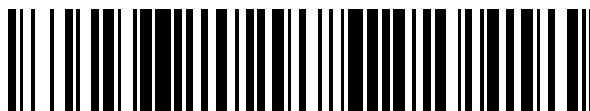


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 115**

51 Int. Cl.:

A23K 20/174 (2006.01)

A23L 33/15 (2006.01)

C12P 19/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2015** **E 15176511 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016** **EP 2995204**

54 Título: **Procedimiento para la producción de un producto alimenticio o de un precursor del mismo, producto alimenticio o precursor del mismo y usos correspondientes**

30 Prioridad:

18.07.2014 DE 102014110182

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

05.07.2017

73 Titular/es:

**ERDINGER WEISSBRÄU WERNER BROMBACH
GMBH & CO. KG (100.0%)
Lange Zeile 1 + 3
85435 Erding, DE**

72 Inventor/es:

**LIEBERT, PETER;
FISCHER, MALAIKA y
PIECZONKA, KLAUS**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 622 115 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).

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE UN PRODUCTO ALIMENTICIO O DE UN PRECURSOR DEL MISMO, PRODUCTO ALIMENTICIO O PRECURSOR DEL MISMO Y USOS CORRESPONDIENTES

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un producto alimenticio o de un precursor del mismo según la reivindicación 1, a un producto alimenticio o a un precursor del mismo según la reivindicación 9 así como a los usos según las reivindicaciones 10 y 11.

10 La vitamina B₁₂ desempeña un papel esencial en la división celular, hematopoyesis, función del sistema nervioso, en las capacidades mentales así como en la metabolización de hidratos de carbono, grasas y proteínas. Por tanto, en el caso de una deficiencia de vitamina B₁₂ pueden producirse trastornos metabólicos considerables u otras alteraciones corporales, como por ejemplo un metabolismo energético disminuido o un sistema inmunitario alterado.

15 Por tanto, un abastecimiento suficiente del cuerpo humano o animal con vitamina B₁₂ representa un requisito importante para la salud y la capacidad funcional.

Definiciones

20 Por el término "producto alimenticio" o "alimento" se entienden según la invención todas las sustancias y productos que el experto considere como tales. Así, "producto alimenticio" puede comprender todas las sustancias y productos que sean adecuados para el consumo humano y/o animal, y presenten preferiblemente un efecto nutritivo. En particular, el término "producto alimenticio" en el contexto de esta invención puede comprender: un producto alimenticio que contiene cereales, una barrita que contiene cereales, un producto de extracto de malta, cereales
25 para el desayuno, un producto de panadería y pastelería, un producto lácteo, un yogur, una bebida, una bebida sin alcohol, una cerveza, una cerveza sin alcohol, una cerveza de trigo, una cerveza de trigo sin alcohol, una bebida mezclada con cerveza, una bebida fermentada con una levadura, una bebida no fermentada con una levadura y/o concentrados de los productos alimenticios anteriores. Un precursor del producto alimenticio según la invención, en particular de la bebida, puede ser en particular una materia agria, una mezcla macerada y un mosto. En el contexto
30 de esta solicitud, el término "no fluido" en relación con un producto alimenticio comprende una consistencia sólida, pastosa, de tipo pasta, de tipo gel o similar de un producto alimenticio.

Vitamina B₁₂ es un término genérico para una serie de compuestos estructuralmente similares, solubles en agua, con efecto biológico, los denominados corrinoides. Debido al átomo de cobalto unido de manera compleja se denominan cobalaminas. El experto considera como formas de vitamina B₁₂ biológicamente activas:
35 metilcobalamina, desoxiadenosilcobalamina, hidroxicobalamina y sulfocobalamina. De éstas, metilcobalamina y desoxiadenosilcobalamina se consideran las formas biológicamente más eficaces o más activas. De este grupo, la cianocobalamina sólo puede obtenerse de manera artificial, es decir sintética.

40 Además de estas formas de vitamina B₁₂ activas también hay los denominados análogos inactivos. Estos también se denominan pseudovitamina B₁₂, porque aunque presentan una estructura química similar a la de la verdadera vitamina B₁₂, eventualmente no despliegan ningún efecto de vitamina para el cuerpo humano o animal. No son adecuados para cumplir las tareas fisiológicas de la vitamina B₁₂ en el organismo. Además pueden bloquear la absorción y metabolización de la vitamina B₁₂ biológicamente activa.

45 Por pseudovitamina B₁₂ se entiende en el contexto de esta solicitud en particular 7-adenil-cianocobamida.

En el contexto de esta solicitud, la definición del término "vitamina B₁₂" se limita a las formas activas de la vitamina B₁₂ o sus precursores en el organismo humano o animal. Además, el término "vitamina B₁₂" en el contexto de esta
50 solicitud se limita a formas de la vitamina B₁₂, que pueden generarse de manera microbiológica. Dado que la cianocobalamina mencionada anteriormente sólo puede generarse de manera sintética y por tanto no representa una vitamina B₁₂ "natural", esta forma de la vitamina B₁₂ no está abarcada por el término "vitamina B₁₂" en el contexto de esta solicitud.

55 Con ello, la definición del término "vitamina B₁₂" en el contexto de esta solicitud se limita a las siguientes especies de vitamina B₁₂: metilcobalamina, desoxiadenosilcobalamina, hidroxicobalamina y sulfocobalamina.

Los representantes del grupo mencionado anteriormente se caracterizan en general por una alta biodisponibilidad, de modo que son adecuados para mejorar el abastecimiento del cuerpo humano o animal con vitamina B₁₂.

60 En el contexto de esta solicitud, el término "biodisponibilidad" se entiende como la resorción de la sustancia nutritiva (vitamina B₁₂) del tracto gastrointestinal a la sangre, con lo que llega a la circulación sistémica y por consiguiente está disponible para las células/órganos. Por lo demás se remite a la definición del término "biodisponible" o "biodisponibilidad" en el párrafo [0013] de la descripción de la publicación para información de solicitud de patente internacional WO 2012/109 324 A1. De este modo se hace referencia en su totalidad al documento mencionado en
65 último lugar.

Para la determinación de la vitamina B₁₂ biodisponible se utilizó un análisis de detección basado en el denominado sistema ADVIA. Esta detección de la biodisponibilidad se basa en el denominado factor intrínseco (IF, *Intrinsic Factor*) y se usa por ejemplo para la detección de vitamina B₁₂ biodisponible en la sangre. La vitamina B₁₂ se absorbe en el último tramo del intestino delgado (íleo) por medio de factor intrínseco (IF = proteína que se secreta en las células parietales de la mucosa del estómago). En el contexto de esta prueba, la vitamina B₁₂ no unida a IF se define como no biodisponible, dado que ésta no llega a la circulación sanguínea y junto con esto no llega al tejido correspondiente.

En la presente solicitud se usó la prueba ADVIA Centaur VB12 (111659 Rev. N, 2008-09; VB12 2/12) para detectar la vitamina B₁₂ biodisponible. Ésta es un inmunoensayo competitivo que emplea la tecnología de quimioluminiscencia directa. A este respecto, la vitamina B₁₂ compite en la muestra con la vitamina B₁₂ marcada con éster de acridinio en un reactivo Lite por una cantidad limitada de IF purificado, que está unido covalentemente a partículas paramagnéticas en fase sólida. En esta prueba se usan el agente de liberación (hidróxido de sodio) y DTT para liberar vitamina B₁₂ de proteínas de unión endógenas en la muestra. La cobinamida añadida impide una nueva unión tras la adición de la fase sólida a la muestra.

Para determinar la concentración (total) de vitamina B₁₂, que comprende todas las formas de la vitamina B₁₂, es decir las formas biodisponibles y no biodisponibles, en el contexto de esta solicitud se usa el método de medición r-Biopharm AOAC-Methode n.º 101002. Alternativamente, para determinar la concentración total puede usarse el método "Fresenius AOAC-Methode n.º 952.20".

En relación con un producto de levadura, según la invención por el término "autolisado" se entiende un sustrato nutritivo en su mayoría líquido, que se obtiene mediante la disolución de las células de levadura de panadería, levadura forrajera (levadura proteica) y/o en particular de levadura de cerveza mediante enzimas de la propia célula.

En relación con un producto de levadura, según la invención, por el término "extracto" se entiende un producto de tipo polvo, gel o pasta a partir de autolisado de levadura (generado por medio de enzimas de levadura propias) o hidrolizado de levadura (generado por medio de enzimas foráneas) con un alto contenido por materia seca de aminoácidos (por ejemplo del 30 al 50%), hidratos de carbono (por ejemplo del 20 al 30%) y vitaminas (en particular: grupo B: tiamina, riboflavina, ácido nicotínico). En general se produce un extracto de levadura, liberando al menos parcialmente un autolisado o hidrolizado de levadura de los componentes celulares insolubles, concentrándolo y dado el caso secándolo por pulverización. Normalmente, un extracto de levadura presenta un contenido de sustancia seca del 70 al 80% en el caso de una consistencia de tipo pasta y del 95 al 97% en el caso de una consistencia de polvo.

En relación con un producto de levadura, según la invención, por el término "forma secada" se entiende toda forma de una levadura, que presenta un contenido de agua de como máximo el 5%, preferiblemente como máximo el 2%, en particular como máximo el 1%. En particular, por esto se entiende una levadura secada en forma de flóculos o polvo o una levadura liofilizada.

Al término "materia agria" se le asigna en el contexto de esta invención la definición usual, habitual en el campo de la tecnología de fabricación de cerveza. Por esto se entiende en particular un medio nutritivo tratado de manera microbiológica, preferiblemente con bacterias del ácido láctico, para la disminución del pH, en particular una mezcla macerada y/o mosto.

En el contexto de esta solicitud, por los términos "mezcla macerada", "mosto" y "última agua de lavado" se entienden en particular los sustratos, que el experto conoce con esta misma denominación del proceso de elaboración de cerveza. Sin embargo, los términos no se limitan según la invención necesariamente a esto, sino que pueden referirse también a sustratos análogos, es decir precursores, en cuanto a otras bebidas u otros productos alimenticios, tales como por ejemplo mezclas maceradas de whiskey. En particular, según la invención, el mosto puede producirse a partir de una mezcla macerada según la invención, tal como se define en el presente documento.

Preferiblemente, el término "mezcla macerada" puede limitarse según la invención a una mezcla macerada, que se produjo usando un sustrato que contiene hidratos de carbono o una mezcla de sustratos que contienen hidratos de carbono. A este respecto, el sustrato que contiene hidratos de carbono o la mezcla de sustratos que contienen hidratos de carbono presenta un porcentaje de malta de cervecería de al menos el 80% en masa, preferiblemente al menos el 90% en masa, preferiblemente al menos el 95% en masa, preferiblemente al menos el 98% en masa, preferiblemente al menos el 99% en masa, en particular aproximadamente el 100% en masa.

En particular, el término "mezcla macerada" puede limitarse según la invención a una mezcla macerada, que se produjo usando malta de cervecería, en la que la malta de cervecería presenta un porcentaje de malta de trigo de al menos el 50% en masa, preferiblemente al menos el 52% en masa, en particular al menos el 55% en masa. Según la invención, el término "malta de cervecería" incluye maltas de un tipo y también mezclas de diferentes tipos de maltas.

Además, el término “mosto” puede limitarse según la invención a un mosto, que se obtuvo a partir de una mezcla macerada, que se produjo usando malta de cervecera con un porcentaje de malta de trigo de al menos el 50% en masa, preferiblemente al menos el 52% en masa, en particular al menos el 55% en masa.

Por el término “sustancias amargas de lúpulo” en el contexto de esta solicitud se entienden todas las sustancias amargas conocidas por el experto del lúpulo y de las resinas de lúpulo. A éstas pertenecen tanto las resinas blandas como las resinas duras, incluyendo los ácidos amargos, en particular los ácidos α y los ácidos β , y los derivados conocidos de estas resinas y ácidos, en particular sus productos de oxidación.

Por el término “libre de sustancias amargas de lúpulo” con respecto a un medio (por ejemplo medio nutritivo o producto de levadura) en el contexto de esta solicitud se entiende la ausencia total de sustancias amargas de lúpulo en este medio.

Por el término “esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo” con respecto a un primer medio nutritivo en el contexto de esta solicitud se entiende un contenido de sustancias amargas de lúpulo de como máximo el 15%, preferiblemente como máximo el 10%, preferiblemente como máximo el 5%, en particular como máximo el 2%, con respecto al contenido de sustancias amargas de lúpulo, que presenta un mosto de inicio de la fermentación habitual en la fabricación de cerveza para una fermentación con una levadura de baja fermentación o de alta fermentación con unidades de amargor (método EBC) en el intervalo de 15 a 38, preferiblemente de 20 a 35. A este respecto, según la invención, los datos en tanto por ciento anteriores también pueden emplearse para cada sustancia individual del grupo de las sustancias amargas de lúpulo (por ejemplo humulona o lupulona).

Por el término “esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo” con respecto a un producto de levadura en el contexto de esta solicitud se entiende un contenido de sustancias amargas de lúpulo de como máximo el 20%, preferiblemente como máximo el 15%, preferiblemente como máximo el 10%, preferiblemente como máximo el 5%, en particular como máximo el 2%, con respecto al contenido de sustancias amargas de lúpulo, que una levadura industrial de baja fermentación o de alta fermentación presenta en una fábrica de cerveza, en particular una levadura de cosecha fresca de primera, segunda o tercera fase, que se recogió durante una fermentación de un mosto habitual en la fabricación de cerveza con unidades de amargor (método EBC) en el intervalo de 15 a 38, preferiblemente de 20 a 35. A este respecto, según la invención, los datos en tanto por ciento anteriores también pueden emplearse para cada sustancia individual del grupo de las sustancias amargas de lúpulo (por ejemplo humulona o lupulona).

De manera análoga a las definiciones anteriores, en el contexto de esta solicitud el término “sustancias amargas de lúpulo... eliminan totalmente o de manera esencialmente total...” también tiene que entenderse con respecto a una levadura o un producto de levadura.

El objeto de la invención puede referirse a la producción de bebidas alcohólicas y sin alcohol en la fábrica de cerveza, en particular de cerveza, y los productos correspondientes. En el contexto de esta solicitud, a los términos “primer mosto”, “cocer”, “mantener caliente”, “turbio caliente”, “temperatura de inicio de la fermentación”, “levadura seleccionada”, “levadura de cosecha”, “lavado de la levadura”, “procesar para dar una bebida”, “acidificación del mosto”, “acidificación de la mezcla macerada” etc. se les asigna entonces en cada caso el significado que un experto en el campo de la producción de bebidas, en particular en el campo de la producción de cerveza, le asigne habitualmente al respectivo término técnico o a la actividad. Lo análogo es aplicable al uso de términos para objetos o actividades dentro de esta solicitud, que se refieren a la producción o el tratamiento de productos alimenticios sólidos o pastosos o de tipo gel y los productos correspondientes.

Por “tratamiento” o “tratar” con bacterias del ácido láctico o levadura, en el contexto de esta solicitud se entiende cada tipo de metabolización parcial o completa de sustancias nutritivas procedentes de un medio nutritivo, en particular una fermentación parcial o completa, mediante bacterias del ácido láctico. Además, “tratar” puede ser cualquier tipo de puesta en contacto o contacto de microorganismos, preferiblemente bacterias del ácido láctico o levadura, en particular de las bacterias del ácido láctico y levaduras de cerveza previstas según la invención en esta solicitud, con un medio nutritivo.

El término “bacterias del ácido láctico” en el sentido de esta solicitud comprende cada especie y estado de bacterias del ácido láctico, es decir cualquier especie o subespecie o cualquier cepa, siempre que ésta no esté limitada de otra manera en esta solicitud. Además, este término comprende células bacterianas vivas y/o muertas, en particular células bacterianas vivas. Los números de DSMZ indicados en esta solicitud sirven únicamente para una identificación inequívoca de las especies o subespecies bacterianas usadas según la invención. Sin embargo, la invención no se limita a la DSMZ como única fuente de referencia para estas especies o subespecies bacterianas usadas según la invención.

Según la invención, por “cerveza de trigo” se entiende una cerveza de alta fermentación con un porcentaje de malta de trigo de al menos el 50% en masa, preferiblemente al menos el 52% en masa, en particular al menos el 55% en masa, en el material a granel o en el sustrato que contiene hidratos de carbono.

Por el término “sin alcohol” con respecto a un producto alimenticio, bebida o cerveza u otro producto mencionado en esta solicitud según la invención se entiende un contenido de etanol en el producto de 0 a menos del 1,2% en volumen, preferiblemente de 0 a menos del 1,0% en volumen, preferiblemente de 0 a menos del 0,5% en volumen, preferiblemente de 0 a menos del 0,3% en volumen, preferiblemente de 0 a menos del 0,1% en volumen, en particular de aproximadamente el 0% en volumen.

En el contexto de esta solicitud, por la indicación “aproximadamente” o similares se entiende una desviación relativa con respecto al respectivo valor de referencia de como máximo el 10%, preferiblemente como máximo el 5%, preferiblemente como máximo el 3%, en particular como máximo el 1%.

Los datos de volumen o porcentaje en volumen usados en esta solicitud se refieren siempre a la temperatura o temperaturas, que un experto asignaría normalmente al fluido o la mezcla a los que hacen referencia para el respectivo propósito de uso o en la respectiva etapa de procedimiento, siempre que no se indique explícitamente una temperatura.

Todas las masas y concentraciones en masa indicadas en la solicitud se refieren en cada caso a la materia seca de la sustancia en cuestión.

Estado de la técnica

El documento EP 0 545 139 B1 da a conocer una bebida de malta, que presenta un caldo de malta sin fermentar con un contenido de mostro primitivo de entre el 2 y el 15%. Esta bebida de malta puede estar ligeramente lupulada y presenta un contenido de cianocobalamina en el intervalo de 5 a 30 microgramos por litro.

En el documento EP 824 152 B1 se describe la producción de vitamina B₁₂ natural en concentraciones relativamente altas ($\geq 0,1\%$ en peso) usando *Propionibacterium freudenreichii*.

De manera similar, el documento GB 793 467 A se refiere a la producción de preparaciones, que presentan una alta actividad de vitamina B₁₂, en particular mediante el cultivo de un determinado tipo de *Propionibacterium*, en particular *P. freudenreichii* o *P. shermanii*. En este sentido se da a conocer un procedimiento para producir una preparación fisiológicamente activa de vitamina B₁₂, que está libre de variantes de pseudovitamina B₁₂ o vitamina B₁₂ inactiva.

Enseñanzas similares pueden deducirse además de los documentos GB 925 526 A y GB 1 007 972 A.

El documento US 6 492 141 B1 se refiere a la producción industrial de vitamina B₁₂ usando *Propionibacterium*.

El documento US 2006/0 051323 A1 da a conocer un alimento, que presenta partículas, que presenta una biomasa microbiana y un portador sólido, en el que la biomasa contiene vitamina B₁₂. A este respecto, la biomasa puede comprender por ejemplo *Propionibacterium*, preferiblemente *P. freudenreichii*. La biomasa generada de esta manera puede usarse como aditivo alimenticio en forma secada por pulverización.

El documento WO 2012/143 469 A1 da a conocer un producto alimenticio en forma de barrita, que contiene partículas sólidas, compuestas por ejemplo por granos de cereal, así como vitamina B₁₂ en forma de diferentes cobalaminas.

El documento WO 2009/124 529 A2 da a conocer un procedimiento para la producción de un refresco, que se consigue con cobalamina formada microbiológicamente mediante la inoculación adicional con una capa de microorganismos que sintetiza cobalamina. A este respecto, como especies de microorganismos que sintetizan cobalamina se prefieren especialmente por ejemplo *Torulopsis glabrata*, *Lactobacillus lactis (lactis)* y *Kluyveromyces lactis*.

El documento JP 5814629 2 A enseña la generación microbiana de vitamina B₁₂ con un alto rendimiento usando *Propionibacterium freudenreichii* y *Propionibacterium shermanii*.

La solicitud de patente no publicada DE 10 2013 100891.7 da a conocer un procedimiento para la producción de una materia agria, de una mezcla macerada, de un mosto, de una bebida, de un producto alimenticio, de un agua de remojo y de una malta y los productos correspondientes. A este respecto, los productos contienen vitamina B₁₂, que está biodisponible al menos en un alto porcentaje para el cuerpo humano y/o animal.

La publicación para información de solicitud de patente EP 2 548 948 A1 da a conocer un producto, que puede obtenerse mediante la fermentación láctica de un sustrato mediante una cepa de la especie *Lactobacillus plantarum*, en particular FERM ABP-11349 o FERM ABP-11350, que puede alcanzar un número de células de 10⁸ KBE/g en un zumo de naranja o de pomelo puro.

La publicación para información de solicitud de patente WO 2013/084 052 A1 da a conocer un producto, que puede

obtenerse mediante la fermentación láctica de un sustrato mediante una cepa de la especie *Lactobacillus reuteri* como generador de vitamina B₁₂, seleccionada del grupo que consiste en DSM 23877, DSM 23878, DSM 23879 y DSM 23880.

La publicación para información de solicitud de patente WO 2014/118 191 A1 da a conocer un procedimiento para la producción de un producto alimenticio con las etapas de proporcionar una mezcla macerada o un mosto o una última agua de lavado como primer medio nutritivo; y de tratar el primer medio nutritivo con bacterias del ácido láctico de la especie *Lactobacillus coryniformis*, de la especie *Lactobacillus backii* (DSMZ n.º 18080), de la especie *Lactobacillus plantarum* o de la especie *Lactobacillus fermentum* (DSMZ n.º 20052) o con una mezcla de bacterias del ácido láctico de al menos dos de estas especies.

Sin embargo, sería deseable que pudiese aumentarse adicionalmente la cantidad o concentración de vitamina B₁₂, que está contenida en los productos que se generan con el procedimiento comentado en último lugar.

Por la presente se hace referencia en todo su contenido a la solicitud de patente no publicada DE 10 2013 100891.7, de modo que toda su divulgación, en particular los efectos y las características técnicas mencionados en la misma, pasa a formar parte de la divulgación de esta solicitud y de la invención descrita en el presente documento.

Objetivo de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado para la producción de un producto alimenticio o de un precursor del mismo, en particular de una materia agria, de una mezcla macerada, de un mosto, de una bebida o de un producto alimenticio no fluido, y el producto alimenticio correspondiente o un precursor del mismo, en el que este producto alimenticio o ya un precursor del mismo es adecuado para mejorar el abastecimiento de vitamina B₁₂ del cuerpo humano y/o animal en el caso de ingerir este producto alimenticio o un precursor del mismo.

Un aspecto de la presente invención es proporcionar un producto alimenticio o un precursor del mismo, que contenga una cantidad o concentración aumentada de vitamina B₁₂.

Un aspecto de la presente invención es proporcionar un producto alimenticio o un precursor del mismo que se haya producido de manera natural y/o cuyas materias primas sean admisibles según la ley de pureza alemana o correspondan a la ley de pureza alemana.

Un aspecto adicional de esta invención es implementar el objetivo definido anteriormente y/o al menos uno de los aspectos definidos anteriormente de manera técnicamente sencilla y económica, en particular con el equipamiento presente convencionalmente en una fábrica de cerveza.

Sumario de la invención

El objetivo según la invención se alcanza mediante los objetos de las reivindicaciones 1 a 13 como mediante los objetivos definidos a continuación.

Desde el punto de vista de la técnica del procedimiento, el objetivo según la invención se alcanza mediante un procedimiento para la producción de un producto alimenticio o de un precursor del mismo según la reivindicación 1. A este respecto, el procedimiento presenta al menos las siguientes etapas:

(a) proporcionar un primer medio nutritivo, preferiblemente una mezcla macerada o un mosto, en particular un primer mosto, o una última agua de lavado; y

(b) tratar el primer medio nutritivo con bacterias del ácido láctico de la especie *Lactobacillus coryniformis*, en particular de la subespecie *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* (DSMZ n.º 20007), de la especie *Lactobacillus backii* (DSMZ n.º 18080), de la especie *Lactobacillus plantarum* (preferiblemente DSMZ n.º 2601 ó 2648 ó 13273), en particular de las subespecies *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* (DSMZ n.º 20174) o *Lactobacillus plantarum* subsp. *argenteratensis* (DSMZ n.º 16365), o de la especie *Lactobacillus fermentum* (DSMZ n.º 20052) o con una mezcla de bacterias del ácido láctico de al menos dos de estas especies o subespecies.

A este respecto, el tratamiento según la etapa (b) tiene lugar en presencia de un producto de levadura, en el que el producto de levadura contiene un extracto, un autolisado y/o una forma secada de una levadura o está compuesto por un extracto, un autolisado y/o una forma secada de una levadura. Según la invención, el producto de levadura también puede ser o contener cualquier mezcla de un extracto, un autolisado y/o una forma secada de una levadura. El producto de levadura está presente preferiblemente en una concentración en masa en el intervalo de $\geq 0,2$ y ≤ 20 g/l con respecto al primer medio nutritivo.

Mediante el tratamiento del primer medio nutritivo con las bacterias del ácido láctico mencionadas anteriormente se obtiene un medio, en particular una materia agria, que contiene vitamina B₁₂.

Sorprendentemente, mediante la presencia de un producto de levadura o de una combinación de los productos de levadura descritos durante el tratamiento del primer medio nutritivo con bacterias del ácido láctico de dichas especies puede aumentarse la cantidad y/o concentración en masa de vitamina B₁₂ generada en el primer medio nutritivo.

En particular, a partir de una adición o concentración en masa del producto de levadura de aproximadamente 0,2 g/l (con respecto al primer medio nutritivo) puede observarse un aumento de la cantidad generada y/o concentración en masa de vitamina B₁₂, también cuando el producto de levadura no contiene vitamina B₁₂ como tal. A este respecto, la cantidad generada adicionalmente de vitamina B₁₂ aumenta con la concentración en masa del producto de levadura presente durante el tratamiento al menos a lo largo de un determinado intervalo de concentración de manera aproximadamente lineal.

Más allá de una concentración en masa del producto de levadura de aproximadamente 20 g/l (con respecto al primer medio nutritivo) se produce una fuerte formación de sedimentos en el recipiente de reacción, y pueden producirse mermas de calidad en el producto alimenticio (o un precursor del mismo) generado en cuanto al olor y al sabor. Esto puede atribuirse presuntamente a una acumulación excesiva de material celular y sus productos de degradación.

Cuando el producto de levadura es una levadura secada, en el caso de adiciones elevadas, en particular en el caso de adiciones más allá de 20 g/l, puede producirse el desarrollo de un olor desagradable. Esto puede atribuirse presuntamente a la liberación potenciada de ácidos grasos y/o sus productos de degradación. Además, la realización técnica del procedimiento reivindicado en el caso de utilizar grandes cantidades de productos de levadura, en particular en el caso de concentraciones en masa más allá de 20 g/l, se vuelve cada vez menos rentable.

Según la invención, el primer medio nutritivo puede ser, por ejemplo, un caldo nutritivo, una mezcla macerada, un mosto, preferiblemente un primer mosto, o una última agua de lavado.

En particular, con el uso de mezcla macerada o mosto como primer medio nutritivo, el solicitante ha establecido sorprendentemente que las bacterias del ácido láctico utilizadas según la invención en un medio de este tipo y precisamente en presencia de un producto de levadura generan vitamina B₁₂ de manera incrementada y por consiguiente son adecuadas para generar vitamina B₁₂. Además se estableció que la vitamina B₁₂ generada por medio de las bacterias del ácido láctico utilizadas según la invención también está biodisponible en el sentido de esta solicitud.

En el caso de emplear el procedimiento según la invención puede conseguirse por tanto una generación aún más aumentada en cuanto a cantidad de vitamina B₁₂, en particular vitamina B₁₂ biodisponible, aparentemente sin que tenga lugar un "cambio" del metabolismo de las bacterias del ácido láctico previstas según la invención a la generación de sustancias no deseadas. Un cambio de este tipo se conoce por ejemplo por bacterias del ácido láctico de otras especies, tal como por ejemplo *Lactobacillus reuteri*.

Formas de realización ventajosas del procedimiento según la invención son el objeto de las reivindicaciones dependientes.

Así, el primer medio nutritivo puede estar libre o esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo; y/o el producto de levadura estar libre o esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo.

El primer medio nutritivo y/o el producto de levadura pueden extraerse del proceso de elaboración de cerveza. En particular, el primer medio nutritivo puede ser un mosto extraído o mosto de inicio de la fermentación. Además, el producto de levadura puede ser una levadura seleccionada, por ejemplo absorbida de mosto lupulado, o una levadura de cosecha, por ejemplo de la primera, segunda fase o una posterior. Para estos casos, los inventores han descubierto que en el primer medio nutritivo y/o en el producto de levadura al parecer pueden estar contenidas sustancias inhibitorias, que pueden ser perjudiciales para generar vitamina B₁₂ por medio de las especies de bacterias del ácido láctico propuestas. En este sentido probablemente se trata de las sustancias amargas de lúpulo.

Según el conocimiento de los inventores pueden eliminarse, por ejemplo mediante un lavado individual o múltiple del producto de levadura con agua, en particular agua potable o agua cervecera, las sustancias amargas de lúpulo totalmente o de manera esencialmente total del producto de levadura. La utilización de un producto de levadura de este tipo, liberado de sustancias amargas de lúpulo en el procedimiento según la invención conduce a un aumento de la generación de vitamina B₁₂.

De manera similar pudo establecerse una inhibición al menos parcial de la generación de vitamina B₁₂ en el procedimiento según la invención, cuando el primer medio nutritivo no estaba libre o no esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo. Por tanto resulta ventajosa la utilización de una mezcla macerada o mosto no lupulado, por ejemplo de un primer mosto o mosto extraído o de inicio de la fermentación no lupulado, como primer medio nutritivo, que están libres de sustancias amargas de lúpulo.

Además, el producto de levadura puede obtenerse a partir de una levadura de alta fermentación o de baja fermentación del género *Saccharomyces*, en particular de la especie *Saccharomyces cerevisiae* o de la especie *Saccharomyces carlsbergensis*. A este respecto, la levadura es preferiblemente una levadura seleccionada o una levadura de cosecha del procedimiento de elaboración de cerveza. Además, las sustancias amargas de lúpulo se eliminan totalmente o de manera esencialmente total de la levadura o del producto de levadura, preferiblemente mediante un lavado individual o múltiple de la levadura o del producto de levadura con agua, en particular con agua potable o agua cervecera.

Al obtenerse el producto de levadura de una levadura de alta fermentación o de baja fermentación habitual en la fabricación de cerveza, en particular de una levadura de cosecha, en el caso de realizar el procedimiento según la invención en una fábrica de cerveza está disponible una fuente económica y en cuanto a la cantidad prácticamente ilimitada para la materia prima del producto de levadura.

Además, estudios han mostrado que un producto de levadura obtenido usando dichas levaduras tiene un efecto especialmente positivo sobre la generación de vitamina B₁₂ según el procedimiento según la invención.

Adicionalmente, el procedimiento puede presentar además las etapas de:

(e) proporcionar un segundo medio nutritivo, preferiblemente una mezcla macerada o un mosto, en particular un mosto extraído; y

(f) mezclar el medio obtenido en la etapa (b) con el segundo medio nutritivo.

Mediante el mezclado del medio obtenido en la etapa (b) con un segundo medio nutritivo, preferiblemente con una mezcla macerada o un mosto, mediante una etapa de procedimiento adicional sencilla puede generarse una mezcla macerada o mosto acidificada biológicamente. El experto conoce las ventajas tecnológicas de la acidificación biológica de la mezcla macerada o del mosto. Más allá de las ventajas convencionales, el procedimiento según la invención permite además la obtención de una mezcla macerada o mosto con un contenido aumentado de vitamina B₁₂ biodisponible.

Cuando se usa una mezcla macerada o mosto como segundo medio nutritivo, se consigue ventajosamente que la vitamina B₁₂ generada se conserve de manera esencialmente cuantitativa y no se vuelva a absorber o se metabolice por las bacterias del ácido láctico. Además, la vitamina B₁₂ sigue estando biodisponible de manera esencialmente total o al menos en un alto porcentaje. Por consiguiente puede generarse una mezcla macerada o mosto, que presenta un contenido de vitamina B₁₂ considerablemente aumentado con respecto a las mezclas maceradas o mostos convencionales, sin estar excesivamente acidificado.

Así, una mezcla macerada generada según la invención puede presentar un valor de pH en el intervalo de 4,5 a 5,7, preferiblemente de 4,9 a 5,3. Un mosto generado según la invención puede presentar un valor de pH en el intervalo de 4,2 a 5,7, preferiblemente de 4,6 a 5,0.

El ajuste del valor de pH de la mezcla macerada o mosto a los valores indicados conduce a ventajas tecnológicas, tales como por ejemplo una mejor estabilidad del sabor, estabilidad de la espuma y un color más claro de la cerveza.

El procedimiento puede presentar además las etapas de:

(i) clarificar preferiblemente el medio obtenido en la etapa (b) o (f),

(k) cocer o mantener caliente y preferiblemente añadir lúpulo al medio obtenido en la etapa (f) o (i);

(l) eliminar al menos parcialmente el turbio caliente del medio obtenido en la etapa (k); y

(m) ajustar preferiblemente la temperatura del medio obtenido en la etapa (1) a una temperatura de inicio de la fermentación.

Mediante el empleo de las etapas (i) a (m) puede procesarse adicionalmente la mezcla macerada o mosto acidificado biológicamente según la invención para dar un mosto de extracción y de inicio de la fermentación fermentable, que presenta igualmente un contenido aumentado de vitamina B₁₂ biodisponible.

Así, el procedimiento puede presentar además la etapa de:

(p) procesar el medio obtenido en una de las etapas (b), (f), (k), (l) o (m) para dar una bebida, tratar preferiblemente este medio con una levadura del género *Saccharomyces*, en particular con la especie *Saccharomyces cerevisiae* o la especie *Saccharomyces carlsbergensis*.

Los precursores obtenidos en las diferentes etapas de procedimiento pueden procesarse adicionalmente según la invención de manera convencional, por ejemplo mediante fermentación alcohólica y no alcohólica, para dar una bebida, que presenta igualmente un contenido aumentado de vitamina B₁₂ biodisponible. Esta bebida puede ser en particular: una bebida sin alcohol, una cerveza, en particular una cerveza sin alcohol, una cerveza de trigo, en particular una cerveza de trigo sin alcohol, una bebida que contiene cerveza, en particular una bebida mezclada con cerveza, una bebida fermentada con una levadura o no fermentada con levadura. La bebida según la invención presenta un contenido aumentado de vitamina B₁₂ biodisponible.

A pesar del contenido aumentado adicionalmente según la invención de vitamina B₁₂ en la bebida terminada, según el conocimiento de los inventores no tiene lugar o no esencialmente un perjuicio de la biodisponibilidad o un empobrecimiento en las etapas de procedimiento adicionales hasta la bebida terminada. Por consiguiente, son aplicables de manera análoga las mismas ventajas del primer medio nutritivo tratado según la invención, en particular de la materia agria generada, también a la bebida producida según la invención, en particular para una cerveza y una cerveza sin alcohol.

El procedimiento puede presentar además la etapa de:

(q) procesar el medio obtenido en una de las etapas (b), (f), (k), (l) o (m) o la bebida obtenida en la etapa (p) para dar un producto alimentación no fluido, en particular sólido;

en el que el medio obtenido en una de las etapas (b), (f), (k), (l) o (m) o la bebida obtenida en la etapa (p) se mezcla con un precursor del producto alimenticio no fluido.

Los precursores obtenidos en las diferentes etapas de procedimiento o la bebida pueden procesarse adicionalmente según la invención de manera convencional, por ejemplo mediante concentración y/o mezclado con otros componentes, para dar un producto alimenticio no fluido, que igualmente presenta un contenido aumentado de vitamina B₁₂ biodisponible. Este producto alimenticio puede ser en particular: un producto alimenticio que contiene cereales, en particular una barrita que contiene cereales, cereales para el desayuno, un producto de extracto de malta, un producto de panadería y pastelería, un producto lácteo, en particular un yogur.

Por consiguiente, las ventajas de la bebida producida según la invención son aplicables de manera análoga al producto alimenticio no fluido según la invención explicado anteriormente.

El porcentaje en masa de agua en el medio, que se obtuvo en una de las etapas (b), (f), (k), (l) o (m), en la bebida obtenida en la etapa (p) o en el producto alimenticio no fluido obtenido en la etapa (q) puede ajustarse a menos del 35%, preferiblemente menos del 30%, preferiblemente menos del 25%, preferiblemente a menos del 20%, en particular a menos del 15%.

Porcentajes de agua mayores que los indicados anteriormente no permiten garantizar la estabilidad microbiológica del producto alimenticio generado con el procedimiento según la invención o de un precursor del mismo. Si se ajusta el contenido de agua mediante deshidratación, se reducen los costes de transporte y de almacenamiento para el medio concentrado debido a la reducción del volumen.

Además, el medio concentrado puede prepararse en cualquier lugar e independientemente del lugar de producción llevarse mediante reconstitución hasta la concentración original o una concentración deseada.

Además, el medio concentrado presenta una viscosidad aumentada con respecto a la sustancia de partida, que es ventajosa en el caso del uso del medio concentrado para la producción de productos alimenticios. Así, el medio concentrado puede servir por ejemplo como aglutinante para componentes de producto alimenticio granulados o pulverulentos.

Además resulta ventajoso que el porcentaje en masa de agua en el medio o la bebida generada según la invención se ajuste a más del 0%, en particular más del 5%.

Mediante el ajuste de un contenido de agua residual definido se evita la formación de polvo durante el procesamiento o la manipulación del producto alimenticio o de los precursores del mismo.

El objetivo según la invención se alcanza además mediante el objeto de la reivindicación de producto 9. En ésta se reivindica un producto alimenticio o un precursor del mismo, que se produce con un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8.

A este respecto, las ventajas mencionadas en la descripción del procedimiento de producción según la invención son aplicables de manera análoga a un producto alimenticio generado por medio de este procedimiento o un precursor del mismo, en particular una materia agria, una mezcla macerada, un mosto, una bebida o un producto alimenticio no fluido.

El objetivo según la invención se alcanza además mediante el objeto de las reivindicaciones de uso 10 y 11.

En éstas se reivindica el uso de un producto de levadura en un procedimiento para la producción de un producto alimenticio o de un precursor del mismo, preferiblemente en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8. A este respecto, el procedimiento presenta al menos las etapas de:

(a) proporcionar un primer medio nutritivo, preferiblemente una mezcla macerada o un mosto, en particular un primer mosto, o una última agua de lavado; y

(b) tratar el primer medio nutritivo con bacterias del ácido láctico de la especie *Lactobacillus coryniformis*, en particular de la subespecie *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* (DSMZ n.º 20007), de la especie *Lactobacillus backii* (DSMZ n.º 18080), de la especie *Lactobacillus plantarum* (preferiblemente DSMZ n.º 2601 ó 2648 ó 13273), en particular de las subespecies *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* (DSMZ n.º 20174) o *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* (DSMZ n.º 16365), o de la especie *Lactobacillus fermentum* (DSMZ n.º 20052) o con una mezcla de bacterias del ácido láctico de al menos dos de estas especies o subespecies.

A este respecto, el tratamiento de la etapa (b) tiene lugar en presencia del producto de levadura. Además, el producto de levadura contiene un extracto, un autolisado y/o una forma secada de una levadura. El producto de levadura puede estar compuesto también por un extracto, un autolisado y/o una forma secada de una levadura.

Además se reivindica el uso de un procedimiento para la producción de un producto alimenticio o de un precursor del mismo según una de las reivindicaciones 1 a 8 para aumentar la biodisponibilidad y/o la cantidad generada y/o la concentración en masa de vitamina B₁₂, preferiblemente de vitamina B₁₂ biodisponible, en el producto alimenticio o en el precursor del mismo.

Las ventajas mencionadas en la descripción del procedimiento de producción según la invención son aplicables de manera análoga a los usos según la invención incluyendo sus formas de realización especificadas. Además, todas las características dadas a conocer en relación con el procedimiento según la invención también pueden combinarse con el uso según la invención.

A este respecto, el producto de levadura puede estar presente en una concentración en masa en el intervalo de $\geq 0,2$ y ≤ 20 g/l con respecto al primer medio nutritivo.

Además, el primer medio nutritivo puede estar libre o esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo. Adicional o alternativamente, el producto de levadura puede estar libre o esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo.

Alternativas y descripción adicional de la invención

La invención no se limita al uso de *Lactobacillus coryniformis*, en particular *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis*. Los procedimientos de producción así como los productos descritos anteriormente pueden realizarse o producirse alternativamente también con bacterias del ácido láctico de las especies *Lactobacillus backii*, *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus fermentum* o con una mezcla de bacterias del ácido láctico de al menos dos de estas especies o de las subespecies dadas a conocer. De este modo se implementan de manera análoga las ventajas y propiedades descritas anteriormente.

Según la invención, la concentración en masa o el contenido del producto de levadura con respecto al primer medio nutritivo también puede estar limitado al intervalo de más de 0,2 a menos de 10 g/l. Con la elección del límite superior de 10 g/l se evita de manera fiable una formación de sedimentos en el recipiente de reacción.

Además, la concentración en masa o el contenido del producto de levadura con respecto al primer medio nutritivo, en particular en la forma secada de la levadura, también puede estar limitado al intervalo de más de 5 a menos de 10 g/l. En este intervalo de concentración se consigue un gran aumento de la generación de vitamina B₁₂, en el que no aparecen o sólo de manera mínima las desventajas comentadas anteriormente de concentraciones de levadura aumentadas.

Si como producto de levadura se selecciona un extracto de levadura o un autolisado de levadura, entonces puede seleccionarse su concentración en masa en el intervalo de más de 3 a menos de 15 g/l, para conseguir un gran aumento de la generación de vitamina B₁₂ y al mismo tiempo una calidad aceptable del producto alimenticio resultante o de sus precursores.

Además, en este caso el intervalo de concentración en masa puede limitarse a de más de 0,2 a menos de 4 g/l. En este intervalo de concentración ya se produce un aumento significativo de la generación de vitamina B₁₂, en el que se suprimen totalmente los fenómenos desventajosos de los intervalos de concentración en masa elevados. En este intervalo la generación de vitamina B₁₂ es además especialmente rentable.

Por otro lado, para un extracto de levadura o un autolisado de levadura también puede seleccionarse un intervalo de

concentración en masa de más de 4 a menos de 10 g/l. En este intervalo el aumento de la generación de vitamina B₁₂ es especialmente elevado, mientras que los fenómenos negativos asociados debido a la alta concentración de producto de levadura (si acaso) aparecen sólo de forma mínima. Por consiguiente, en este intervalo puede conseguirse un alto rendimiento de vitamina B₁₂ con una calidad del olor o sabor aceptable del producto alimenticio resultante o de sus precursores.

Ventajosamente, un precursor del producto de levadura, en particular una levadura seleccionada o levadura de cosecha de alta fermentación o de baja fermentación de la fábrica de cerveza, puede lavarse una o varias veces con agua u otra sustancia adecuada. Esto tiene lugar por ejemplo mediante la suspensión de las células de levadura en el agua y centrifugación. Tras desechar el sobrenadante puede suspenderse de nuevo en agua la masa de levadura lavada de esta manera y a continuación centrifugarse de nuevo. Las etapas de resuspender y centrifugar pueden repetirse tantas veces, hasta que se alcance un grado de pureza deseado, en particular hasta que la levadura esté libre o esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo.

Ventajosamente, como primer medio nutritivo se selecciona un primer mosto de la fábrica de cerveza, en el que el primer mosto en la etapa (a) presenta un contenido de extracto en el intervalo del 7 al 28%, preferiblemente del 10 al 22%, preferiblemente del 12 al 19%, en particular del 14 al 16%.

El primer mosto como primer medio nutritivo se caracteriza por un alto contenido de sustancias nutritivas necesarias para las bacterias del ácido láctico usadas en el procedimiento según la invención. Además, el primer mosto está fácilmente disponible y puede generarse de manera sencilla con las instalaciones de una fábrica de cerveza convencional.

Además puede utilizarse una gran amplitud de concentraciones en cuanto al contenido de extracto del primer mosto, con lo que el procedimiento es flexible en su aplicación.

El procedimiento según la invención también puede emplearse en el caso de medios nutritivos muy concentrados, que se obtienen por ejemplo en el procedimiento de alta densidad, consiguiendo las ventajas asociadas con el mismo, en particular un ahorro de volumen y de costes.

En una forma de realización ventajosa, el primer medio nutritivo se diluye con agua, en particular agua cervecera, antes del tratamiento con las bacterias del ácido láctico de tal manera que el contenido de extracto de la dilución resultante se encuentra en el intervalo del 5 al 10%, preferiblemente del 6 al 9%, en particular del 7 al 8%.

Mediante una dilución del primer medio nutritivo puede ajustarse la concentración de sustancias nutritivas óptima para los microorganismos utilizados usados en el procedimiento según la invención.

Además puede reducirse el consumo del primer medio nutritivo que debe generarse.

El primer medio nutritivo puede inocularse con las bacterias del ácido láctico en una cantidad, de modo que la densidad óptica (DO) del primer medio nutritivo directamente tras la inoculación se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 1,0 DO, preferiblemente de 0,2 a 0,8, preferiblemente de 0,3 a 0,7, preferiblemente de 0,4 a 0,5 DO, en particular asciende a aproximadamente 0,45 DO, en el que el valor de medición de la densidad óptica se mide a una longitud de onda de 620 nm y está corregido en cuanto a la influencia del primer medio nutritivo.

La inoculación del primer medio nutritivo con los microorganismos usados según la invención de tal manera que la densidad óptica (DO) mencionada anteriormente o una densidad celular correspondiente se ajuste al inicio del tratamiento, conduce a una conversión rápida y por consiguiente a un tiempo de tratamiento ventajosamente corto.

Además, una concentración de inoculación óptima de las bacterias del ácido láctico conduce a un perfil de aroma óptimo con concentraciones mínimas de aromas indeseables o su ausencia total.

Una densidad óptica del primer medio nutritivo directamente tras la inoculación y dado el caso homogeneización de menos de 0,4, preferiblemente 0,3, preferiblemente 0,2 y en particular 0,1 requiere de manera desventajosa una duración de tiempo demasiado larga hasta que se consigue una alta tasa de reacción de sustancias perseguida, de las bacterias del ácido láctico.

Por el contrario, una densidad óptica del primer medio nutritivo directamente tras la inoculación y dado el caso homogeneización de más de 0,5, preferiblemente 0,7, preferiblemente 0,8, en particular 1,0 no provoca condiciones de crecimiento óptimas para las bacterias del ácido láctico, por ejemplo debido a retroinhibición.

Las bacterias del ácido láctico pueden encontrarse al inicio del tratamiento del primer medio nutritivo, en particular durante su adición al primer medio nutritivo, según la etapa (b) en la fase log o fase de crecimiento.

Una inoculación con microorganismos, que se encuentran en la fase log (fase logarítmica) o fase de crecimiento, conduce ventajosamente debido a la alta actividad de los microorganismos utilizados a una conversión rápida del

primer medio nutritivo en materia agria.

La duración del tratamiento según la etapa (b) puede ascender a entre aproximadamente 5 y 50 horas, preferiblemente de 20 a 48, en particular de 30 a 44 horas, en particular de 36 a 42 horas.

El periodo de tiempo de tratamiento previsto según la invención puede limitarse ventajosamente a las cortas duraciones de tiempo indicadas anteriormente. De este modo puede proporcionarse a corto plazo un primer medio nutritivo tratado, en particular una materia agria. En particular, en el caso de una duración de tratamiento de menos de 5 horas el rendimiento de vitamina B₁₂ y/o lactato es demasiado reducido. Por el contrario, en el caso de una duración de tratamiento de más de 50 horas no se consigue un aumento adicional de la generación de vitamina B₁₂ biodisponible. Además existe el peligro de una acidificación en exceso.

El tratamiento según la etapa (b) puede llevarse a cabo a una temperatura del medio nutritivo en el intervalo de aproximadamente 15 a 48°C, preferiblemente de 25 a 42°C, en particular de 32 a 40°C, en particular de 35 a 39°C, en particular de 36 a 38°C.

El tratamiento según la etapa (b) puede tener lugar ventajosamente en un amplio intervalo de temperatura. Una elección de la temperatura entre aproximadamente 30 y 40°C crea condiciones de crecimiento óptimas para los microorganismos usados, con lo que se acorta el tiempo de tratamiento necesario y se obtiene una calidad óptima del producto resultante.

El procedimiento puede presentar además una etapa, en la que se esteriliza el primer medio nutritivo tratado según la etapa (b).

Mediante una etapa de esterilización final puede excluirse que las bacterias del ácido láctico utilizadas según la invención puedan tener una influencia no deseada sobre el respectivo producto en el caso del uso adicional del producto, por ejemplo en el contexto de una producción de productos alimenticios o de bebidas, en particular en la producción de cerveza.

Así, en particular en el caso de una utilización de levadura en una etapa de procedimiento posterior, no se ven influidas negativamente sus actividades metabólicas.

Por consiguiente, la esterilización puede tener lugar con todos los medios conocidos por el experto. A este respecto se prefiere la adición de la materia agria al mosto en cocción o caliente.

El medio obtenido en una de las etapas (b), (f), (k), (l) o (m), la bebida obtenida en la etapa (p) o el producto alimenticio no fluido obtenido en la etapa (q) puede presentar un porcentaje en masa de ácido láctico en el intervalo de aproximadamente el 0,1 al 1,0%, preferiblemente del 0,2 al 0,6%, preferiblemente de aproximadamente el 0,3 al 0,5%, en particular de aproximadamente el 0,35 al 0,45%.

Mediante la presencia de ácido láctico en los porcentajes en masa indicados puede usarse el medio generado según la invención, en particular la materia agria, ventajosamente para el ajuste de un determinado valor de pH, por ejemplo de mezcla macerada o mosto. De este modo puede efectuarse de manera natural y de manera correspondiente a la ley de pureza un ajuste de valor de pH de productos alimenticios o precursores de los mismos correspondientes, en particular de mezcla macerada o mosto.

El segundo medio nutritivo puede presentar durante la realización de la etapa (f) una temperatura de al menos 50°C, preferiblemente al menos 60°C, preferiblemente al menos 70°C, preferiblemente al menos 80°C, en particular al menos 90°C, en particular al menos 95°C.

Mediante la adición del medio obtenido en la etapa (b) al segundo medio nutritivo a una temperatura elevada se consigue una inactivación o esterilización eficaz de al menos una parte de las bacterias del ácido láctico en una etapa. De este modo se suprime una etapa de esterilización separada así como el esfuerzo de coste, tiempo y energía asociado a la misma.

El medio obtenido en la etapa (b) puede añadirse en un porcentaje en volumen del 2 al 20%, preferiblemente del 5 al 15%, preferiblemente del 6 al 12%, preferiblemente del 7 al 11%, en particular del 8 al 10%, con respecto al volumen de la mezcla resultante.

Mediante el ajuste de un porcentaje en volumen de este tipo de la materia agria en la mezcla resultante puede conseguirse un valor de pH óptimo para la mezcla macerada o mosto, preferiblemente un valor de pH de la mezcla resultante en el intervalo de 4,2 a 5,5, preferiblemente de 4,6 a 5,3.

El tratamiento del primer medio nutritivo con bacterias del ácido láctico según la etapa (b) puede tener lugar en condiciones esencialmente anaeróbicas, en particular en condiciones anaeróbicas.

Posiblemente, la elección de condiciones anaeróbicas o condiciones esencialmente anaeróbicas durante el tratamiento del medio nutritivo con las bacterias del ácido láctico utilizadas según la invención tiene un efecto positivo sobre la cantidad y/o biodisponibilidad de la vitamina B₁₂ generada.

- 5 Preferiblemente se producen condiciones anaeróbicas mediante cierre hermético y/o gasificación con CO₂ o N₂ u otras medidas conocidas.

10 El producto alimenticio generado según la invención, en particular la bebida, puede ser conforme a la ley de pureza alemana o producirse exclusivamente a partir de ingredientes, que están autorizados según la ley de pureza alemana para la producción de cerveza. Así, las materias primas del producto alimenticio o bebida según la invención pueden limitarse a las materias primas autorizadas según la ley de pureza alemana para la fabricación de cerveza, en particular malta de cebada, malta de trigo y agua cervecera así como los microorganismos utilizados según la invención. Por consiguiente, según la invención se hace posible por primera vez proporcionar un producto alimenticio, en particular una bebida, con vitamina B₁₂ disponible en una concentración en masa aumentada, que
15 corresponde a la ley de pureza.

20 El producto alimenticio generado según la invención puede presentar una consistencia de tipo gel o pasta. Una consistencia de tipo gel o pasta favorece ventajosamente una resorción más rápida o mejor de las sustancias nutritivas contenidas en el mismo, en particular de la vitamina B₁₂, en el cuerpo humano o animal. Además, una consistencia de tipo gel o pasta provoca una compatibilidad mejorada y una fácil capacidad de ingesta o de manipulación, por ejemplo durante el consumo durante actividades deportivas o de ocio.

25 El producto alimenticio generado según la invención puede presentar un porcentaje en masa de vitamina B₁₂ de al menos 0,15 µg por porción, preferiblemente al menos 0,2 µg por porción, preferiblemente al menos 0,3 µg por porción, preferiblemente al menos 0,35 µg por porción, preferiblemente al menos 0,4 µg por porción, preferiblemente al menos 0,5 µg por porción, preferiblemente al menos 0,6 µg por porción, preferiblemente al menos 1,0 µg por porción, en particular al menos 1,5 µg por porción del producto alimenticio, en el que una porción del producto alimenticio presenta una masa de 20 g.

- 30 Cuanto mayor sea el porcentaje en masa de vitamina B₁₂ en el producto alimenticio según la invención, mejor será el abastecimiento que puede conseguirse del cuerpo humano o animal con vitamina B₁₂.

35 El producto alimenticio generado según la invención puede presentar una razón en masa de glucosa con respecto a fructosa en el intervalo de 1,7:1 a 2,3:1, preferiblemente de 1,8:1 a 2,2: 1, preferiblemente de 1,9:1 a 2,1: 1, en particular de aproximadamente 2:1. De este modo se mejora adicionalmente el efecto fisiológico.

40 El producto alimenticio generado según la invención puede presentar un porcentaje en masa de iones sodio de al menos 20 mg por porción, preferiblemente al menos 25 mg por porción, preferiblemente al menos 30 mg por porción, preferiblemente al menos 40 mg por porción, en particular al menos 50 mg por porción del producto alimenticio, en el que una porción del producto alimenticio presenta una masa de 20 g.

45 El producto alimenticio generado según la invención puede presentar en forma concentrada un porcentaje en masa de iones sodio en el intervalo de 50 a 200 mg por porción, preferiblemente de 60 a 150 mg por porción, en particular de 70 a 100 mg por porción, del producto alimenticio, en el que una porción del producto alimenticio presenta una masa de 20 g.

50 Mediante el ajuste del porcentaje en masa de iones sodio prevista según la invención se mejora adicionalmente el efecto fisiológico del producto alimenticio, en particular la prevención de o el alivio o la reducción de espasmos musculares, en particular en el caso de la utilización del producto alimenticio según la invención como alimento deportivo. Por debajo de los porcentajes en masa de iones sodio indicados anteriormente no se ve suficientemente su efecto fisiológico.

55 A este respecto, un porcentaje en masa de iones sodio de menos de 200, preferiblemente menos de 55, en particular menos de 50 mg por porción puede presentar dado el caso un efecto fisiológico insuficiente. Por el contrario, un porcentaje en peso de iones sodio de más de 100, preferiblemente más de 120, en particular más de 135 mg por porción tiene dado el caso un efecto laxante en el consumidor.

60 Al producto alimenticio según la invención o a uno de sus precursores se les pueden añadir β-glucano o aditivos que contienen β-glucano. El producto alimenticio puede presentar β-glucano en un porcentaje en masa de al menos 0,25 g por porción, preferiblemente al menos 0,3 g por porción, en particular al menos 0,4 g por porción del producto alimenticio, en el que una porción del producto alimenticio presenta una masa de 20 g.

65 La adición de β-glucano al producto alimenticio según la invención provoca debido a su propiedad como fibra alimentaria una mejora de los efectos fisiológicos del producto alimenticio según la invención, en particular para la alimentación en el caso de un modo de vida activo desde el punto de vista deportivo.

El producto alimenticio generado según la invención puede contener componentes de cereales, preferiblemente cereal cervecero malteado y/o no malteado, en particular malta de cebada y/o malta de trigo.

En particular en el caso del uso de mezcla macerada o mosto como primer medio nutritivo, el solicitante ha establecido sorprendentemente que las bacterias del ácido láctico utilizadas según la invención generan vitamina B₁₂ en un medio de este tipo y por consiguiente son adecuadas para una generación de vitamina B₁₂. Además se estableció sorprendentemente que la vitamina B₁₂ generada por medio de las bacterias del ácido láctico utilizadas según la invención también está biodisponible en el sentido de esta solicitud al menos en un porcentaje elevado. También en el caso de emplear el procedimiento alternativo definido anteriormente puede conseguirse por tanto una generación activa de vitamina B₁₂ biodisponible, evidentemente sin que tenga lugar un "cambio" del metabolismo de las bacterias del ácido láctico previstas según la invención a la generación de vitamina B₁₂ no biodisponible.

Las características mencionadas en relación con la invención descrita en esta solicitud representan, en el caso de que no se mencione lo contrario o resulte evidente, características facultativas de formas de realización ventajosas, que pueden combinarse de cualquier manera con los objetos descritos en el presente documento y entre sí, siempre que el experto no vea ningún obstáculo evidente en ello. Así, en particular pueden vincularse todas las características de los procedimientos indicadas en esta descripción también con los productos descritos en esta solicitud, y viceversa. En particular, todas las características mencionadas en relación con un producto según la invención pueden transferirse a todos los productos adicionales descritos en esta solicitud y vincularse con los mismos. Lo análogo es aplicable para todos los procedimientos descritos en esta solicitud y sus características. Lo análogo es aplicable para los efectos y las ventajas conseguidos por medio de las características descritas.

Ejemplos de realización

1. Liberación de la levadura de sustancias inhibidoras, en particular de sustancias amargas de lúpulo, mediante lavado

Se suspende una levadura seleccionada o levadura de cosecha de alta fermentación o de baja fermentación con agua cervecera en una razón de 1:9 (50 g de levadura industrial + 400 ml de agua). Se centrifuga la suspensión generada durante 5 min a 1000 G. A continuación se desecha el sobrenadante y se resuspende el sedimento de levadura en 150 ml de agua cervecera. Las dos últimas etapas pueden repetirse de dos a tres veces.

La levadura presenta tras el lavado un olor puro, fresco, afrutado. Falta la nota amarga presente originariamente. En la muestra microscópica las células de levadura aparecen intactas. Únicamente en el caso de la levadura de baja fermentación aparecen células dañadas individualmente. Las células de levadura lavadas presentan además de un núcleo celular redondo y grande un plasma homogéneo. No se observa ninguna rotura de la membrana celular. Tras la tinción vital las células son además incolores (= vivas).

2. Producción de un autolisado de levadura

La operación de la autólisis de levadura se inicia preferiblemente mediante la rotura de las células. Para ello se tratan las levaduras mecánica, térmica o químicamente. La autólisis transcurre entonces durante una incubación de varias horas a varios días de la levadura a de 40 a 55°C y a un valor de pH adecuado, preferiblemente a un valor de pH en el intervalo de 5 a 7.

Una levadura seleccionada o levadura de cosecha de alta fermentación o de baja fermentación se multiplica en mosto extraído. La levadura presenta un porcentaje de sustancia seca de aproximadamente el 16 al 17%. Se recoge cuando está fresca y se lava según el procedimiento descrito anteriormente.

Opcionalmente, las células de levadura pueden tratarse previamente para su rotura mediante una o varias de las siguientes medidas:

- a) disrupción celular en húmedo por medio de un homogeneizador de alta presión;
- b) tratamiento ultrasónico (con y sin esferas de vidrio);
- c) agitación con vórtex (con y sin esferas de vidrio); y
- d) adición de ácido propiónico.

Más adelante se explican detalles de los procedimientos de tratamiento previo individuales.

La verdadera autólisis de las células de levadura tiene lugar entonces mediante la incubación de las células de levadura dado el caso tratadas previamente durante 24 horas a aproximadamente 53°C en la incubadora (amplitud de regulación: de 50 a 55°C) con agitación permanente de la mezcla básica. Como resultado se genera un

autolisado líquido.

3. Producción de un extracto de levadura

- 5 El autolisado líquido producido tal como se describió anteriormente se concentra mediante deshidratación. En caso necesario puede filtrarse y liberarse de sustancias que alteran el sabor.

Los componentes principales del extracto de levadura así obtenido son péptidos y aminoácidos como resultado de la degradación de proteínas así como purinas y pirimidinas, que se producen durante el desdoblamiento enzimático de los ácidos nucleicos.

4. Detalles del tratamiento previo

a) Disrupción celular en húmedo por medio de un homogeneizador de alta presión

15 La disrupción mecánica de las células de levadura se realizó con el homogeneizador de alta presión PANDA Plus 2000 de la empresa GEA Niro Soavi Alemania. La disrupción celular en húmedo por medio de un homogeneizador de alta presión representa el procedimiento de disrupción preferido.

20 Como consecuencia de una dinámica de flujo especial se produce en el homogeneizador usado una presión negativa estática local (de 500 a 1.500 bar, preferiblemente de 800 a 1.200 bar). De este modo se produce una formación de burbujas tanto dentro de la célula de levadura como en la superficie límite entre la pared de célula de levadura y el medio circundante (efecto de cavitación). Si la presión negativa se reduce posteriormente de manera espontánea en una válvula de alivio de presión, entonces esto conduce a una implosión de las burbujitas. Esto conlleva una rotura puntual de las paredes celulares.

Para la preparación de las muestras de levadura se diluye la levadura industrial recién extraída con agua cervecera (1:2, v/v), se descarbonata en el agitador magnético y a continuación se lava tres veces según el procedimiento descrito anteriormente.

30 Cada muestra de levadura pasa por el procedimiento de disrupción descrito dos veces. La observación por microscopía óptica de las células tratadas de esta manera da como resultado que las células ya no contengan protoplastos tras el empleo del homogeneizador y que en el preparado sólo queden las envueltas celulares.

35 La levadura sometida a disrupción de esta manera se incuba a continuación a aproximadamente 53°C durante aproximadamente 24 horas en la incubadora y se somete a autólisis mediante las enzimas todavía intactas. Para detener la autólisis se cuecen las mezclas básicas durante aproximadamente 30 min.

Alternativamente pueden utilizarse los siguientes procedimientos para la disrupción celular:

b) Ultrasonidos (con y sin esferas de vidrio)

Se diluye la muestra de levadura con agua cervecera (10:90, v/v) y a continuación se aplican ultrasonidos durante 10 minutos (baño ultrasónico: MERCK eurolab USR 46 H).

45 Para potenciar las fuerzas mecánicas se le pueden añadir a la muestra de levadura durante el tratamiento ultrasónico pequeñas perlas de vidrio (empresa Prolabo/VWR, diámetro de 2,5 a 3,5 mm).

c) Agitación con vórtex por medio de agitador para tubos de ensayo (con y sin esferas de vidrio)

50 Se diluye la muestra de levadura con agua cervecera (10:90, v/v) y a continuación se sacude o se agita intensamente durante un minuto por medio de agitador para tubos de ensayo ("agitación con vórtex"; agitador Vortex Genie 2: Bender & Hobein AG, etapa 8).

55 Para potenciar las fuerzas mecánicas se le pueden añadir a la muestra de levadura pequeñas perlas de vidrio (empresa Prolabo/VWR, diámetro de 2,5 a 3,5 mm) durante la agitación con vórtex.

d) Adición de ácido propiónico

60 La muestra de levadura se mezcla con ácido propiónico de tal manera que el porcentaje del ácido en la mezcla asciende al 5% en volumen. La mezcla básica se mueve manualmente y luego por medio de un agitador con vórtex. A continuación se agita la mezcla básica durante 15 minutos boca abajo (agitador TURBULA). Se dejan las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente y se vuelven a mover.

5. Producción de levadura secada y flóculos de levadura

Se pulveriza la suspensión de levadura con un porcentaje de sustancia seca de aproximadamente el 15% de manera uniforme sobre un cilindro caliente (secador de cilindro de la empresa VITAM GmbH, Hamelín). Al entrar en contacto con la superficie del cilindro, las células de levadura se rompen. La pared celular y el contenido de las células se secan en el cilindro y como muy tarde tras 3 segundos se raspan como flóculos. 10 l de suspensión de levadura proporcionan aproximadamente 1,5 kg de flóculos. A continuación se trituran los flóculos de levadura en el mortero.

6. Ensayos con productos de levadura disponibles comercialmente

En el caso de cada mezcla básica se añadieron 1 l de un primer mosto diluido, producido a escala industrial (50:50, v/v con agua cervecera), 15 ml de una suspensión bacteriana (*Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* (DSMZ n.º 20007), propagada en caldo MRS (o, en caso de que se indique: un primer mosto) y 4 g de un producto de levadura (en caso de que no se indique lo contrario a continuación) en una botella Schott de 1 l y se homogeneizaron (concentración en masa del producto de levadura: aproximadamente 4 g/l). Al respectivo control se le añadió el primer mosto diluido y la suspensión bacteriana, pero ningún producto de levadura (siempre que no se indique lo contrario). La incubación de las mezclas básicas tuvo lugar durante 24 horas a 37°C en la incubadora. Todas las mezclas básicas se basan en determinaciones dobles y se repitieron varias veces.

Las cantidades de vitamina B₁₂ formada en las mezclas básicas descritas anteriormente (medidas con el método microbiano de r-Biopharm AOAC-Method n.º 101002) se exponen como concentraciones en masa en la siguiente tabla:

Mezcla básica	Producto de levadura comercial	Concentración en masa de vitamina B ₁₂ (µg/100 ml)
0	control (sin producto de levadura)	0,32
1	levadura de cerveza seca (pastillas)	0,81
2	levadura de cerveza seca (flóculos)	0,99
3	levadura de melaza seca (flóculos)	1,28
4	levadura de melaza seca (flóculos)	> 1,80
5	levadura de melaza seca (flóculos)	> 1,80
6	extracto de levadura granulado	2,56

Todos los productos de levadura comerciales inducen una formación potenciada de vitamina B₁₂ con respecto al control, aunque también en diferente medida. Así, la generación de vitamina B₁₂ en presencia de productos de levadura ascendió a aproximadamente de dos a ocho veces la del control.

Como control negativo se comprobaron los productos de levadura como tales: ninguno de los productos de levadura presentaba cantidades detectables de vitamina B₁₂.

7. Ensayos con producto de levadura disponible comercialmente (variación de cantidades)

En una serie de ensayos adicional se estudió la relación entre la cantidad del producto de levadura añadido y el contenido de vitamina B₁₂ generado. Para ello se usó el extracto de levadura de la mezcla básica 6 (extracto de levadura granulado) de la tabla anterior como producto de levadura. El diseño de ensayo restante y el método de determinación de vitamina B₁₂ eran idénticos a la serie de ensayos descrita anteriormente.

Mezcla básica	Cantidad añadida de producto de levadura (g/l)	Concentración en masa de vitamina B ₁₂ (µg/100 ml)	Generación de vitamina B ₁₂ adicional con respecto al control	
			(µg/100 ml)	(%)
0	0 (control)	0,37		
1	0,2	0,45	+ 0,08	+ 22%
2	0,5	0,54	+ 0,17	+ 46%
3	1,0	0,86	+ 0,49	+ 132%
4	2,0	1,19	+ 0,82	+ 222%
5	4,0	1,79	+ 1,42	+ 384%

Como puede deducirse de la tabla anterior, se produce un aumento de la generación de vitamina B₁₂ con respecto al control de más del 20% ya con una cantidad añadida del producto de levadura de 0,2 g/l. La generación de vitamina B₁₂ aumenta de manera lineal con la cantidad añadida creciente al menos en el intervalo estudiado en este caso (coeficiente de determinación R² = 0,9854).

8. Ensayos con flóculos de levadura de levadura de cerveza

En una serie de ensayos adicional se estudió una levadura industrial de fábrica de cerveza de alta fermentación y de baja fermentación. Las levaduras recién recogidas se liberaron en su mayor parte de las sustancias amargas de

lúpulo según el procedimiento descrito anteriormente mediante lavado. La suspensión de levadura resultante, que presentaba un porcentaje de sustancia seca de aproximadamente el 15%, se secó entonces por medio de secado sobre cilindro (tiempo de contacto máximo de las células de levadura con el cilindro: 3 segundos). Los flóculos de levadura secos se pulverizaron por medio de morteros antes de su utilización como producto de levadura. El diseño de ensayo restante y el método de determinación de vitamina B₁₂ eran idénticos a los de la serie de ensayos descrita anteriormente.

Mezcla básica	Producto de levadura a partir de levadura de cerveza (flóculos; 4 g/l)	Concentración en masa de vitamina B ₁₂ (µg/100 ml)	Generación de vitamina B ₁₂ adicional con respecto al control (%)
0	control (sin producto de levadura)	0,29	
1	levadura de alta fermentación	0,39	+ 34%
2	levadura de baja fermentación	0,54	+ 86%
3	mezcla de levadura de alta fermentación y de baja fermentación	0,51	+ 76%

Como puede deducirse de la tabla anterior, el uso de una levadura industrial de fábrica de cerveza también conduce a un aumento considerable de la generación de vitamina B₁₂ mediante las bacterias del ácido láctico. En particular, la presencia de levadura de baja fermentación parece tener un efecto positivo sobre la generación de vitamina B₁₂ mediante las bacterias del ácido láctico.

9. Ensayos con autolisado de levadura de levadura de cerveza

En una serie de ensayos adicional se produjo en cada caso un autolisado de levadura según el procedimiento descrito anteriormente a partir de una levadura industrial de fábrica de cerveza de baja fermentación y una de alta fermentación. Para ello se sometieron a autólisis las células de levadura recién recogidas a 37°C a lo largo de 24 horas en la incubadora. En una parte de las mezclas básicas se realizó la autólisis descrita sin tratamiento previo. En otra parte de las mezclas básicas se rompieron las paredes celulares antes de la realización de la autólisis por medio de la disrupción celular en húmedo descrita anteriormente por medio de un homogeneizador de alta presión. El método de determinación de vitamina B₁₂ era idéntico al de las series de ensayos descritas anteriormente. Los resultados se exponen en la siguiente tabla:

Mezcla básica	Autolisado de levadura de levadura de cerveza	Concentración en masa de vitamina B ₁₂ (µg/100 ml)
0	control (sin autolisado de levadura)	0,152
1	autolisado de levadura de alta fermentación sin rotura celular	0,144
2	autolisado de levadura de baja fermentación sin rotura celular	0,122
3	autolisado de levadura de alta fermentación con rotura celular	0,160
4	autolisado de levadura de baja fermentación con rotura celular	0,178

Como puede deducirse de las tablas anteriores, la concentración en masa de vitamina B₁₂ en el caso de utilizar un autolisado, que procede de una levadura industrial de fábrica de cerveza de alta fermentación o de baja fermentación sin tratar, puede aumentarse ligeramente en todo caso en las mezclas básicas, en las que las células de levadura se rompieron mecánicamente antes de la autólisis. En opinión de los inventores, este resultado puede atribuirse a que el autolisado obtenido a partir de una levadura industrial de fábrica de cerveza contiene sustancias, que impiden el efecto creciente observado hasta la fecha de los productos de levadura sobre la generación de vitamina B₁₂. Por consiguiente, podría ser que determinadas sustancias inhibitoras, probablemente sustancias amargas de lúpulo, estén presentes en el autolisado e inhiban de manera eficaz una inducción de B₁₂. Estas sustancias inhibitoras proceden probablemente del mosto de inicio de la fermentación lupulado, con el que la levadura entra en contacto durante la multiplicación (levadura seleccionada) y/o durante la fermentación.

Un estudio separado de la autólisis mostró que las concentraciones en masa de vitamina B₁₂ de los propios autolizados en las condiciones de las mezclas básicas se encontraban por debajo del límite de determinación (< 0,030 µg/100 ml). Con ello, los propios autolizados de la levadura de cerveza no aportan cantidades destacables de vitamina B₁₂ a las mezclas básicas.

Basándose en estos conocimientos, en una serie de ensayos adicional se lavó una levadura de cerveza de baja fermentación según el procedimiento descrito anteriormente, para liberar esencialmente la levadura de sustancias

amargas de lúpulo. Como en la mezcla básica anterior se sometieron las células de levadura a autólisis a 37°C a lo largo de 24 horas en la incubadora. Las demás condiciones incluyendo el método de determinación de vitamina B₁₂ son idénticas a las de las series de ensayos anteriores. Los resultados se exponen en la tabla a continuación:

Mezcla básica	Autolisado de levadura de levadura de cerveza	Concentración en masa de vitamina B ₁₂ (µg/100 ml)
0	control 1 (sin bacterias del ácido láctico y sin autolisado de levadura)	0,116
1	control 2 (con bacterias del ácido láctico y sin autolisado de levadura)	0,182
2	autolisado de levadura de baja fermentación lavada	0,368

La tabla anterior muestra que mediante un tratamiento del medio nutritivo primer mosto con bacterias del ácido láctico de la subespecie *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* en este diseño de ensayo puede conseguirse una concentración en masa de vitamina B₁₂, que se encuentra aproximadamente un 57% por encima de la del control (sin bacterias del ácido láctico) (véanse las mezclas básicas 0 y 1).

Si la conversión del mismo medio nutritivo tiene lugar además en las mismas condiciones, pero según la invención en presencia de un autolisado de levadura de baja fermentación lavada, entonces la concentración en masa de vitamina B₁₂ puede aproximadamente duplicarse con respecto a la mezcla básica sin autolisado de levadura (+ 102%; véanse las mezclas básicas 1 y 2).

10. Detección de la vitamina B₁₂ biodisponible

En una serie de ensayos adicional se midió por medio del método de detección "ADVIA Centaur" (111659 Rev. N, 2008-09; VB12 2/12) la concentración en masa de vitamina B₁₂ biodisponible unida a IF en una materia agria producida según la invención (fase previa para producto alimenticio) de manera análoga al punto 6 anterior. Los resultados se exponen en la siguiente tabla:

Mezcla básica	Objeto	Concentración en masa de vitamina B ₁₂ (biodisponible) unida a IF (pg/ml)
0	control 1 (agua)	0,000
1	control 2 (primer mosto)	0,084
2	materia agria (primer mosto, convertido con L. c., sin producto de levadura)	0,146
3	materia agria (primer mosto, convertido con L. c. en presencia de extracto de levadura, granulado, 4 g/l)	0,499
L. c. = <i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>Coryniformis</i>		

La tabla anterior muestra que mediante un tratamiento del medio nutritivo primer mosto con *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* ya puede conseguirse una alta concentración en masa de vitamina B₁₂ biodisponible en comparación con el control.

Mediante la presencia de un producto de levadura se aumenta adicionalmente la concentración en masa de vitamina B₁₂ biodisponible en condiciones de ensayo por lo demás idénticas. En un estudio la mezcla básica con extracto de levadura granulado alcanzó aproximadamente 3,5 veces la concentración en masa de la mezcla básica de control comparable sin producto de levadura (ambas convertidas con bacterias del ácido láctico). Con respecto al control sin tratamiento con bacterias del ácido láctico (sólo primer mosto) se consiguió incluso casi 6 veces la concentración en masa de vitamina B₁₂ biodisponible.

Comparación con el estado de la técnica

Convencionalmente, para la acidificación de la mezcla macerada o del mosto se usan las especies *Lactobacillus amylovorus* o *Lactobacillus amylolyticus*, que han demostrado buenos resultados durante mucho tiempo para la generación de materias agrias correspondientes y por consiguiente mezclas maceradas y mostos acidificados.

Así, estas especies de ácido láctico se caracterizan por una dominancia de crecimiento en el mosto de cerveza debido a una capacidad de crecimiento rápida. Además presentan una alta capacidad de acidificación debido a una elevada producción de lactato. Esto puede atribuirse a su carácter metabólico homofermentativo. Estas especies crecen a altas temperaturas (hasta 52°C), de modo que pueden conseguirse altas tasas de multiplicación.

Además, estas especies pueden fermentar dextrina y almidón. Además generan un alto porcentaje de L(+)-lactato. Es de considerable importancia que dichas bacterias del ácido láctico no sean perjudiciales para la cerveza, dado

que son sensibles al lúpulo y no pueden crecer a temperaturas < 30°C. En el mundo científico también se consideran *Lactobacillus amylovorus* y *Lactobacillus amylolyticus* como organismos acidificantes adecuados, porque no forman aminas (histamina) ni otras toxinas. Además, no forman diacetilo ni otras sustancias desventajosas para el sabor y aroma de los productos resultantes. Finalmente, se caracterizan por una fácil capacidad de manipulación en el uso práctico.

En cambio, la especie *Lactobacillus coryniformis* prevista según la invención se considera en el mundo científico como perjudicial para la cerveza. Esta especie crece en cerveza ligeramente lupulada y genera diacetilo, que conduce a un perfil de sabor desventajoso en el producto alimenticio o bebida resultante, en particular en la cerveza. Además, *Lactobacillus coryniformis* puede crecer en las temperaturas de fermentación típicas para cerveza, en particular para cerveza de alta fermentación, concretamente en el intervalo de temperatura de 15 a 48°C. Además, *Lactobacillus coryniformis* presenta la desventaja con respecto a las especies convencionales *Lactobacillus amylovorus* y *Lactobacillus amylolyticus*, que esta especie es facultativamente heterofermentativa, es decir, su capacidad de acidificación está reducida con respecto a las especies usadas convencionalmente. Por consiguiente tiene que utilizarse aproximadamente el doble de cantidad de materia agria en comparación con las especies convencionales. De este modo se requieren instalaciones de producción más grandes y aumentan los costes asociados a la acidificación.

La pluralidad de desventajas mencionadas anteriormente así como las desventajas conocidas además por el experto de las especies consideradas en este caso *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus backii*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* han significado hasta la fecha un obstáculo esencial para la utilización de estas especies o subespecies correspondientes en la industria de la producción de bebidas y productos alimenticios, en particular en fábricas de cerveza y malterías.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de un producto alimenticio o de un precursor del mismo, al menos con las etapas de:
 - (a) proporcionar una mezcla macerada o un mosto o una última agua de lavado como primer medio nutritivo; y
 - (b) tratar el primer medio nutritivo con bacterias del ácido láctico de la especie *Lactobacillus coryniformis*, de la especie *Lactobacillus backii* (DSMZ n.º 18080), de la especie *Lactobacillus plantarum* o de la especie *Lactobacillus fermentum* (DSMZ n.º 20052) o con una mezcla de bacterias del ácido láctico de al menos dos de estas especies;
 en el que el tratamiento según la etapa (b) tiene lugar en presencia de un producto de levadura;
 en el que el producto de levadura contiene un extracto, un autolisado y/o una forma secada de una levadura; y
 en el que el producto de levadura preferiblemente está presente en una concentración en masa en el intervalo de $\geq 0,2$ y ≤ 20 g/l con respecto al primer medio nutritivo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el primer medio nutritivo está libre o esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo; y/o
 en el que el producto de levadura está libre o esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo; en el que "libre de sustancias amargas de lúpulo" con respecto al primer medio nutritivo significa la ausencia total de sustancias amargas de lúpulo en el primer medio nutritivo; en el que "libre de sustancias amargas de lúpulo" con respecto al producto de levadura significa la ausencia total de sustancias amargas de lúpulo en el producto de levadura;
 en el que "esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo" con respecto al primer medio nutritivo significa un contenido de sustancias amargas de lúpulo en el primer medio nutritivo de como máximo el 15% con respecto al contenido de sustancias amargas de lúpulo que presenta un mosto de inicio de la fermentación habitual en la fabricación de cerveza para una fermentación con una levadura de baja fermentación o de alta fermentación con unidades de amargor (método EBC) en el intervalo de 15 a 38; y en el que "esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo" con respecto al producto de levadura significa un contenido de sustancias amargas de lúpulo en el producto de levadura de como máximo el 20% con respecto al contenido de sustancias amargas de lúpulo, que una levadura industrial de baja fermentación o de alta fermentación presenta en una fábrica de cerveza, que se recogió durante una fermentación de un mosto habitual en la fabricación de cerveza con unidades de amargor (método EBC) en el intervalo de 15 a 38.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el producto de levadura se obtiene a partir de una levadura de alta fermentación o de baja fermentación del género *Saccharomyces*, en particular de la especie *Saccharomyces cerevisiae* o de la especie *Saccharomyces carlsbergensis*;
 en el que la levadura es preferiblemente una levadura seleccionada o una levadura de cosecha del procedimiento de elaboración de cerveza;
 en el que las sustancias amargas de lúpulo se eliminan totalmente o de manera esencialmente total de la levadura o del producto de levadura, preferiblemente mediante un lavado individual o múltiple de la levadura o del producto de levadura con agua, en particular con agua potable o agua cervecera.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el procedimiento presenta además las etapas de:
 (e) proporcionar una mezcla macerada o un mosto como segundo medio nutritivo; y
 (f) mezclar el medio obtenido en la etapa (b) con el segundo medio nutritivo.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el procedimiento presenta además las etapas de:
 (i) clarificar preferiblemente el medio obtenido en la etapa (b) o (f),
 (k) cocer o mantener caliente y preferiblemente añadir lúpulo al medio obtenido en la etapa (f) o (i);

- (l) eliminar al menos parcialmente el turbio caliente del medio obtenido en la etapa (k); y
- 5 (m) preferiblemente ajustar la temperatura del medio obtenido en la etapa (l) a una temperatura de inicio de la fermentación.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el procedimiento presenta además la etapa de:
- 10 (p) procesar el medio obtenido en una de las etapas (b), (f), (k), (l) o (m) para dar una bebida, preferiblemente tratar este medio con una levadura del género *Saccharomyces*.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el procedimiento presenta además la etapa de:
- 15 (q) procesar el medio obtenido en una de las etapas (b), (f), (k), (l) o (m) o la bebida obtenida en la etapa (p) para dar un producto alimenticio no fluido;
- 20 en el que el medio obtenido en una de las etapas (b), (f), (k), (l) o (m) o la bebida obtenida en la etapa (p) se mezcla con un precursor del producto alimenticio no fluido.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el procedimiento presenta además la etapa de:
- 25 (t) ajustar el porcentaje en masa de agua en el medio, que se obtuvo en una de las etapas (b), (f), (k), (l) o (m), la bebida obtenida en la etapa (p) o el producto alimenticio no fluido obtenido en la etapa (q) a menos del 35%, preferiblemente menos del 30%, preferiblemente menos del 25%, preferiblemente a menos del 20%, en particular a menos del 15%; y preferiblemente a más del 0%, en particular más del 5%.
- 30 9. Producto alimenticio o precursor del mismo, producido con un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Uso de un producto de levadura en un procedimiento para la producción de un producto alimenticio o de un precursor del mismo, preferiblemente en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el procedimiento presenta al menos las etapas de:
- 35 (a) proporcionar una mezcla macerada o un mosto o una última agua de lavado como primer medio nutritivo; y
- 40 (b) tratar el primer medio nutritivo con bacterias del ácido láctico de la especie *Lactobacillus coryniformis*, de la especie *Lactobacillus backii* (DSMZ n.º 18080), de la especie *Lactobacillus plantarum* o de la especie *Lactobacillus fermentum* (DSMZ n.º 20052) o con una mezcla de bacterias del ácido láctico de al menos dos de estas especies;
- 45 en el que el tratamiento de la etapa (b) tiene lugar en presencia del producto de levadura; y
- en el que el producto de levadura contiene un extracto, un autolisado y/o una forma secada de una levadura.
- 50 11. Uso de un procedimiento para la producción de un producto alimenticio o de un precursor del mismo según una de las reivindicaciones 1 a 8 para aumentar la biodisponibilidad y/o la cantidad generada y/o la concentración en masa de vitamina B₁₂ en el producto alimenticio o en el precursor del mismo;
- 55 en el que "vitamina B₁₂" se limita a una especie, seleccionada de un grupo compuesto por: metilcobalamina, desoxiadenosilcobalamina, hidroxicobalamina y sulfocobalamina.
12. Uso según la reivindicación 10 u 11, caracterizado porque el producto de levadura está presente en una concentración en masa en el intervalo de $\geq 0,2$ y ≤ 20 g/l con respecto al primer medio nutritivo.
- 60 13. Uso según una de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado porque el primer medio nutritivo está libre o esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo; y/o
- 65 el producto de levadura está libre o esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo; en el que "libre de sustancias amargas de lúpulo" con respecto al primer medio nutritivo significa la ausencia total de sustancias amargas de lúpulo en el primer medio nutritivo; en el que "libre de sustancias amargas de lúpulo" con respecto al producto de levadura significa la ausencia total de sustancias amargas de lúpulo en el

producto de levadura;

- 5 en el que “esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo” con respecto al primer medio nutritivo significa un contenido de sustancias amargas de lúpulo en el primer medio nutritivo de como máximo el 15% con respecto al contenido de sustancias amargas de lúpulo, que presenta un mosto de inicio de la fermentación habitual en la fabricación de cerveza para una fermentación con una levadura de baja fermentación o de alta fermentación con unidades de amargor (método EBC) en el intervalo de 15 a 38; y
- 10 en el que “esencialmente libre de sustancias amargas de lúpulo” con respecto al producto de levadura significa un contenido de sustancias amargas de lúpulo en el producto de levadura de como máximo el 20% con respecto al contenido de sustancias amargas de lúpulo, que una levadura industrial de baja fermentación o de alta fermentación presenta en una fábrica de cerveza, que se recogió durante una fermentación de un mosto habitual en la fabricación de cerveza con unidades de amargor (método EBC) en el intervalo de 15 a 38.