienta a 100 °C y se mantiene a la temperatura durante 15 minutos. Cuando la temperatura se deja enfriar, se añaden al tanque 10 kg de extracto de té y 450 ml de etanol de calidad alimentaria. A continuación, el líquido de siembra del ejemplo 5 se añade al 5 % en porcentaje en volumen. El valor de pH en el cultivo líquido se ajusta a 5,0 añadiendo NaOH. El cultivo se lleva a cabo a de 28 °C a 30 °C durante 24 horas mientras se agitaba. El cultivo se lleva a cabo con ventilación de aire y la tasa de ventilación por minuto es de aproximadamente 0,5 v/v/m. Al final de la fermentación, el valor de DO de turbidez bacteriana en DO640 es de aproximadamente 0,10 a 0,13, el valor de pH se reduce de aproximadamente 2,6 a 2,8, se pueden saborear un sabor afrutado y un gusto abundante con un color semitransparente amarillento claro. Se prepara la bebida líquida fermentada.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para elaborar una bebida fermentada a base de té, que consiste en
- 5 - separar y seleccionar una colonia de una cepa bacteriana, en el que la cepa bacteriana es de una única especie seleccionada del grupo que consiste en *Acetobacter aceti*, *Acetobacter xylinum*, *Gluconobacter oxydans* y *Gluconobacter cerinus*;
  - 10 - preparar y seleccionar un líquido de siembra a partir del cultivo de la colonia a través, secuencialmente, de un cultivo en superficie inclinada, un cultivo líquido activo a pequeña escala inicial y, como mínimo, un cultivo líquido activo a escala ampliada, en el que el líquido de siembra consiste en un cultivo de la colonia de la única especie sin ninguna bacteria contaminante, y
  - 15 - cultivar el líquido de siembra en un cultivo líquido activo a gran escala para obtener la bebida fermentada a base de té, en el que;
    - el cultivo en superficie inclinada se lleva a cabo en un medio de cultivo sólido que contiene vitaminas B a de aproximadamente 28 °C a 30 °C durante aproximadamente 48 horas a un pH de aproximadamente 6,0 a 6,5;
    - 20 - el cultivo líquido activo a pequeña escala inicial se lleva a cabo en un recipiente a pequeña escala a una temperatura de aproximadamente 28 °C a 30 °C a un pH de aproximadamente 6,0 a 6,5 en condiciones aerobias con ventilación continua de aire y mezclando hasta distribuir uniformemente bacterias en el líquido de cultivo durante de aproximadamente 18 a 24 horas;
    - el cultivo líquido activo a escala ampliada se lleva a cabo en un tanque de preparación de líquido de siembra a escala media en un medio de cultivo líquido que contiene un extracto de té, añadiendo etanol de calidad alimentaria a una temperatura de aproximadamente 28 °C a 30 °C con un pH de aproximadamente 4,8 a 5,2
    - el líquido de siembra se selecciona al final del cultivo líquido activo a escala ampliada, en el que el líquido de siembra tiene el pH del líquido de cultivo reducido a un intervalo de aproximadamente 2,5 a 2,8, una DO a 640 nm de aproximadamente 0,150 a 0,200 al final del cultivo líquido activo a escala ampliada, y
    - 25 - el cultivo líquido activo a gran escala se lleva a cabo en condiciones aerobias con ventilación continua de aire, añadiendo etanol de calidad alimentaria y mezclando hasta distribuir uniformemente las bacterias a de aproximadamente 28 °C a 30 °C, tasa de ventilación de aire de aproximadamente 0,5 v/v/m, y a un pH inicial de aproximadamente 4,8 a 5,2 durante menos de aproximadamente 30 horas, y teniendo un pH reducido a de aproximadamente 2,6 a 2,8 y una DO a 640 nm de aproximadamente 0,10 a 0,13 en menos de 30 horas para el cultivo líquido activo a gran escala para obtener la bebida fermentada a base de té.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la colonia se prepara mediante un cultivo horizontal a de aproximadamente 28 °C a 30 °C durante aproximadamente 48 horas a 72 horas a un pH de aproximadamente 6,0 a 6,5.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende, además, activar una cepa bacteriana conservada en un medio de cultivo sólido antes de la selección de la colonia individual, en el que el medio de cultivo sólido contiene vitaminas B y el cultivo se lleva a cabo en una superficie inclinada a una temperatura de aproximadamente 28 °C a 30 °C durante de aproximadamente 24 a 48 horas a un pH inicial de aproximadamente 6,0 a 6,5.
4. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el cultivo líquido activo a escala ampliada comprende dos o más cultivos líquidos activos y el volumen de cultivo de cada cultivo líquido activo a escala ampliada se amplía aproximadamente 20 veces a partir de un cultivo líquido activo a escala ampliada anterior.
5. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el medio de cultivo líquido comprende, además, un ingrediente a base de hierbas que está hecho de goji (*Lycium chinense* Mill), raíz de astrágalo, ginseng o majuela.
6. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** cada uno del cultivo líquido activo a escala ampliada y el cultivo líquido a gran escala se llevan a cabo en un medio de cultivo líquido que contiene un ingrediente a base de hierbas que está hecho de goji (*Lycium chinense* Mill), raíz de astrágalo, ginseng o majuela.
7. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la fuente de azúcar en los medios de cultivo para cada uno del cultivo líquido activo a escala ampliada y el cultivo líquido a gran escala es de hasta aproximadamente el 10 % en volumen del líquido de cultivo, y la fuente de azúcar es glucosa, azúcar, miel y, opcionalmente, fruta.
8. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende, además, la eliminación de cepas bacterianas del líquido fermentado por filtración.
9. Procedimiento, según la reivindicación 8, **caracterizado por que** comprende, además, ajustar opcionalmente la acidez, el sabor y la textura del líquido fermentado para elaborar la bebida fermentada.
10. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende, además, secar el líquido fermentado para elaborar una sustancia seca.

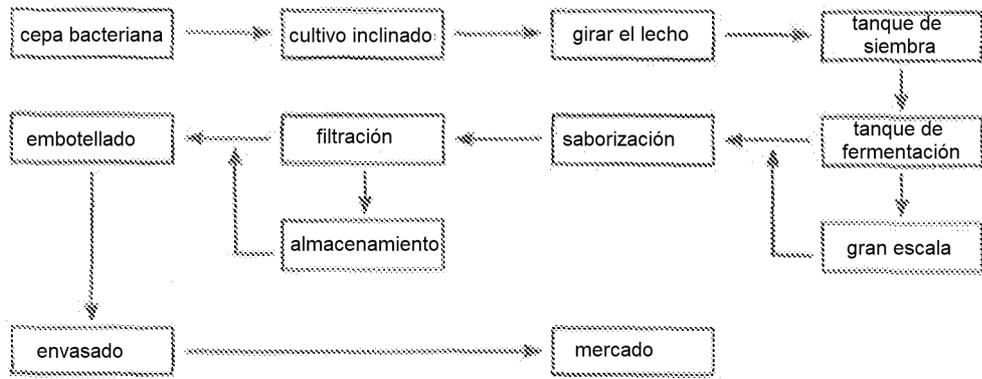


Fig. 1

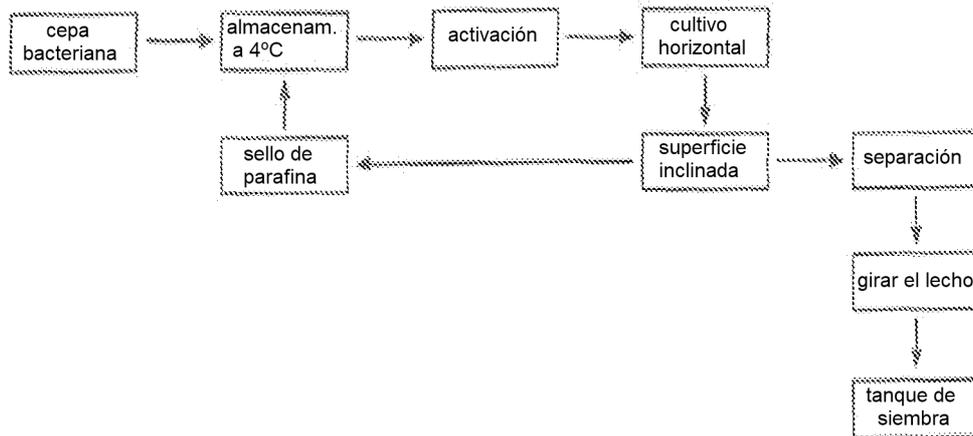


Fig. 2

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 *Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

10 • CA 2197481

• CA 2184084