

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 767**

51 Int. Cl.:

**C12R 1/865** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)  
**A23L 1/304** (2006.01)  
**C12N 1/18** (2006.01)  
**A23L 1/015** (2006.01)  
**A23L 1/03** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2009 E 09786612 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 2317872**

54 Título: **Biomasa enriquecida en cobre, procedimiento para la preparación de la misma y productos probióticos, cosméticos, dietéticos y nutracéuticos que comprenden la misma**

30 Prioridad:

**16.07.2008 IT TO20080547**

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

**26.08.2013**

73 Titular/es:

**BIOMAN S.R.L. (100.0%)**  
**Via Alfieri 18**  
**10121 Torino, IT**

72 Inventor/es:

**MANZONI, MATILDE;**  
**ROLLINI, MANUELA SILVIA y**  
**BENEDETTI, ALBERTO**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 420 767 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

Biomasa enriquecida en cobre, procedimiento para la preparación de la misma y productos probióticos, cosméticos, dietéticos y nutraceúticos que comprenden la misma

5 La presente invención se refiere a una biomasa enriquecida con cobre y a un procedimiento para la preparación de una biomasa enriquecida con cobre.

La contribución de los microelementos tales como el cobre es muy importante para el organismo humano y animal. El cobre es un elemento esencial para el metabolismo de energía celular, la producción de tejido conjuntivo y la síntesis de péptidos neuroactivos. Participa en la cadena respiratoria, interviene en la síntesis de hemoglobina (junto con el hierro) y en la actividad de queratinización y pigmentación del cabello y la piel.

10 No obstante, la liberación de cobre en el interior del organismo humano y animal se hace difícil por los efectos tóxicos que un metal de este tipo puede causar si se ingieren dosis elevadas.

Con el fin de superar este problema, los inventores han proporcionado un método para la fabricación de una biomasa que consiste en células de levadura caracterizada por un elevado contenido intracelular de cobre en forma de un complejo de cobre-glutación (Cu-GSH). La biomasa obtenible mediante el procedimiento de la invención se denomina en lo sucesivo en el presente documento "biomasa de levadura enriquecida en cobre".

15 Fabricar un complejo de cobre con glutación en células de levadura permite de forma ventajosa eliminar los riesgos de toxicidad del metal.

Además, el propio glutación es una molécula biológica útil para el organismo animal y humano. El glutación (GSH-L- $\gamma$ -glutamyl-L-cisteinil-glicina) es, de hecho, el compuesto tiol no proteináceo más abundante y ampliamente distribuido en los seres vivos, desde procariontas a eucariotas. Este tripéptido se sintetiza intracelularmente mediante la acción sucesiva de dos enzimas: la primera es la  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa (GSH I), que sufre una inhibición por retroalimentación por el propio GSH; la última es la GSH sintasa (GSH II). El bajo potencial redox ( $E^{\circ} = -240$  mV) hace del GSH un fuerte tampón redox celular. En los tejidos, el GSH desempeña un papel de gran importancia en los mecanismos de biorreducción, protección contra la tensión oxidativa y xenobiontes, así como en la detoxificación de metabolitos endógenos, actividades enzimáticas y los metabolismos del azufre y del nitrógeno. Por estas razones, se considera que el GSH es una molécula de defensa potente y versátil. Dichas características hacen del GSH una importante molécula farmacológicamente activa para tratar muchas afecciones patológicas, por ejemplo: infección por VIH, cirrosis hepática, inflamaciones del páncreas y para contrarrestar el proceso de envejecimiento. Además, el GSH es de interés en la industria de los alimentos y en el campo de la nutrición deportiva.

En algunas especies de levadura [1, 2] se encuentran niveles altos de GSH, en las que el tripéptido parece participar en los mecanismos de defensa celular contra las tensiones nutricionales y oxidativas [2, 3].

Además, el GSH facilita la reducción del ion cobre de  $\text{Cu}^{++}$  a la forma  $\text{Cu}^+$ . En consecuencia, el GSH secuestra los iones de  $\text{Cu}^+$  en forma de conjugado cobre-glutación (Cu-GSH). En varios estudios se ha sugerido que los conjugados Cu-GSH desempeñan un papel esencial en la transferencia del cobre a una forma apo de las enzimas que contienen cobre (tales como la superóxido dismutasa), de las enzimas implicadas en la protección de la célula frente a toxicidades por metales pesados (como las metalotioneínas) y de las enzimas implicadas en el transporte del cobre (como la ceruloplasmina).

40 Los presentes inventores han resuelto el problema mencionado de la liberación del cobre dentro del organismo humano y animal mediante el descubrimiento de que células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, si crecen en condiciones de cultivo adecuadas, son capaces de acumular concentraciones altas del complejo Cu-GSH dentro de la célula sin que estas concentraciones elevadas sean perjudiciales para la supervivencia de las células.

En base a este hallazgo, los inventores han definido un método de cultivo para las células de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio nutritivo que contiene una sal de cobre en condiciones que favorecen la acumulación intracelular del cobre en forma de un complejo Cu-GSH.

La biomasa de levadura enriquecida con cobre obtenible mediante el procedimiento de la invención, que tiene un contenido intracelular del complejo Cu-GSH superior al 1% en peso seco, es adecuada tanto para aplicaciones en el campo de la cosmética, por ejemplo, para la fabricación de cosméticos o productos cosmeceúticos, como para aplicaciones en el campo dietético y alimentario, por ejemplo, para la fabricación de productos con actividad próbiótica, como suplementos alimenticios, productos dietéticos, alimentos funcionales, productos nutraceúticos y varios tipos de preparaciones alimentarias.

Por tanto, un primer objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de una biomasa de levadura enriquecida con cobre caracterizada por las etapas siguientes;

55 (i) cultivar células de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, cepa SA 221 BM (número de acceso DSM 21530, fecha de depósito 6 de junio de 2008) o cepa SA 586 BM (número de acceso DSM 21531, fecha de depósito 6 de junio de 2008), en un medio nutritivo líquido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, al menos un aminoácido y una sal de cobre, de modo que se obtenga una biomasa de levadura enriquecida con cobre en forma de un complejo de Cu-GSH en la que el contenido intracelular del complejo Cu-GSH es superior al 1% en peso seco; y

60 (ii) separar la biomasa de levadura enriquecida con cobre obtenida en la etapa anterior del medio nutritivo líquido.

El procedimiento de la invención se distingue por su simplicidad y bajo coste.

La fuente de carbono en el medio nutritivo líquido puede comprender, por ejemplo, azúcares tales como dextrosa, glucosa, fructosa, sacarosa, manosa, manitol, ácidos orgánicos, alcoholes tales como etanol, glicerol, aldehídos.

5 La fuente de nitrógeno puede comprender, por ejemplo, extracto de malta, licor de maceración del maíz, hidrolizados enzimáticos de caseína, aminoácidos, sales amónicas tales como, por ejemplo, sulfato amónico.

El medio nutritivo líquido en el que las células se cultivan comprende al menos un aminoácido, tal como, por ejemplo, cisteína, metionina, glutamato, glutamina, glicina, leucina, acetilcisteína, serina o combinaciones de los mismos. Se prefieren las siguientes combinaciones de aminoácidos: cisteína y glicina; cisteína, glicina y serina; cisteína, glicina, serina y metionina.

10 La sal de cobre en el medio nutritivo líquido es, por ejemplo, acetato de cobre, sulfato o carbonato de cobre. Entre estos se prefiere el acetato de cobre. La concentración de la sal de cobre está comprendida, preferentemente, entre 0,1 y 3 mM.

En una realización preferida, el medio nutritivo líquido comprende una o más sales minerales adicionales además del acetato de cobre, tales como, por ejemplo, citrato sódico, sulfato potásico, sulfato de magnesio.

15 En una realización particularmente preferida, que permite aumentar la acumulación del complejo Cu-GSH intracelular, el medio nutritivo líquido comprende adicionalmente ATP (adenosina trifosfato) y acetilfosfato. La concentración preferida de ATP está entre 2 y 5 mM, siendo preferentemente de 2,5 mM. La concentración preferida de acetilfosfato está entre 5 y 50 mM, siendo preferentemente de 20 mM.

20 El cultivo de las células de levadura en el medio nutritivo líquido con el fin de alcanzar una acumulación de Cu-GSH intracelular se lleva a cabo a una temperatura comprendida preferentemente entre 25 y 40 °C y en un pH comprendido preferentemente entre 3 y 9.

25 Antes del paso al medio nutritivo líquido, las células de *Saccharomyces cerevisiae* pueden opcionalmente precultivarse en condiciones aeróbicas adecuadas para favorecer la proliferación celular, con la intención de incrementar la cantidad de biomasa. Estas condiciones de crecimiento son bien conocidas por el experto en la materia y se describen en, por ejemplo, [4,5].

30 Las células de levadura usadas en el procedimiento de la invención son, preferentemente, células de *Saccharomyces cerevisiae* en forma comprimida, tales como las presentes comercialmente en la levadura de panadero. Es preferible usar una levadura osmo-tolerante, tal como la comercializada por la marca "La Parisienne OSMO", que tiene la propiedad de aguantar concentraciones de azúcares superiores al 17%. El uso de levadura osmo-tolerante para obtener una biomasa que tiene un contenido intracelular de Cu-GSHA superior a 1,5% de peso seco, preferentemente superior al 2% de peso seco.

35 Sometiendo la levadura osmo-tolerante a adaptación en medio con concentraciones crecientes de acetato de cobre, los inventores han obtenido dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* osmo-tolerante capaz de acumular cantidades particularmente altas del complejo Cu-GSH dentro de la célula (superior al 2% de peso seco, preferentemente superior al 3% de peso seco, todavía más preferentemente superior al 4% de peso seco) y, por tanto, particularmente adecuadas para usar en el procedimiento de la invención. Muestras de estas cepas, denominadas SA 221 BM y SA 586 BM se han depositado según el Tratado de Budapest con el *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ), con los números de acceso DSM 21530 y DSM 21531, respectivamente, el 6 de junio de 2008.

40 Los siguientes ejemplos se proporcionan a efectos únicamente ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

### **EJEMPLO 1**

45 Células de levadura (*S. cerevisiae*), disponibles comercialmente como levadura de panadero en forma comprimida, se resuspendieron (10% peso/volumen) en una solución que contiene (g/l): glucosa 80, sulfato amónico 7, sulfato de magnesio 0,5, citrato sódico 10, cisteína 4, glicina 4, acetato de cobre (1,5 y 2,5 mM para comparar). La mezcla se incubó a 30 °C en matraces de 100 ml, que contienen 10 ml de la suspensión, durante un tiempo total de 40 horas. Las muestras se recogieron en intervalos de tiempo de 24, 48 y 72 horas y se analizó el contenido de GSH y del complejo Cu-GSH.

50 Con el fin de determinar la concentración intracelular de GSH en la forma reducida y/o de complejo Cu-GSH, se sometió a las células a tratamiento mediante permeabilización térmica usando el procedimiento que se describe a continuación [1].

55 En breve, una muestra de 1 ml se sometió a centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se sometió a análisis HPLC para determinar el GSH y el complejo Cu-GSH a nivel extracelular. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de ácido ascórbico 0,5 g/l en agua de calidad para HPLC ultrapura, se trató a 100 °C durante 15 minutos, se enfrió en hielo y se centrifugó a 12.000 rpm durante 12 minutos. El residuo sólido, consistente en las células vacías, se eliminó, mientras que la materia permeabilizada se sometió a análisis HPLC para determinar el GSH y el complejo Cu-GSH a nivel intracelular. La evaluación cuantitativa para GSH y los conjugados se realizó usando el sistema HPLC con un detector de UV a 210 nm usando una columna Purospher® end-capped RP-18 (250-4) mm (Merck) con termostato a 30 °C, y se eluyó con 25 mM de una solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a un pH de 3,5, a 0,3 ml min<sup>-1</sup> [6].

60 Los resultados se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1

Acetato de Cu (mM)	GSH (% peso seco)			Cu-GSH ((% peso seco)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Control	0,1	0,8	0,9	-	-	-
1,5	0,1	0,2	0,6	0,1	1,1	1,2
2,5	0,1	0,2	0,5	< 0,1	1,2	1,5

**EJEMPLO 2**

5 Células de levadura *S. cerevisiae* osmo-tolerante en forma comprimida (La Parisienne OSMO) se resuspendieron (10% peso/volumen) en una solución que contiene (g/l): glucosa 80, sulfato amónico 7, sulfato de magnesio 0,5, citrato sódico 10, cisteína 4, glicina 4, acetato de cobre (0,5 y 1,5 mM para comparar). La mezcla se incubó a 30 °C en matraces de 100 ml, que contienen 10 ml de la suspensión, durante un tiempo total de 72 horas. Las muestras se recogieron a las 24, 48 y 72 horas y se sometieron a tratamiento de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. La evaluación analítica se llevó a cabo en las mismas condiciones.

10 Los resultados se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2

Cu (mM)	GSH (% peso seco)				Cu-GSH (% peso seco)			
	T0	24 h	48 h	72 h	T0	24 h	48 h	72 h
Control	1,1	-	-	1,4	-	-	-	-
0,5	1	0,8	1,2	2,0		1,0	1,8	2,1
1,5	1,1	0,7	1,0	1,9		1,1	1,7	2,5

**EJEMPLO 3**

15 Células de levadura *S. cerevisiae* comercial se usaron al 5% (peso/volumen) en un fermentador de 20 l (15 l volumen de trabajo), en el que a la solución de reacción del Ejemplo 1 se añaden 2,5 mM de ATP y 20 mM de acetilfosfato, tras un reacción de 24 horas. La reacción se realizó a 30 °C con aireación a 1 vvm y agitación a 400 rpm.

Los resultados se exponen en la Tabla 3.

Tabla 3

Cu (mM)	GSH (% peso seco)				Cu-GSH (% peso seco)			
	T0	24 h	48 h	72 h	T0	24 h	48 h	72 h
Control	0,5	0,8	1,5	1,8	-	-	-	-
1,5	0,5	0,9	1,6	1,7	-	1,3	1,9	2,3
2,5	0,5	0,9	1,5	1,8	-	1,4	2,0	2,7

20

**EJEMPLO 4**

25 Células de levadura *S. cerevisiae* SA 221 BM (número de acceso DSM 21530, fecha de presentación 6 de junio de 2008) se cultivaron en un fermentador de 20 l (15 l volumen de trabajo), de acuerdo con el procedimiento industrial (medio que contiene melazas 80 g/l, sulfato amónico 8 g/l, sulfato de magnesio 0,5 g/l, temperatura 30 °C, aireación a 1 vvm y agitación a 300 rpm, sobrepresión a 0,2 bares). La biomasa se recolectó mediante centrifugación y después se usó para el enriquecimiento en cobre usando una concentración celular del 5% (p/v) y el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 2. Las muestras se sometieron a tratamiento de acuerdo con el procedimiento expuesto en el Ejemplo 1. La evaluación analítica se llevó a cabo en las mismas condiciones.

30 Los resultados se exponen en la Tabla 4.

Tabla 4

Cu (mM)	GSH (% peso seco)			Cu-GSH (% peso seco)		
	T0	48 h	72 h	T0	48 h	72 h
Control	0,4	0,5	0,6	--	-	-
0,5	0,4	0,1	0,9	-	1,7	2,3
1,5	0,4	0,9	1,3	-	2,2	3,1

5 Se recogieron alícuotas tras 72 horas de reacción de la mezcla de reacción preparada usando 1,5 mM de sal de cobre (3,1% en peso seco del complejo Cu-GSH), se sometieron a rotura celular mediante ultrasonidos con el fin de  
 10 cuantificar el contenido de cobre intracelular mediante absorción atómica. El procedimiento usado se ilustra a continuación en el presente documento. Brevemente, una muestra de 10 ml se sometió a centrifugación a 10.000 durante 10 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 5 ml de tampón de lisis (tampón de lisis (g/l): Tris-HCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 1 mM, 5% (v/v) de glicerol, sulfato amónico 0,3 M, pH 7,6, agua de calidad ultrapura para HPLC), se sometió a ultrasonidos en hielo durante 8 ciclos de 30 segundos y, por último, se centrifugó a 20.000 rpm  
 15 durante 30 minutos. Los residuos celulares se eliminaron, la materia permeabilizada se analizó mediante absorción atómica. El análisis de absorción atómica mostró un contenido intracelular de 50  $\mu$ moles de la muestra de Cu-GSH/ml, que corresponde a 1,00 mmol de Cu-GSH/g ss.

### EJEMPLO 5

15 Células de levadura *S. cerevisiae* SA 221 BM (número de acceso DSM 21530, fecha de presentación 6 de junio de 2008) se fermentaron en un fermentador de 20 l (15 l volumen de trabajo), de acuerdo con el procedimiento industrial (medio que contiene melazas 80 g/l, sulfato amónico 8 g/l, sulfato de magnesio 0,5 g/l, temperatura 30 °C, aireación a 1 vvm, agitación a 300 rpm, sobrepresión a 0,2 bares). La biomasa se recolectó mediante centrifugación y después se usó (5% en peso/volumen del contenido celular) para el enriquecimiento en cobre usando una solución  
 20 que contiene (g/l): glucosa 80, sulfato amónico 7, sulfato de magnesio 0,5, citrato sódico 10, cisteína 4, glicina 4, serina 4, acetato de cobre 0,5 y 1,5 mM. 24 horas después se añadieron 2,5 mM de ATP y 20 mM de acetilfosfato. La mezcla se incubó a 30 °C en un fermentador de 15 l con un volumen de trabajo de 10 l, agitando a 150 rpm, con aireación a 1 vvm y manteniendo el pH a 6,5 durante un tiempo de reacción total de 72 horas.

Los resultados se exponen en la Tabla 5.

Tabla 5

Cu (mM)	GSH (% peso seco)				Cu-GSH (% peso seco)			
	T0	24 h	48 h	72 h	T0	24 h	48 h	72 h
Control	0,9	-	1,1	1,4	-	-	-	-
0,5	0,9	1,1	2,0	2,4	-	1,3	2,5	3,4
1,5	0,9	1,0	2,1	2,3	-	1,5	3,1	4,2

25 El análisis de absorción atómica de la muestra sonicada obtenida con 1,5 mM de Cu tras 72 horas de incubación (4,2% en peso seco de Cu-GSH) mostró un contenido intracelular de 76  $\mu$ moles de Cu-GSH/ml de muestra, correspondiente a 1,52 mmoles de Cu-GSH/g de ss.

### EJEMPLO 6

30 Como en el Ejemplo 5, pero con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* SA 586 BM (DSM 21531 depositada el 6 de junio de 2008).

Los resultados se exponen en la Tabla 6.

Tabla 6

Cu (mM)	GSH (% peso seco)				Cu-GSH (% peso seco)			
	T0	24 h	48 h	72 h	T0	24 h	48 h	72 h
Control	0,8	1,3	1,7	2,3	-	-	-	-
1,5	0,8	1,2	1,6	2,2	-	1,4	2,9	3,7
2,5	0,8	1,2	1,7	2,1	-	1,4	3,3	4,5

**EJEMPLO 7**

5 Levadura *Saccharomyces cerevisiae* SA 221 BM (DSM 21530 depositada el 6 de junio de 2008). La biomasa fermentada y recogida como en el Ejemplo 5 se resuspendió en 5% (peso/volumen) para enriquecimiento en cobre en un fermentador de 20 l (15 l volumen de trabajo), en una solución que contiene (g/l): glucosa 125, lactosa 10, sulfato amónico 7, sulfato de magnesio 0,5, citrato sódico 10, cisteína 4, glicina 4, serina 4 y acetato de cobre 1,5. 24 horas después se añadieron 2,5 mM de ATP y 20 Mm de acetilfosfato. Las condiciones son las del Ejemplo 5.

Los resultados se exponen en la Tabla 7.

Tabla 7

Cu (mM)	GSH (% peso seco)				Cu-GSH (% peso seco)			
	T0	24 h	48 h	72 h	T0	24 h	48 h	72 h
Control	0,8	1,1	1,3	1,3	-	-	-	-
1,5	0,8	1,0	1,4	2,4	-	1,8	3,3	4,9

10 **BIBLIOGRAFÍA**

[1] Rollini, M., Pagani, H., Riboldi, S., Manzoni, M. Influence of carbon source on glutathione accumulation in methylotrophic yeasts. *Ann Microbiol* 2005; 55: 199-203.

[2] Penninckx, M. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enz Microb Technol* 2000; 26: 737-42.

15 [3] Rollini, M., Manzoni, M. Influence of different fermentation parameters on glutathione volumetric productivity by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Biochem* 2006; 41: 1501-1505.

[4] Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology – Second Edition (Demain and Davies ed.), American Society for Microbiology (1999), pp 213-235.

[5] Manzoni M. *Microbiologia Industriale* (Edizioni CEA) (2006), pp. 220-224.

20 [6] Jimenez, I., Speisky, H. Effect of copper ions on the free radical-scavenging properties of reduced glutathione: implications of a complex formation. *J Trace Elements Med Biol* 2000; 14: 161-7

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para preparar una biomasa de levadura enriquecida en cobre, que se caracteriza por las etapas:
  - 5 (i) cultivar células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa SA 221 BM depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM 21530 el 6 de junio de 2008 o la cepa SA 586 BM depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM 21531 el 6 de junio de 2008, en un medio nutritivo líquido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, al menos un aminoácido y una sal de cobre, de modo que se obtenga una biomasa de levadura enriquecida con cobre en forma de un complejo de Cu-GSH en la que el contenido intracelular del complejo Cu-GSH es superior al 1% en peso seco; y
  - 10 (ii) separar del medio nutritivo líquido la biomasa de levadura enriquecida con cobre obtenida en la etapa (i).
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae* osmo-tolerante en forma comprimida.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la sal de cobre es acetato de cobre.
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio nutritivo líquido contiene la sal de cobre a una concentración comprendida entre 0,1 y 3 mM.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el medio nutritivo líquido comprende ATP y acetilfosfato.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa (i) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 25 y 40 °C y a un pH comprendido entre 3 y 9.
- 20 7. Una biomasa enriquecida en cobre, que consiste en células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que tienen un contenido intracelular del complejo cobre-glutación (Cu-GSH) superior al 1% en peso seco, en la que las células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* se seleccionan de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* SA 221 BM depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM 21530 el 6 de junio de 2008 y la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* SA 586 BM depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM 21531 el 6 de
- 25 junio de 2008,.
8. La biomasa de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el contenido intracelular del complejo Cu-GSH es superior al 3% en peso seco.
9. Una composición que tiene actividad probiótica, que comprende una biomasa de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.
- 30 10. Una preparación alimentaria, un suplemento alimentario, un producto dietético, un alimento funcional, un producto nutracéutico, un producto cosmético o un producto cosmeceútico, que comprende una composición probiótica de acuerdo con la reivindicación 9.