

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 398**

51 Int. Cl.:  
**C12P 17/18** (2006.01)  
**A23L 1/302** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08857768 .9**  
96 Fecha de presentación: **05.12.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2227552**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2010**

54 Título: **NIVELES AUMENTADOS DE PRODUCCIÓN DE FOLATO POR FERMENTACIÓN DE ZUMO DE MELÓN CON LACTOBACILLUS.**

30 Prioridad:  
**06.12.2007 EP 07122444**  
**06.12.2007 US 992829 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.03.2012**

73 Titular/es:  
**Purac Biochem B.V.**  
**Arkelsedijk 46,**  
**4206 AC Gorinchem , NL**

72 Inventor/es:  
**WEGKAMP, Hendrikus;**  
**DE SANTOS, Filipe Branco;**  
**SMID, Eilt Johannes y**  
**HUGENHOLTZ, Jeroen**

74 Agente/Representante:  
**Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 376 398 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Niveles aumentados de producción de folato por fermentación de zumo de melón con *Lactobacillus*

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la microbiología y de la producción de un alimento, suplemento para alimentos o piensos usando la fermentación microbiana del zumo de melón. Se proporcionan métodos de producción de niveles altos de folato por fermentación del zumo de melón, al igual que alimentos, suplementos para alimentos y piensos que comprenden o que consisten en zumo de melón fermentado y/o folato (vitamina B9/B11) obtenidos a partir de tales métodos de fermentación. También, se describe en la presente el uso de zumo de melón (o partes del mismo y/o diluciones y/o concentraciones del mismo) como un medio de fermentación o suplemento de fermentación de bacterias productoras de folato. Otra forma de realización es el uso de ácido de p-aminobenzoico o paminobenzoato (p-ABA) (en combinación con zumo de melón) para aumentar la producción de folato durante la fermentación microbiana.

## 15 DEFINICIONES GENERALES

[0002] "Bacterias del ácido láctico" (LAB) se refiere a bacterias, que producen ácido láctico u otro ácido orgánico (tal como ácido propiónico) como un producto final de fermentación, tal como, pero no limitado a, bacterias del género *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium*.

[0003] "Calidad alimenticia" son componentes que pueden ser ingeridos de forma segura (p. ej. oralmente) por seres humanos o animales.

[0004] "Probióticos" o "cepa(s) probiótica(s)" se refiere a cepas de bacterias, que tienen un efecto provechoso en el huésped cuando es ingerido por un sujeto y que son generalmente considerados como seguros (GRAS) para seres humanos.

[0005] "Calidad alimenticia" se refiere a que se considera como seguro para el consumo humano y/o animal, por ejemplo por las autoridades reguladoras pertinentes tales como la Agencia Americana de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés).

[0006] "Bacterias del ácido láctico probióticas" son, por lo tanto, aquellas cepas de LAB que también tienen propiedades probióticas, es decir que son cepas probióticas.

[0007] "Cepas bacterianas no modificadas genéticamente" se refiere a cepas que no han sido modificadas genéticamente por intervención humana, es decir que no comprenden secuencias de ácidos nucleicos homólogas o heterólogas introducidas en las células o genoma. Por ejemplo, que no se han introducido genes quiméricos (comprendiendo secuencias de ácidos nucleicos enlazadas operativamente, tales como un promotor, secuencia codificante y terminador) o vectores en las bacterias.

[0008] "Cepas bacterianas modificadas genéticamente" o "cepas recombinantes" son aquí cepas que han sido modificadas genéticamente por intervención humana, por ejemplo por introducción de genes homólogos o heterólogos en el genoma, tal como un gen quimérico.

[0009] "Cepas bacterianas no mutantes" se refiere aquí a cepas de tipo salvaje, es decir cepas que no han sido tratadas por agentes mutagénicos por seres humanos. Cepas de "tipo salvaje" son cepas que se encuentran en, o aisladas originalmente de, la naturaleza y que son genéticamente esencialmente las mismas que la cepa salvaje.

[0010] "Extracto de melón" se refiere aquí al extracto de fruta de melón de plantas de la especie *Cucumis melo*, por ejemplo (*C. melo* var. *reticulans*, melón de Galia), melón Musk, Cantalupo, melón de Hami, melón Honeydew (*Cucumis melo* var. *inodorus*), melón Piel de Sapo, y melón dulce, *Cucumis melo* subesp. *agrestis*; *Cucumis melo* subesp. *melo*; *Cucumis melo* var. *cantalupensis*; *Cucumis melo* var. *conomon*, y otros.

[0011] "Zumo de melón" se refiere a la fase no sólida (fase líquida) obtenida después de liquidificación del extracto de melón.

[0012] "Folato" y "ácido fólico" [ácido N-[4-[[2-amino-1,4-dihidro-4-oxo-6-pteridinil]metil] amino } benzoil] - L-glutámico] son usados aquí de forma intercambiable para referirse al ácido fólico y derivados del ácido fólico, que por ejemplo difieren en el estado de oxidación, sustituciones de mono-carbono o número de residuos de glutamato. Nombres alternativos son vitamina B9, vitamina B10, vitamina B11, vitamina B9/B11 o vitamina M. Ejemplos de derivados son tetrahydrofolato, 5-formiltetrahydrofolato, 5,10-metilentetrahydrofolato, 10-formiltetrahydrofolato, 5-metiltetrahydrofolato, 5,10-meteniltetrahydrofolato, etc. Están comprendidos aquí por ejemplo poliglutamilfolato y/o productos de hidrólisis más corta tales como di-, tri- y/o monoglutamilfolato.

[0013] "p-ABA" se refiere a ácido para-aminobenzoico o para-aminobenzoato o ácido 4-aminobenzoico y es un bloque de construcción de folato en la vía biosintética de folato. GTP, p-ABA y glutamato forman los precursores de folato.

5 [0014] "Fermentación" o "cultivo por fermentación" se refiere a cultivos de crecimiento usados para el crecimiento de bacterias que convierten los carbohidratos en alcohol y/o ácidos, normalmente (pero no necesariamente) bajo condiciones anaeróbicas.

10 [0015] "Medio de fermentación" se refiere al medio de crecimiento que se usa para crear el cultivo de fermentación, mientras "caldo de fermentación" es generalmente usado para referirse al medio fermentado (es decir, durante y/o después de la fermentación). No obstante, ambos términos se pueden utilizar de forma intercambiable aquí y el significado estará claro en el contexto.

15 [0016] "Alimento" o "producto alimenticio" se refiere a productos alimenticios líquidos, semisólidos y/o sólidos (composiciones nutritivas), adecuados para el consumo humano y/o animal.

[0017] "Suplemento alimenticio" se refiere a una composición ingerida por seres humanos además de la ingesta diaria de alimentos normal. Generalmente, los suplementos alimenticios están en la forma de comprimidos, polvos, sobres, píldoras, etc.

20 [0018] "Ingrediente de producto alimenticio" o "ingrediente de suplemento alimenticio" se refiere a un producto que es conveniente para ser añadido a un producto alimenticio final, o suplemento alimenticio, o durante el proceso de producción de un producto alimenticio, o suplemento alimenticio.

25 [0019] El término "comprendiendo" debe ser interpretado como que especifica la presencia de las partes, fases o componentes establecidos, pero no excluye la presencia de una o más partes, fases o componentes adicionales.

30 [0020] Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de un elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que allí haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" por lo tanto significa "al menos uno".

[0021] "Fase de crecimiento" se refiere a las fases de crecimiento comúnmente conocidas de microorganismos, por ejemplo en los cultivos de fermentación por lotes, tales como la fase lag, fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria posterior, seguido de la fase de muerte.

35 [0022] "Porcentajes (%) de identidad de secuencias" se refiere a los porcentajes de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias y pueden ser determinados usando por ejemplo herramientas de alineamiento locales de parejas tales como el programa "water" de EmbossWIN (versión 2.10.0) usando parámetros por defecto, (penalización por apertura de espacio 10.0 y penalización por extensión de espacio 0.5, usando Blosum62 para proteínas y matrices DNASFULL para ácidos nucleicos) o "Bestfit" del GCG Wisconsin Package, disponible de Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 EEUU, usando los parámetros por defecto. Alternativamente, se puede usar también el análisis BLAST usando los ajustes por defecto, tales como Blast de proteínas de NCIMB (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>), con una penalización por creación de espacio de 11 y penalización por extensión de espacio de 1.

45 Antecedentes de la invención

[0023] El folato es esencial para la dieta humana y animal y su deficiencia puede resultar en un intervalo de enfermedades y trastornos, tales como defectos del tubo neural en recién nacidos. Muchas plantas, hongos y bacterias sintetizan el folato, incluso las bacterias lácticas (LAB), por lo cual las concentraciones de folato en productos lácteos fermentados son superiores que en el producto lácteo no fermentado. La secuencia de genoma anotada de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* IL1403 muestra los genes del clúster biosintético del folato. Los genes de folato de otros clústers de genes también han sido identificados, tales como aquellos de *Lactococcus lactis* MG1363, y se utilizan para crear genéticamente bacterias con una producción de folato aumentada, por ejemplo a través de la sobreexpresión del gen *folKE* (Sybesma et al., 2003, Applied and Environm. Microb. Vol. 69(6), pp3069-3076). La sobreexpresión controlada de *folKE* resultó en un aumento de tres veces la producción de folato total y un aumento de 10 veces la producción de folato extracelular.

60 [0024] No todas las LAB son capaces de producir folato. Por ejemplo, Sybesma et al. (2003, Applied and Environm. Microbiology Vol. 69(8) pp4542-4548) encontraron que mientras que las especies de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* y *Leuconostoc* fueron capaces de producir folato, muchas especies de *Lactobacillus* evaluadas no lo fueron, con la excepción de *L. plantarum*. Los niveles totales de folato (extracelular e intracelular) desconjugados variaron mucho y los niveles máximos fueron 291 µg/L para la cepa de *L. lactis* ssp. *lactis* NZ9010 (crecida aeróbicamente en el medio de cultivo M17; la cepa es carente de la lactato deshidrogenasa), mientras que *L. plantarum* WCFS I por ejemplo sólo produjo 45 µg/L en el medio MRS. También varió la proporción excretada en el medio.

65 [0025] Sybesma et al. (supra) también estudiaron los efectos de condiciones de cultivo tales como pH, p-ABA y hemina

5 en la producción y distribución de folato en dos LAB comúnmente usadas, *L. lactis* MG 1363 y *S. thermophilus* NIZO cepa B 119. Medios de cultivo incluían medio M 17, medio definido químicamente (CDM) y medio MRS. En el cultivo continuo un aumento en el pH de 5.5 a 7.5 resultó en una producción de folato aumentada en estas dos cepas por un factor 2-3, alcanzando 534 µg/L para *S. thermophilus* crecida en medio M17 y 107 µg/L para *L. lactis* crecida en CDM. Para *L. lactis*, la adición de p-ABA en concentraciones que varían de 1-100µM también aumentó la producción de folato, mientras que las cantidades de p-ABA por encima de 100µM no tuvieron ningún efecto. De manera interesante, la adición de sustancias inhibitoras del crecimiento también resultó en un aumento de folato.

10 [0026] Como se ha mencionado anteriormente, las especies de *Lactobacillus* no producen ningún nivel o niveles muy bajos de folato. Las especies de *Lactobacillus* son importantes en la producción de productos fermentados y un aumento en la producción de folato por aquellas especies sería altamente deseable. Las especies de *Lactobacillus* son por ejemplo usadas industrialmente para la producción de yogur, queso, chucrut, conservas en salmuera, y otros alimentos fermentados, al igual que piensos para animales, tal como el ensilado. Además, el uso de medios de fermentación natural (calidad alimenticia), mejor que, sintéticos tiene la ventaja de que los medios naturales se pueden usar como tales para la producción de alimentos, piensos o suplementos alimenticios, eliminando la necesidad de la purificación del folato del cultivo. Estos objetivos se cumplen en la presente invención.

20 [0027] WO02/097063 describe la producción de ácido fólico biodisponible por microorganismos recombinantes (bacterias genéticamente modificadas). Las bacterias recombinantes se hacen crecer en medios sintéticos.

[0028] WO2006/013588 describe cepas de bifidobacterias probióticas que producen ácido fólico y su uso. Éstas se pueden utilizar en formulaciones junto con otras LAB probióticas.

25 [0029] WO2006/093408 se refiere a bacterias mutantes que son resistentes al metotrexato y sobreproducen folato. Las bacterias son identificadas usando metotrexato como agente de selección. No hay indicación de que los medios de fermentación naturales puedan aumentar la producción de folato.

30 [0030] JP 1063352 divulga triturar finamente frutas y verduras tales como sandías, hidrolizando y sometiendo el producto a fermentación láctica.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Métodos de producción de folato según la invención

35 [0031] La presente invención proporciona métodos para niveles de folato en aumento producidos por especies de *Lactobacillus* productoras de folato. Los inventores descubrieron que los niveles de folato totales, y/o proporción de folato: vitamina B12, producidos durante la fermentación de especies de *Lactobacillus* son significativamente aumentados cuando los extractos de melón y/o zumo de melón o partes de los mismos o son usados o añadidos al medio de fermentación. Además, alimentos tales como alimentos con fruta o alimentos derivados de fruta son comúnmente conservados por fermentación, de modo que un método para conservación alimenticia (es decir, para reducir alimentos perecederos) es descrito aquí, por el cual el producto resultante tiene como beneficio adicional un nivel de folato aumentado y/o una proporción aumentada de folato a vitamina B12.

45 [0032] Así en una forma de realización según la invención está provisto un método para producir folato y para niveles de folato totales en aumento producidos por una especie de *Lactobacillus* productora de folato comprendiendo las fases siguientes:

- 50 (a) proporcionar un extracto de una fruta de melón de una especie de *Cucumis melo*;  
 (b) usar todo o parte del extracto de fruta de melón para preparar un medio de fermentación;  
 (c) inocular dicho medio de fermentación con una o más cepas de *Lactobacillus*;  
 (d) permitir que la fermentación ocurra; y opcionalmente  
 (e) usar todo o parte del medio fermentado para la preparación de un alimento, pienso o suplemento alimenticio con niveles de folato altos y/o una alta proporción de folato: vitamina B 12.

55 [0033] En la fase (a) la fruta de la especie *Cucumis melo* se puede utilizar para preparar un extracto. En una forma de realización preferida la fruta usada comprende o consiste en melón de Galia. Un extracto se obtiene a partir de parte o toda una o varias frutas. Mezclas de fruta (o partes de fruta) de distintas especies, subespecies o variedades de *Cucumis melo* pueden ser utilizadas. Preferiblemente no obstante ninguna fruta de otras especies de fruta se usa para preparar el extracto y/o el medio de fermentación. La fruta y/o piezas de fruta usadas pueden ser de cualquier fase de maduración/de desarrollo de la fruta, por ejemplo de fruta madura o de fases anteriores de maduración/de desarrollo de la fruta y/o mezclas de éstas. Opcionalmente las semillas de la fruta se pueden quitar de la fruta de modo que el extracto esté libre de semillas.

65 [0034] El extracto es preferiblemente un extracto líquido, es decir el zumo de frutas. El zumo de frutas puede ser fácilmente preparado por liquidificación de tejidos de fruta usando métodos conocidos, (aplastado, corte, maceración, mezcla, calentamiento, etc.) y opcionalmente eliminando todos o parte de los componentes sólidos de la fruta por ejemplo por filtración o centrifugado u otros métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente al menos 70%, 80%, 90%

o incluso más preferiblemente 99% o 100% de los componentes sólidos vegetales son eliminados. El extracto es preferiblemente (pero no necesariamente) también esterilizado, por ejemplo por filtración o calentamiento, para eliminar o matar microorganismos (tales como bacterias u hongos no deseados) presentes.

5 [0035] En la fase (b) todo o parte del extracto de fruta de melón se utiliza para preparar un medio de fermentación. En otras palabras, el medio de fermentación preferiblemente comprende o consiste en extracto de fruta de melón. De la forma más preferible, el medio de fermentación final comprende al menos 50% (vol/vol), más preferiblemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% o más (p. ej. 95% o 99% o 100%) de extracto de fruta de melón, por ejemplo zumo de melón, obtenido directamente de la fruta de melón. El extracto de fruta de melón puede ser diluido usando por ejemplo uno o  
10 más tampones de calidad alimenticia, tal como tampón de fosfato, y opcionalmente el pH se ajusta a un pH específico, tal como aproximadamente pH 5.0, pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0, pH 7.5 o cualquier pH entremedias de estos valores. El medio de fermentación en una forma de realización no contiene extractos de fruta (p. ej. zumos) de especies vegetales distintas de aquellas derivadas de *Cucumis melo*.

15 [0036] En la fase (b) también diferentes extractos de fruta de melón se pueden mezclar en la preparación del medio de fermentación. Así, por ejemplo zumo de melón de una especie de *Cucumis melo* se pueden mezclar con zumo de melón de otras especies de *Cucumis melo*. Tales mezclas tienen el mismo efecto que la coextracción de distintas especies de *Cucumis melo*. En una forma de realización preferida el medio de fermentación comprende o consiste en extracto del melón de Galia.

20 [0037] El extracto de melón, tal como el zumo de melón, no necesita ser recién preparado para hacer el medio de fermentación, sino que puede también ser extraído y luego congelado, bien como una extracción o como un concentrado o como una dilución (p. ej. en agua estéril o tampón) para un uso posterior. Asimismo el extracto de melón liofilizado y/o zumo de melón puede ser utilizado, por ejemplo como tal o después de la reconstitución con agua o  
25 tampón o similar.

[0038] Todos los componentes usados en la preparación del medio de fermentación son preferiblemente de calidad alimenticia. Aparte del(los) extracto(s) de la fruta de melón, el medio de fermentación puede también comprender agentes tampón, agentes de dilución (agua, tampón), aminoácidos adicionales (p. ej. unidades estructurales de folato, tales como la metionina, serina, glicina, timina, inosina, xantina, adenina y/o guanina), azúcares, aromatizantes, agentes colorantes, nucleobases, nucleósidos, fuentes de carbono adicionales, etc. El uso de aditivos dependen también del uso posterior del medio fermentado (o partes del mismo) y si el medio fermentado debe ser usado como un aditivo para hacer un alimento o pienso reforzado con folato o si se usa como tal, por ejemplo en forma de cápsula o de polvo (como un alimento o suplemento de pienso) o si el folato producido debe ser purificado del medio fermentado o usado junto con todo o parte del medio.  
35

[0039] En una forma de realización según la invención se añade p-ABA al medio de fermentación en una cantidad que aumenta el rendimiento de folato en comparación con la fermentación en ausencia de p-ABA adicional. Preferiblemente al menos 5mg de p-ABA se agregan por litro de medio de fermentación y/o por litro de zumo de melón y/o extracto de melón, más preferiblemente al menos 10mg, 20mg, 30mg, 40mg, 50mg, 60mg, 70mg, 80mg, 90mg o 100mg por litro. También más p-ABA puede ser añadido, tal como al menos aproximadamente 150mg, 200mg, 500mg, 1000mg por medio de fermentación de litro, o más. p-ABA se puede obtener comercialmente en diferentes grados de pureza de Sigma Aldrich Inc. (St. Louis, MO, EEUU, ver por ejemplo número de fabricación A9878). Aunque no todas las cepas de *Lactobacillus* responden a p-ABA mediante la producción de más folato, el experto en la materia puede fácilmente determinar si la adición de p-ABA tiene un efecto de aumento de folato para una cepa dada. Las cepas de *Lactobacillus plantarum*, por ejemplo la cepa WCFS1, responden positivamente a la adición de p-ABA.  
45

[0040] Otra forma de realización consiste en que la misma cepa bacteriana productora de folato produzca p-ABA, por ejemplo naturalmente o después de la modificación genética (véase por ejemplo Wegkamp et al. 2007, Applied and Environmental Microbiology Vol. 73; p2673-2681), y/o que una o más cepas adicionales productoras de p-ABA (naturalmente o después de la modificación) se agreguen al medio. El clúster de genes de p-ABA de otras bacterias, tal como el clúster de genes biosintéticos de p-ABA de *Lactococcus lactis*, puede así ser introducido y sobreexpresado en la cepa productora de folato y/o en otra cepa, que puede luego ser coinoculado en la fase (c).  
50

[0041] En la fase (c) una cantidad adecuada de una o más cepas de *Lactobacillus* se usa como inóculos del medio de fermentación. Las cantidades de inóculo pueden variar, pero en general un cultivo que tiene una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^{10}$  células / ml (p. ej. aproximadamente  $1 \times 10^8$ /ml) de células bacterianas vivas o viables se puede adicionar al medio de fermentación a aproximadamente un volumen del 1% del volumen final del medio de fermentación, o más, o menos (p. ej. volumen del 0.8%, 0.5%).  
55

[0042] En principio cualquier cepa de *Lactobacillus* que es capaz de producir folato totalmente (es decir, que comprende los genes biosintéticos de folato) puede ser usada, incluyendo cepas de tipo natural/salvaje, cepas recombinantes (modificadas genéticamente) y cepas mutantes. Las cepas recombinantes pueden también ser cepas que han sido transformadas con uno o más genes biosintéticos de folato, así como también los niveles de producción de folato de estas cepas se pueden aumentar adicionalmente cuando se usan los métodos según la invención. Por ejemplo, el clúster de genes biosintéticos de folato puede ser clonado y/o introducido de una cepa en otra cepa. El vector pNZ7026  
60  
65

lleva el clúster de genes de folato de *L. plantarum* WCFS I (véanse los ejemplos) y este clúster de genes puede, así, ser introducido en otras cepas de *Lactobacillus* por ejemplo por electroporación o conjugación o los genes (*folB*, *folK*, *folE*, *folC2*, *xtp2*, *folP*) pueden utilizarse para identificar y aislar genes homólogos de otras especies o cepas de *Lactobacillus*.

5 [0043] Se puede fácilmente evaluar si una cepa es capaz de producir folato totalmente, por ejemplo cultivando la cepa en un medio apropiado y analizando y/o cuantificando si se produce folato intracelularmente y/o extracelularmente usando por ejemplo HPLC, LC-MS, ensayo microbiológico y similares. La inoculación del medio de fermentación se hace usando los métodos microbiológicos estándares, tales como por ejemplo preparando cultivos iniciadores frescos de la(s) cepa(s) y/o usando inóculo preparado previamente tal como soluciones madre bacterianas congeladas que  
10 tienen una cantidad definida de células bacterianas. Las cepas que contienen el clúster de genes biosintéticos de folato u ortólogos de los mismos (p. ej. secuencias que comprenden al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, o más identidad de secuencias al nivel de los ácidos nucleicos y/o aminoácidos a los genes biosintéticos de folato y/o proteínas), por ejemplo a los de *L. plantarum* WCFS1, son propensas a ser capaces de producir folato. Así, el análisis genético y/o bioinformático puede también ser usado para identificar las cepas apropiadas.

15 [0044] En una forma de realización preferida se usan cepas de tipo natural/salvaje (no modificadas genéticamente y no mutantes), es decir cepas conforme son aisladas de fuentes naturales o derivados no modificados de las mismas. Tales cepas están disponibles en las instituciones depositarias de cepas o se pueden aislar de fuentes naturales. La(s) cepa(s) usada(s) son preferiblemente todas de calidad alimenticia, es decir, deberían tener (o deberían ser capaces de obtener) el estado GRAS. También, las cepas son cepas preferiblemente probióticas. Ejemplos de cepas incluyen cepas de *Lactobacillus* de las siguientes especies: *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. crispatus*, *L. sakei*, *L. jensenii*, *L. sanfransiscensis*, *L. fructivorans*, *L. kefir*, *L. curvatus*, *L. paraplantarum*, *L. kefirgranum*, *L. parakefir*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. xylosus*, *L. salivarius*, *L. murinus*, *L. minutis*, *L. gallinarium*, *L. amylovorus*, etc.

25 [0045] Cepas útiles son por ejemplo (pero no limitado aquí) las siguientes cepas: *L. plantarum* WCFS1, *L. reuteri* 100-23, *L. reuteri* JCM 1112, *L. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* ATCCBAA 365, *L. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* ATCC 11842, y *L. sakei* subesp. *sakei* 23 K (especie conocida por poseer el clúster de genes de folato, según la Base de datos de bioinformática de ERGO™, véase Overbeek et al., Nucleic Acids Res. 2003 Jan 1 vol 31(1):164-71).

30 [0046] Así, en una forma de realización una o varias (preferiblemente) cepas y/o especies de LAB (del género *Lactobacillus*) probióticas y/o de calidad alimenticia son usadas en el método.

35 [0047] Para algunas aplicaciones, tal como para la preparación de alimentos o suplementos alimenticios para por ejemplo vegetarianos, es también deseado que la cepa no sólo produzca folato durante la fermentación sino también vitamina B12. Así en una forma de realización la cepa de *Lactobacillus* usada es capaz de producir tanto folato como vitamina B12. Preferiblemente la(s) cepa(s) es/son cepa(s) probiótica(s). Un ejemplo de una especie de *Lactobacillus* que es capaz de ello es la *Lactobacillus reuteri*, por ejemplo *L. reuteri* JCM 1112, pero más especies y/o cepas pueden ser encontradas, por ejemplo en los géneros de *Clostridium*, *Geobacillus*, *Listeria*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Salmonella*, entre otros. Dietas vegetarianas estrictas son frecuentemente bajas en la vitamina B12, mientras que son relativamente ricas en folato. Esto conduce al riesgo de que la deficiencia de la vitamina B12 se enmascara por folato, por lo cual existe una necesidad de productos que comprenden tanto folato como vitamina B12.

45 [0048] Los ejemplos muestran que la producción de folato por la cepa WCFS1 de *L. plantarum* (originalmente obtenida de saliva humana; número de acceso de NCIMB 8826, Colección Nacional de Bacterias Marinas e Industriales, Aberdeen, U.K) fue aumentada 2-3 veces en el medio de zumo de melón (aproximadamente 58 µg/L medio) en comparación con el medio sintético (CDM) (29 µg/L de medio). La producción de folato de la cepa *L. reuteri* JCM112 (originalmente obtenida del intestino humano; número de acceso de NCIMB 11951, Colección Nacional de Bacterias Marinas e Industriales, Aberdeen, U.K) aumentó casi 10 veces, de 8-35µg/L en CDM a 310 µg/L en el medio de zumo de melón. El uso de estas dos cepas para la producción de folato y opcionalmente también la producción de vitamina B12 concomitante (por ejemplo por *L. reuteri*) según la invención es también una forma de realización aquí. Estas dos cepas pueden también ser usadas como controles en el método descrito.

50 [0049] Cuando se usa al menos una cepa capaz de producir tanto folato como vitamina B12, la proporción de folato: vitamina B12 en el caldo de fermentación se aumenta significativamente durante y/o al final de la fermentación (es decir, durante la fase estacionaria), dando como resultado una desviación de la proporción común 1: 1 de folato: vitamina B12. La proporción resultante de folato: vitamina B12 es preferiblemente al menos 2:1, 5:1, 10:1, 50:1, 100:1, 150:1, 200:1, 250:1, o más, o cualquier proporción entremedias de éstas. Véase por ejemplo ejemplo 3 y Fig. 2, que muestran que cepas que sobreexpresan folato de tipo salvaje y recombinantes producen una proporción significativamente aumentada de folato: vitamina B12 en el medio de melón según la invención en comparación con otros medios, tal como medio CDM o de pepino.

65 [0050] Opcionalmente, se puede alternativamente o además usar cepas diferentes durante el proceso de fermentación (es decir, mezclas de cepas), por lo cual al menos una cepa produce cantidades de folato aumentadas y al menos otra cepa produce vitamina B12. Por ejemplo las arqueas no producen folato, pero producen vitamina B12. Así una coinoculación de una cepa productora de folato con una cantidad adecuada de una cepa productora de vitamina B12 es

también una forma de realización aquí. El experto en la materia puede fácilmente identificar cepas bacterianas u otros microorganismos tales como arqueas, levaduras u hongos, que producen vitamina B12.

5 [0051] Vitamina B 12 puede ser medida y/o cuantificada en el caldo de fermentación usando métodos estándares, tales como aquellos mencionados para la cuantificación de folato.

10 [0052] El rendimiento de folato obtenido de la fermentación en el medio de extracto de melón es significativamente superior en comparación con el rendimiento de folato de la fermentación usando la misma cepa en CDM (medio químicamente definido, como se describe en Teusink, B., van Enckevort, F.H., Francke, C., Wiersma, A., Wegkamp, A., Smid, E.J. and Siezen, R.J., 2005, Appl Environ Microbiol 71, 7253-7262 ). "Significativamente superior" se refiere por lo menos a 2x, preferiblemente al menos aproximadamente 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x 15x, 16x, o más, del folato total (la suma de folato extracelular e intracelular, corregida para el folato del fondo que está presente en el medio) siendo producido hacia el final de la fermentación (en el caldo de fermentación) en comparación con la fermentación en CDM. Los niveles de folato del fondo son preferiblemente determinados en el medio no inoculado con bacterias pero que es sin embargo tratado de la misma manera. Por ejemplo, un caldo de fermentación que comprende (durante y/o después de la fermentación según la invención) una cantidad total de folato de al menos aproximadamente 40, 50, 60, 15 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 1000µg o más folato por litro de caldo de fermentación está provisto aquí, dependiendo de la cepa o combinación de las cepas usadas. Incluso niveles más altos pueden ser conseguidos, por ejemplo si una o más cepas modificadas genéticamente (p. ej. sobreproductoras de folato) es/son usada(s), y opcionalmente también se añade p-ABA, se puede producir folato según la presente invención en cantidades de al menos 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000µg de folato o más por litro de caldo de fermentación (véanse los ejemplos).

25 [0053] El contenido de folato total puede ser medido usando técnicas conocidas, tal como por ejemplo el ensayo microbiológico descrito por Home and Patterson (1988, Clin Chem 34:2357-2359 ) o por Sybesma et al. 2003 (Appl. Environm. Microbiol 69: 3069-3076). Otros ensayos cuantitativos incluyen por ejemplo análisis por HPLC o LC-MS. El folato es preferiblemente medido al final de la fermentación, es decir durante una fase estacionaria de las cepas del inóculo.

30 [0054] Las cantidades adecuadas de inóculo de cada cepa de *Lactobacillus* pueden variar, pero generalmente aproximadamente 1% de volumen de un cultivo crecido totalmente (conteniendo por ejemplo aproximadamente  $1 \cdot 10^8$  células por ml) se añade a un medio de fermentación fresco. Para producir el inóculo, se pueden utilizar métodos microbiológicos estándares.

35 [0055] Cuando se usan mezclas de 2 o más cepas de *Lactobacillus*, los niveles de inóculo pueden ser adaptados, no obstante, el volumen total de inóculo (de 2 o más cepas) preferiblemente no excede el 1% del volumen del medio de fermentación final.

40 [0056] Opcionalmente otras bacterias productoras de folato de calidad alimenticia y/u otras bacterias de calidad alimenticia, tales como cepas probióticas se pueden añadir al medio de fermentación antes y/o durante la fermentación y/o después de la fermentación y/o al producto nutracéutico, alimenticio o de pienso fabricado y que comprende (o que consiste en) medio fermentado de extracto de melón (véase más abajo). No obstante, en una forma de realización preferiblemente el medio de fermentación no está inoculado con cualquier otro microorganismo distinto de la(s) cepa(s) de *Lactobacillus* productora(s) de folato seleccionadas (y/o vitamina B12), y opcionalmente uno o más microorganismos 45 productores de vitamina B12. El medio está, por lo tanto, en una forma de realización libre de microorganismos de calidad no alimenticia, microorganismos patógenos, microorganismos de degradación y/o cualquier otra especie o cepa bacteriana no deseada y/o no inoculada, tal como por ejemplo cepas de *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, y/o *Lactococcus*, u otros.

50 [0057] La fermentación según la fase (d) se realiza usando métodos estándar, como por ejemplo descritos en los ejemplos.

55 [0058] Después de que la fermentación haya tenido lugar durante un periodo adecuado, preferiblemente hasta que no se observa ningún aumento adicional en la densidad óptica, el medio fermentado (también referido aquí como el "caldo de fermentación") (o una parte del mismo) es opcionalmente usado además para por ejemplo purificar folato a partir de ello y/o para hacer productos comprendiendo o consistiendo en el medio fermentado (o partes del mismo) comprendiendo el folato producido por la cepa(s) de *Lactobacillus*.

60 [0059] También partes del medio fermentado pueden ser utilizadas. Por ejemplo las bacterias pueden ser eliminadas del medio (p. ej. por filtración o centrifugado) y el medio sin bacterias puede ser utilizado adicionalmente. Alternativamente, el medio fermentado comprendiendo las bacterias se puede utilizar como tal. Esto es particularmente atractivo en casos donde la LAB usada es una cepa probiótica, especialmente una cepa de LAB probiótica capaz de producir tanto folato como vitamina B12 por sí misma. Otra opción es matar o inactivar la mayor parte de o todas las bacterias, por ejemplo por calentamiento o sonicación.

65 [0060] Al fabricar un alimento, pienso o producto nutracéutico que comprende o que consiste en un medio de

fermentación hecho según la invención (o una parte de la misma), es una forma de realización añadir el caldo de fermentación (o parte del mismo), que comprende las bacterias vivas y/o bacterias viables, al producto o ingredientes del producto, por ejemplo para añadirlo al principio, durante y/o después del proceso de producción del alimento o pienso.

5

#### Productos y composiciones según la invención

[0061] También son proporcionadas composiciones y productos que comprenden o que consisten en caldo de fermentación (o una o más partes de las mismas) preparado según el método anterior.

10

[0062] El medio fermentado (el caldo de fermentación) es usado en una forma de realización como tal, pero puede opcionalmente ser concentrado o diluido o tratado previamente antes de ser usado para preparar una composición de alimento, pienso o suplemento alimenticio. Pretratamientos incluyen filtración y/o centrifugado, esterilización, liofilización, congelación, y similares. El medio de fermentación como tal y/o el medio de fermentación pretratado son en esencia los productos primarios del método anterior. Estos productos primarios se pueden utilizar como tal o se pueden utilizar como un ingrediente de alimento y/o suplemento alimenticio, es decir se puede usar una cantidad adecuada de producto primario como ingrediente en el momento de la fabricación de un suplemento alimenticio o de alimento final.

15

[0063] Por ejemplo el caldo de fermentación y/o el caldo de fermentación tratado previamente se pueden utilizar como ingredientes en la preparación de alimento, pienso o suplemento alimenticio reforzados con folato tales como alimentos líquidos (p. ej. bebidas, sopas, yogurs o a base de yogur bebidas, batidos de leche, refrescos, bebidas de fruta, producto lácteo fermentado, sustituyentes de comida, fruta fermentada y/o productos de zumo, etc.) o alimentos/piensos sólidos (comidas, sustituyentes de comida, refrigerios tales como barritas de caramelo, pienso para animales, productos lácteos fermentados, alimentos o piensos fermentados, productos congelados, aditivos de alimentos liofilizados, quesos, etc.) o alimentos semisólidos (postres, etc.). El medio fermentado y/o el medio de fermentación pretratado puede simplemente ser añadido a, o usado durante el proceso de producción de tales productos.

20

25

[0064] El caldo de fermentación obtenido del método de fermentación anterior se puede pretratar por concentración, dilución, filtración y/o liofilización antes de ser usado como producto o ingrediente de producto. La concentración y dilución con agua o tampón u otros líquidos de calidad alimenticia (p. ej. zumos de fruta, leche, etc.) puede llevarse a cabo para llegar a un nivel de folato apropiado en el alimento final, pienso o suplemento alimenticio. La filtración se puede utilizar para eliminar bacterias del caldo. En una forma de realización según la invención el caldo de fermentación (o un concentrado, dilución y/o filtrado del mismo) se liofiliza para fabricar un polvo reforzado con folato. Tal polvo es luego usado en la preparación de un alimento, pienso o suplemento alimenticio en la forma sólida, líquida o semisólida. Se pueden formular suplementos tales como bebidas, comprimidos, cápsulas, geles, polvos, píldoras, etc. por lo cual el suplemento comprende una cantidad adecuada de producto primario y por lo tanto también una cantidad adecuada de folato.

30

35

[0065] Aunque el caldo de fermentación se puede pretratar para eliminar y/o inactivar las bacterias, se prefiere en formas de realización determinadas de la invención que las bacterias no sean eliminadas y/o no sean inactivadas, especialmente si las bacterias tienen propiedades probióticas. Así, preferiblemente las composiciones según la invención comprenden bacterias vivas y/o viables (p. ej. liofilizadas).

40

[0066] Las composiciones de alimento, pienso o suplemento según la invención comprenden o consisten en una cantidad adecuada de producto primario (caldo de fermentación, por ejemplo como tal o pretratado). La cantidad de producto primario para ser usada en la preparación de la composición variará, dependiendo de la concentración de folato en el caldo de fermentación y de la cantidad deseada que estará presente en la composición por fabricar. Preferiblemente el producto comprende una cantidad de folato que es equivalente al menos aproximadamente 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, más preferiblemente 100%, 150%, 200%, 300% o más de la cantidad diaria recomendada de folato. Una composición para mujeres embarazadas o con intención de quedarse embarazadas puede, por ejemplo, comprender una cantidad de caldo de fermentación que proporciona por ejemplo aproximadamente 400µg de folato al día o 600 µg de folato al día (200% o 300% cantidad diaria recomendada), mientras que las composiciones para mujeres no embarazadas puede comprender aproximadamente 200µg folato / día (100% cantidad diaria recomendada, RDA por sus siglas en inglés). Se observa que niveles de ingesta recomendados varía entre países, que varía entre 200 y 400 µg de folato al día para mujeres no embarazadas y embarazadas, respectivamente, en Europa, mientras que estos niveles son más altos en los EEUU, donde 400 y 600 µg de folato se recomiendan para mujeres no embarazadas y embarazadas, respectivamente. Así, la composición puede por ejemplo comprender entre aproximadamente 20µg y 600 µg de folato por dosificación diaria, o más. Tal y como se menciona la RDA para países diferentes puede ser diferente, de modo que cantidades eficazmente diferentes de folato pueden estar presentes en los productos hechos para mercados diferentes.

45

50

55

60

[0067] En una forma de realización la composición comprende además vitamina B12, preferiblemente en la RDA para vitamina B12. Preferiblemente la vitamina B12 y el folato se producen por el mismo microorganismo (es decir, por una única cepa, por ejemplo *L. reuteri*) en el método según la invención, o al menos se producen en el mismo proceso de fermentación (es decir, por la(s) misma(s) cepa(s) o diferente(s) añadida(s) al medio de fermentación)

65



[0068] Al preparar un alimento, pienso o suplemento alimenticio que comprende o que consiste en ingredientes primarios obtenibles según el método anterior, obviamente se pueden seguir métodos estándares de producción y formulación de alimentos, piensos y suplementos alimenticios. Por ejemplo, se pueden añadir otros componentes durante el proceso de producción, tales como proteínas, carbohidratos, grasas, minerales (hierro, calcio, cobre, magnesio, selenio, zinc, etc.), prebióticos, otras vitaminas (vitamina B1, B2, B3, B5, B6; B12, C, D, E, betacaroteno, biotina, etc.), agentes aglutinantes, agentes de humidificación, agentes colorantes, agentes aromatizantes, estabilizadores, emulsionantes, etc. Si la vitamina B12 está ya presente en una cantidad deseada en el caldo de fermentación (p. ej. RDA es aproximadamente 1 µg para seres humanos), más adición no será deseada. Además, se pueden añadir otros ingredientes bioactivos y pueden estar comprendidos en el producto final, tales como bacterias probióticas, fármacos, etc.

[0069] Las cantidades diarias de folato y/o vitamina B12 pueden por supuesto ser administradas bien de una vez o bien se pueden subdividir en dos, tres o más dosificaciones al día. Las composiciones pueden, así, también comprender o consistir en un caldo de fermentación adecuado para una única administración al día o para varias administraciones diarias.

[0070] Para algunos sujetos, la ingesta diaria no será necesaria y los productos que proporcionan folato pueden ser consumidos sólo una vez cada pocos días o una vez a la semana, o menos frecuentemente. Por ejemplo los alimentos o piensos reforzados con folato (p. ej. alimentos o piensos fermentados) no necesitan ser tomados a diario, aunque parece ser mejor tomar demasiado folato que demasiado poco, puesto que la deficiencia es más dramática que la sobredosificación. Una toma diaria (una o más veces al día) es por lo tanto una forma de realización preferida aquí.

[0071] Los productos según la invención son preferiblemente para la ingesta oral por seres humanos y/o animales, tales como animales de compañía (perros, gatos, etc.) o animales de granja (vacas, caballos, cerdos, pollos, oveja, etc.) o cualquier otro animal (animales salvajes, por ejemplo mantenidos en zoos, etc.). Los productos son especialmente adecuados para personas que necesitan una toma de folato más regulada o personas que necesitan una toma de folato mejorada, tales como atletas, mujeres embarazadas, personas deficitarias de folato, y similares.

[0072] Productos preferidos incluyen por ejemplo bebidas a base de zumo de melón, o bebidas a base de triturado de melón, conteniendo altos niveles de folato y preferiblemente también de vitamina B12 y que preferiblemente tienen una fecha de caducidad larga para transporte y almacenamiento, especialmente en países menos desarrollados donde la gente que sufre deficiencias vitamínicas pueden ser tratadas (terapéuticamente o profilácticamente).

#### Medio de fermentación y caldo de fermentación según la invención

[0073] El medio de fermentación y/o caldo de fermentación es también una forma de realización aquí como tal. Así en una forma de realización un medio de fermentación de *Lactobacillus* está provisto que comprende o consiste en extracto de fruta de melón como se ha descrito anteriormente y comprende además p-ABA, donde dicho medio de fermentación no comprende extractos de frutas de otras especies vegetales. En otra forma de realización un caldo de fermentación (como tal y/o pretratado) está provisto, como se describe, que se puede usar para hacer alimentos, piensos o suplementos alimenticios reforzados con folato. Este producto primario puede también ser almacenado durante períodos más largos por ejemplo congelados o liofilizados antes de ser usados como ingrediente para la producción del producto final.

#### Usos según la invención

[0074] En otra forma de realización se describe el uso de extracto de fruta de melón para la preparación de medio de fermentación (como se describe anteriormente).

[0075] Además el uso del caldo de fermentación, obtenible de la fermentación de *Lactobacillus* del medio de fermentación (que comprende o que consiste en extracto de fruta de melón), para la preparación de un alimento, pienso o suplemento alimenticio está provisto aquí.

[0076] Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran la invención. A menos que se indique lo contrario, la práctica de la invención empleará métodos convencionales estándares de biología molecular, farmacología, microbiología o bioquímica. Tales técnicas son descritas en Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA y Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17ª ed. (1985), *Microbiology: A Laboratory Manual* (6ª Edition) por James Cappuccino, *Laboratory Methods in Food Microbiology* (3ª edición) por W. Harrigan (autor) Academic Press.

### **Ejemplos**

#### 1. Fermentación en 80% de zumo de melón en comparación con fermentación en CDM

[0077] En este ejemplo se determinó si la fermentación de zumo de melón producía más folato en comparación con

## CDM

1.1 Material y métodos5 1.1.1 Cepas y preparación de inóculo

[0078] Las siguientes cepas fueron usadas:

10 *Lactobacillus reuteri* JCM 1112 y *Lactobacillus plantarum* WCFS 1. Para ambas cepas un 1% de inóculo fue usado para la inoculación de los medios desarrollados. El aislado humano *L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> se obtuvo de la Colección Japonesa de microorganismos (RIKEN BioResource Center, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japón). *L. plantarum* WCFS1, un aislado humano obtenido de la colección de cultivos de investigación alimenticia NIZO (Ede, Países Bajos).

15 1.1.2 Construcción de las cepas sobreproductoras de folato

[0079] El ADN genómico de *L. plantarum* WCFS 1 fue aislado usando procedimientos establecidos (Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N., Hols, P. and Delcour, J. (1994) *Lactobacillus plantarum* 1dhl gene: overexpression and deletion. *J Bacteriol* 176, 596-601). PCR fue realizada de la siguiente manera; 30 seg. de desnaturalización a 94°C, 30 seg. de derretimiento de cebador a 45°C, y elongación a 68°C durante 1 min por kilobase, esta secuencia específica fue repetida durante 30 ciclos. Pfx polimerasa (Invitrogen, Breda, Países Bajos) fue usada para la amplificación. El ligamiento de ADN fue realizado usando T4 DNA-ligasa (Invitrogen) por incubación durante toda la noche a 16°C, fragmentos de ADN fueron mezclados con una proporción 1:5 de plásmido:inserto. El clúster de genes de folato fue amplificado por PCR usando folBKpnF (cebador directo, GAAAGAGGCTGGGTACCATTATGGGCATGATTC), y folPXbaR (cebador inverso CTTAACCCCATCTAGACGTAATATCG). Los cebadores folBKpnF y folPXbaR fueron modificados en su secuencia para introducir un sitio de restricción KpnI, y XbaI, respectivamente (bases modificadas subrayadas). El clúster de genes de folato fue amplificado de 18 pares de bases corriente arriba de folB a 52 bases corriente abajo de folP. La expansión lineal de ADN amplificado fue parcialmente digerida, por KpnI (Invitrogen) y XbaI (Invitrogen). La digestión parcial es esencial porque folP contiene un sitio de restricción de XbaI adicional. El clúster de genes de folato digerido, contiene la longitud total del clúster de genes de folato. El plásmido pNZ7021 (Wegkamp, A., van Oorschoot, W., de Vos, W.M. y Smid, E.J. (2007) Characterization of the Role of para-Aminobenzoic Acid Biosynthesis in Folate Production by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 73, 2673-2681) fue también digerido con XbaI y KpnI. Ambas piezas digeridas de ADN fueron mezcladas en una proporción 1: 5 (plásmido:inserto), y fueron ligadas por T4 DNA-ligasa. El ADN ligado fue transferido a células competentes de cepas NZ9000AylgG *L. lactis* (Klaus et al. 2005) usando electroporación por procedimientos establecidos (de Vos, W.M., Vos, P., de Haard, H. y Boerrigter, I. (1989) Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 gene encoding an extracellular serine proteinase. *Gene* 85, 169-176). Posteriormente, la cepa de *L. lactis* transformada fue cultivada durante 40 horas en placas M 17 con 10 mg/L de CM. Colonias resistentes al cloranfenicol fueron controladas para la presencia del plásmido por PCR usando folpF (cebador directo, CATGGCATCGATATTGAACGAATTG); y nisRKR (cebador inverso, GTTCTATCGAAAGCGAAATC). Transformantes positivos fueron escogidos e inoculados en caldo M17 con 10 mg/L de CM. El contenido de plásmido total fue aislado de cultivos completos crecidos durante toda la noche y los plásmidos fueron aislados usando columnas Jetstar (Genomed GmbH, Bad Oeynhausen, Alemania). El plásmido fue controlado por análisis de restricción y posteriormente secuenciado usando procedimientos estándares como se describe abajo. El plásmido resultante fue designado como pNZ7026. Después, plásmidos pNZ7021 y pNZ7026 fueron transferidos a células competentes de *L. reuteri* por electroporación como se describe en otro lugar (Walter, J., N. C. Heng, W. P. Hammes, D. M. Loach, G. W. Tannock, y C. Hertel. 2003. Identification of *Lactobacillus reuteri* genes specifically induced in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 69:2044-51). Los transformantes fueron crecidos durante 40 horas en las placas de MRS con 10 mg/L CM y las células resistentes de CM fueron analizadas para la presencia de los plásmidos apropiados por PCR. Para *L. plantarum* con el pNZ7026, los cebadores folpF y nisRKR fueron usados como sondas. Los cebadores CmdownF (cebador directo) y nisRKR fueron usados para el control de la presencia de pNZ7021 en la cepa huésped.

1.1.3 Preparación de medio de fermentación y CDM

55 [0080] Medios químicamente definidos fueron hechos como se describe por Teusink, B., van Enckevort, F.H., Francke, C., Wiersma, A., Wegkamp, A., Smid, E.J. and Siezen, R.J., 2005, *Appl Environ Microbiol* 71, 7253-7262). Zumo de melón fue hecho como se describe abajo. Medios de melón fueron hechos a partir de *Cucumis melo* var. *reticulatus* después de pelar y eliminar las semillas. El melón fue liquidificado usando una batidora de cocina y la pasta resultante fue triturada a través de una tela de algodón. El flujo circulante fue centrifugado dos veces a 10.000 r.p.m. durante 10 min a temperatura ambiente usando un centrifugador Sorvall (Newton, CT, USA). El sobrenadante fue almacenado a -20°C hasta más uso. Antes de la inoculación, los medios de melón fueron diluidos con un tampón de potasio-fosfato 0.5 M (pH 5.8) en una proporción 4:1 (v/v). El pH final fue ajustado a 6.0 y el medio de medios de melón fue forzado a través de un filtro de 0.22 µm para asegurar la esterilidad. Cuando se menciona, ambos medios de fruta fueron suplementados con p-ABA hasta una concentración final de 10 mg/L.

65 1.1.4 Fermentación

[0081] Los medios de melón y de pepino fueron inoculados con *L. reuteri* tipo salvaje, control (pNZ7021; vector vacío) y sobreproductor de folato (pNZ7026; plásmido que sobreexpresa el clúster de genes de folato). Para *L. plantarum* WCFS1 el tipo salvaje fue inoculado. Medios inoculados fueron cultivados durante 40 horas a 37°C.

5 1.1.5 Mediciones de folato

[0082] El contenido de folato total fue medido usando el ensayo microbiológico descrito por Home and Patterson (1988, Clin Chem 34:2357-2359) o por Sybesma et al. 2003 (Appl. Environm. Microbiol 69: 3069-3076). Muestras de folato fueron tomadas después de aproximadamente 40 horas de crecimiento del cultivo desde la fase estacionaria. Adicionalmente, los niveles del fondo de estas vitaminas fueron determinados a partir de muestras tratadas idénticamente pero no inoculadas.

1.2 Resultados

15 [0083] Los niveles de producción de folato fueron determinados para *L. reuteri* y *L. plantarum* en CDM y 80% de zumo de melón.

[0084] Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2 para *L. reuteri* JCM 1112 y en las tablas 3 y 4 para *L. plantarum* WCFS 1.

20 Tabla 1 - Fermentación de la cepa JCM1112 de *L. reuteri* en 80% de medio de zumo de melón

| Cepa                           | Pool de producción de folato total µg/L | Desviación estándar.µg/L | Pool de producción de folato total µg/L por OD600 | Número de veces* de aumento de pools de folato en comparación con tabla 2 |
|--------------------------------|---|--------------------------|---|---|
| JCM 1112 tipo salvaje          | 325.12                                  | 12, 96                   | 103.65  | 5.4x  |
| + pNZ7021 <sup>a</sup>         | 321,34                                  | 5,51                     | 131, 66   | 4,6x  |
| + PNZ7026 <sup>b</sup>         | 237, 01                                 | 14, 61                   | 115, 96   | N.d.  |
| + pNZ7026 + P-ABA <sup>c</sup> | 7451, 09                                | 182, 11                  | 2518, 17  | 1.67x   |
| Blanco <sup>d</sup>            | 22                                      | 1                        |   |   |

n.d. = no determinado

<sup>a</sup>, vector vacío

<sup>b</sup>, plásmido de sobreproducción de folato

<sup>c</sup>, plásmido de sobreproducción de folato, conteniendo 10 mg/L adicionales de p-ABA

<sup>d</sup>, zumo de melón

\*, número de veces que aumenta es calculado basándose en el pool de producción de folato total.

25 Tabla 2 - Fermentación de la cepa JCM 1112 de *L. reuteri* en medio CDM con p-ABA

| Cepa                   | Pool de producción de folato total µg/L | Desviación estándar. µg/L | OD <sub>600</sub> |
|------------------------|---|---------------------------|-------------------|
| JCM 1112 tipo salvaje  | 59.92                                   | 5                         | 2.84              |
| + pNZ7021 <sup>a</sup> | 69.05                                   | 8                         | 2.75              |
| + PNZ7026 <sup>b</sup> | 4449.05                                 | 201                       | 2.42              |

<sup>a</sup>, vector vacío

<sup>b</sup>, plásmido de sobreproducción de folato

Tabla 3 - Fermentación de *L. plantarum* WCFS1 en 80% medio de zumo de melón

| Cepa                | Pool de producción de folato total µg/L | Desviación estándar,µg/L | Pool de producción de folato total µg/L por OD <sub>600</sub> | Número de veces* de aumento de pools de folato en comparación con tabla 4 |
|---------------------|---|--------------------------|---|---|
| Tipo salvaje WCFS1  | 394, 51                                 | 1,00                     | 96.63   | 13.6x   |
| Blanco <sup>a</sup> | 22                                      | 1                        |   |   |

<sup>a</sup>, zumo de melón

\*, número de veces de aumento es calculado basado en el pool de producción de folato total.

Tabla 4 - Fermentación de la cepa WCFS I de *L. plantarum* en medio CDM con p-ABA

| Cepa                 | Pool de producción de folato total µg/L | Desviación estándar, µg/L | OD600 |
|----------------------|---|---------------------------|-------|
| Tipo salvaje WCFS1 1 | 29                                      | 3                         | 3.53  |

5 1.3 Conclusión

[0085] Los resultados muestran que la producción de folato de ambas cepas de tipo salvaje y cepas de *Lactobacillus* recombinantes pueden ser significativamente mejoradas cuando se usa zumo de melón como medio de fermentación, en comparación con CDM.

10

Ejemplo 2

[0086] En este ejemplo la posibilidad de extender las conclusiones anteriormente descritas para otros representantes de fruta del género *Cucumis* fue investigada. El mismo experimento fue evaluado usando zumo de pepino, *Cucumis sativus*.

15

2.1.1 Cepas y preparación de inóculo

[0087] Las siguientes cepas fueron usadas: *Lactobacillus reuteri* JCM1112. Un 1% de inóculo fue usado para inoculación de los medios desarrollados.

20

2.1.2 Preparación de medio de fermentación y CDM

[0088] Medios químicamente definidos fueron hechos como se describe por Teusink, B., van Enckevort, F.H., Francke, C., Wiersma, A., Wegkamp, A., Smid, E.J. and Siezen, R.J., 2005, Appl Environ Microbiol 71, 7253-7262). Zumo de pepino fue hecho de la siguiente manera. Medios de zumo de pepino fueron preparados por liquidificación de pepino intacto (*Cucumis sativus*) usando una batidora de cocina (Moulinex, Masterchef 370, Francia). La pasta resultante fue forzada a través de una tela de algodón, y el flujo circulante fue filtrado con un filtro de celulosa (0.15 mm) antes de ser centrifugado dos veces a 10.000 r.p.m. durante 10 min a 4° C usando un centrifugador Sorvall (Newton, CT, EEUU) equipado con un rotor GSA600. El sobrenadante fue almacenado a -20°C hasta un uso posterior. Antes de la inoculación, el zumo de pepino fue diluido en 1 volumen de 0.2 M tampón de potasio-fosfato (pH 5.8). El pH final fue ajustado a 6.0 y el medio de pepino fue forzado a través de un filtro de 0.22 µm para asegurar la esterilidad. Cuando se mencione, ambos medios de fruta fueron suplementados con p-ABA hasta una concentración final de 10 mg/L.

25

30

35

2.1.3 Fermentación

[0089] Los medios de pepino y de CDM fueron inoculados con un control de *L. reuteri* (pNZ7021; vector vacío) y sobreproductores de folato (pNZ7026; plásmido de sobreexpresión de clúster de genes de folato). Medios inoculados fueron cultivados durante 40 horas a 37°C.

40

2.1.4 Mediciones de folato

[0090] Contenido de folato total fue medido usando el ensayo microbiológico descrito por Horne y Patterson (1988, Clin Chem 34:2357-2359) o por Sybesma et al. 2003 (Appl. Environm. Microbiol 69: 3069-3076). Muestras de folato fueron tomadas después de aproximadamente 40 horas de crecimiento del cultivo de la fase estacionaria.

45

2.2 Resultados

[0091] Pools de producción de folato se muestran en tablas 1 y 2 para *L. reuteri* JCM 1112

50

Tabla 1 - Fermentación de la cepa JCM 1112 de *L. reuteri* en 80% medio de zumo de pepino

| Cepa                           | Pool de producción de folato Total µg/L | Desviación estándar.µg/L | Pool de producción de folato total µg/L por OD <sub>600</sub> | Número de veces* de aumento de pools de folato en comparación con tabla 2 |
|--------------------------------|---|--------------------------|---|---|
| + pNZ7021 <sup>a</sup>         | 22,14                                   | 1,00                     | 8.64  | 0.32x   |
| + pNZ7026 <sup>b</sup>         | 64.00                                   | 7,00                     | 33.77   | N.d.  |
| + pNZ7026 + P-ABA <sup>c</sup> | 385, 99                                 | 19.34                    | 501.37  | 0.09x   |
| Blanco <sup>d</sup>            | 9.96                                    | 0.44                     |   |   |

n.d. = no determinado  
<sup>a</sup>, vector vacío  
<sup>b</sup>, plásmido de sobreproducción de folato  
<sup>c</sup>, plásmido de sobreproducción de folato, con 10 mg/L adicionales de p-ABA  
<sup>d</sup>, zumo de pepino  
\*, número de veces de aumento es calculado basado en el pool de producción de folato total.

5 Tabla 2 - Fermentación de la cepa de *L. reuteri* JCM 1112 en medio CDM con p-ABA

| Cepa                   | Pool de producción de folato total µg/L | Desviación estándar, µg/L | OD <sub>600</sub> |
|------------------------|---|---------------------------|-------------------|
| + pNZ7021 <sup>a</sup> | 69.05                                   | 8                         | 2.75              |
| + pNZ7026 <sup>b</sup> | 4449.05                                 | 201                       | 2.42              |

<sup>a</sup>, vector vacío  
<sup>b</sup>, plásmido de sobreproducción de folato

### 2.3 Conclusión

10 [0092] Los resultados muestran que la producción de folato de las cepas recombinantes de *Lactobacillus reuteri* puede no aumentar cuando se usa zumo de pepino como medio de fermentación, en comparación con CDM. Estos experimentos muestran claramente que la capacidad para producir pools ricos en folato depende del tipo de zumo de frutas que se usa como caldo.

### 15 Ejemplo 3 - Caldo de fermentación con proporciones aumentadas de folato : vitamina B12

[0093] La proporción de producción de folato y B12 fue determinada después de la fermentación de *L. reuteri* en CDM y zumo de melón. Los experimentos fueron realizados como se ha descrito anteriormente, no obstante, adicionalmente se tomaron muestras para el análisis de B12.

### 20 3.1 Materiales y métodos

#### 3.1.1 Cepas y preparación de inóculo

25 [0094] Las siguientes cepas fueron usadas: *Lactobacillus reuteri* JCM1112 y *Lactobacillus plantarum* WCFS 1. Para ambas cepas un 1% de inóculo fue usado para la inoculación de los medios desarrollados.

#### 3.1.2 Fermentación

30 [0095] Los medios de melón y CDM fueron inoculados con *L. reuteri* tipo salvaje, control (pNZ7021; vector vacío) y sobreproductor de folato (pNZ7026; plásmido de sobreexpresión del clúster de genes de folato). Medios inoculados fueron cultivados durante 40 horas a 37°C.

#### 3.1.3 Mediciones de B12

35 [0096] El contenido de vitamina B12 fue determinado según los métodos Oficiales de Análisis de AOAC International, usando el ensayo de vitamina B<sub>12</sub> de *L. delbrueckii* subesp. *lactis* ATCC 7830 (Horowitz, W. (ed.). 2006. Official methods of analysis of AOAC International, 18<sup>a</sup> ed. AOAC International, Gaithersburg, Md.). Extractos celulares de cultivos de fase estacionaria para el análisis de B<sub>12</sub> fueron preparados tal y como se ha descrito anteriormente (Taranto, M. P., J. L. Vera, J. Hugenholtz, G. F. De Valdez, y F. Sesma. 2003. *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produce cobalamín. J Bacteriol 185:5643-7 .).

3.1.4 Mediciones de folato

5 [0097] El contenido de folato total fue medido usando el ensayo microbiológico descrito por Home y Patterson (1988, Clin Chem 34:2357-2359) o por Sybesma et al. 2003 (Appl. Environm. Microbiol 69: 3069-3076). Muestras de folato fueron tomadas después aproximadamente 40 horas de crecimiento del cultivo de la fase estacionaria.

3.2 Resultados

10 [0098] Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2.

Figura 1 muestra pools de producción de folato y de producción de B12 después de la fermentación en CDM, para *L. reuteri* tipo salvaje, control y sobreproductor de folato. Las barras blancas indican agrupaciones de folato, las barras negras muestran niveles de B12.

15 Figura 2 muestra agrupaciones de producción de folato y de producción de B12 después de la fermentación en el pepino y melón, para *L. plantarum*, *L. reuteri* tipo salvaje, control y sobreproductor de folato. Las barras blancas indican pools de folato, las barras negras muestran niveles de B12.

20 3.3 Conclusión

[0099] La bacteria *L. reuteri* fue capaz de producir proporción de folato y B12 en una proporción 1:1 en CDM, para la cepa de tipo salvaje y de control. La sobreexpresión de folato resultó en una proporción de folato a B12 de 100 a 1. La fermentación de zumo de melón es una buena manera de aumentar el contenido de folato, de modo que, una proporción de folato a B12 más favorable pueda ser obtenida. Para la cepa tipo salvaje y de control una proporción de folato y B12 de 10:1 fue encontrada, en la cepa de sobreproductora de folato ésta fue 250:1.

25 Ejemplo 4

30 [0100] Basándose en los tres ejemplos anteriores, se fabrica un producto alimenticio con propiedades provechosas. El producto alimenticio es un zumo de frutas fermentado que produce folato y B12 en proporciones adecuadas. Por otra parte, lactobacillos con propiedades probióticas para fermentar el zumo de melón y aumentar el contenido de folato.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para aumentar los niveles de folato totales producidos por una especie de *Lactobacillus* productora de folato durante la fermentación comprendiendo las fases siguientes:
- a) proporcionar un extracto de una fruta de melón de una especie de *Cucumis melo*;
- b) usar todo o parte del extracto de fruta de melón para preparar un medio de fermentación;
- 10 c) inocular dicho medio de fermentación con una o más cepas de *Lactobacillus* productora de folato;
- d) permitir que ocurra la fermentación; y opcionalmente
- 15 e) usar todo o parte del medio fermentado para la preparación de un alimento, pienso o suplemento alimenticio.
2. Método según la reivindicación 1, donde dicha cepa de *Lactobacillus* es una cepa de tipo salvaje, cepa mutante o cepa recombinante.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde dicha cepa de *Lactobacillus* es una cepa probiótica.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha cepa de *Lactobacillus* pertenece a las especies de *L. reuteri* o *L. plantarum*.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además la fase de añadir ácido para-aminobenzoico (p-ABA) al medio de fermentación durante las fases b), c) y/o d).
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde dicho extracto de fruta de melón es zumo de melón.
- 30 7. Medio de fermentación de *Lactobacillus* que comprende o que consiste en extracto de fruta de melón de una fruta de las especies *Cucumis melo* y además comprendiendo p-ABA, donde dicho medio de fermentación no comprende extractos de frutas de otra especie vegetal.
- 35 8. Medio de fermentación según la reivindicación 7, donde dicho extracto de fruta de melón es zumo de melón y donde al menos 50% del medio consiste en dicho zumo de melón.
9. Caldo de fermentación obtenido del método según las reivindicaciones 1-6.
- 40 10. Composición de alimento, pienso o de suplemento alimenticio que comprende o que consiste en el caldo de fermentación según la reivindicación 9.
11. Composición de alimento, pienso o de suplemento alimenticio según la reivindicación 10, siendo seleccionada de una bebida de fruta, una barra de caramelo, una bebida de yogur, un producto lácteo fermentado, un sustituto de comida, helado, queso y un batido.
- 45 12. Uso de un caldo de fermentación según las reivindicaciones 9 para la preparación de una composición de alimento ,pienso o de suplemento alimenticio que comprende folato y opcionalmente vitamina B 12.
- 50 13. Uso según la reivindicación 12, donde dicho extracto de fruta de melón es zumo de melón.

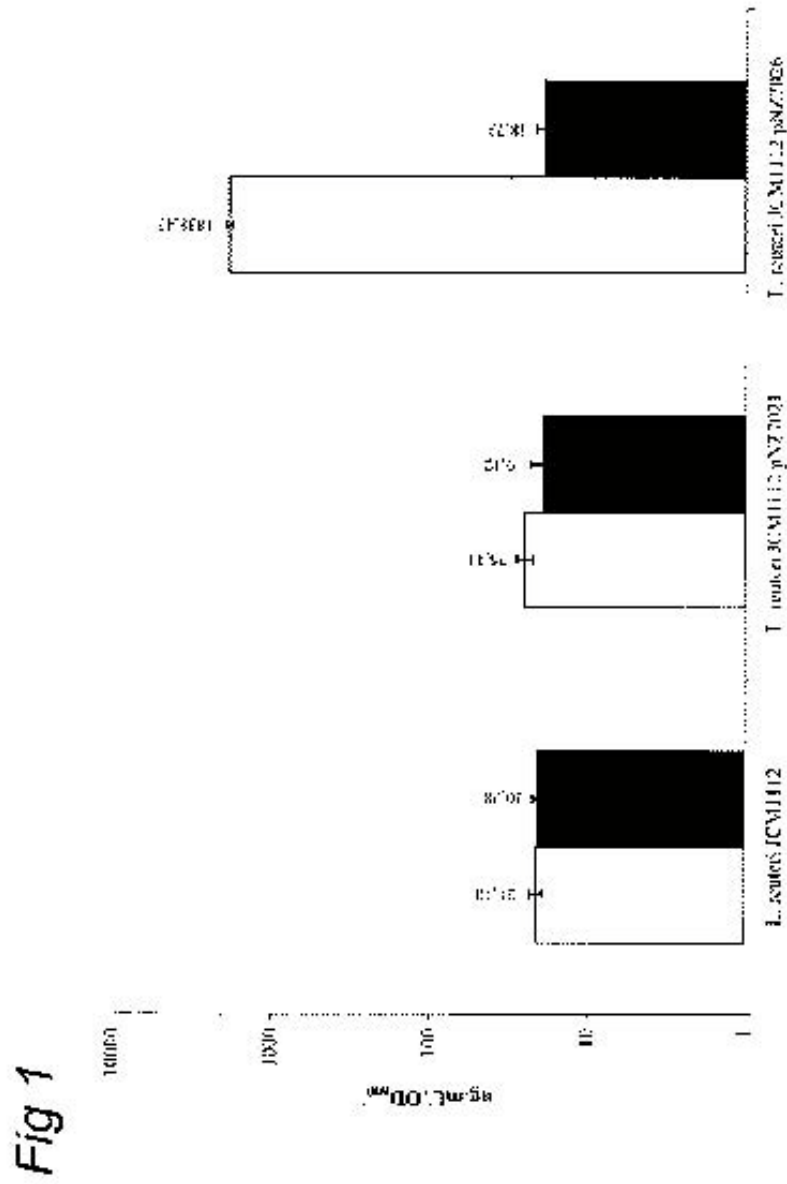




Fig 2

