

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 318**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12P 7/66** (2006.01)

**A23C 9/123** (2006.01)

**A23L 1/302** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2007 E 07820928 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2076585**

54 Título: **Procedimiento de cultivo para favorecer la producción de vitamina K2 por las bacterias lácticas y sus aplicaciones en la preparación de productos alimenticios**

30 Prioridad:

**04.10.2006 FR 0608692**

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

**24.11.2014**

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)  
17, BOULEVARD HAUSSMANN  
75009 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**GARAULT, PEGGY;  
QUERE, GAËLLE;  
CATONNET, GUILLAUME;  
LAMICHE, CHANTAL y  
FAURIE, JEAN-MICHEL**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 523 318 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

Procedimiento de cultivo para favorecer la producción de vitamina K2 por las bacterias lácticas y sus aplicaciones en la preparación de productos alimenticios.

5 La presente invención se refiere al campo de los productos alimenticios ricos en nutrientes, vitaminas y/u oligoelementos para mejorar el contenido y el equilibrio cualitativo y cuantitativo de la aportación de nutrientes en el ser humano.

10 Diferentes procedimientos industriales que utilizan micro-organismos permiten producir unos metabolitos secundarios a gran escala (Demain AL. *et al*, Science 1981)

La invención se interesa en los medios para enriquecer los alimentos con vitamina K.

15 De manera más precisa, la presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar la cantidad de vitamina K2 obtenida al cultivar por lo menos una cepa de bacteria láctica productora de vitamina K2, en el que dicha cepa se cultiva en unas condiciones de "resting cells", de tal manera que la cantidad de vitamina K2 producida por el cultivo de célula en "resting cells" es superior, en un factor por lo menos igual a aproximadamente 1,2, a la obtenida al cultivar dicha cepa en unas condiciones de fermentación estándar.

20 Además, la presente invención se refiere a la biomasa obtenida de un cultivo de una bacteria láctica productora de vitamina K2 de acuerdo con el procedimiento anterior.

25 La invención también se refiere a un procedimiento para producir vitamina K2, a unos procedimientos para preparar productos alimenticios, en particular productos fermentados y/o productos lácteos frescos, enriquecidos en vitamina K2, así como a los productos alimenticios así obtenidos.

30 La vitamina K es una vitamina soluble en grasa que se presenta en dos formas naturales: vitamina K1 (o filoquinona) y vitamina K2 (o menaquinona)

La vitamina K1 es sintetizada por las plantas. Se encuentra principalmente en los vegetales verdes (vegetales con hojas) y el aceite de soja.

35 La vitamina K1 actúa de manera más directa en el proceso de coagulación de la sangre.

La vitamina K2, por su parte, está producida por las bacterias de la flora intestinal. También aparece en pequeñas cantidades en ciertos alimentos después de la fermentación (queso, productos asiáticos típicos tales como el miso y el natto Japonés, a base de soja fermentada, etc.). Muchas bacterias son capaces de sintetizar la vitamina K2. De esta manera, además de las bacterias de la flora intestinal y, en particular, las especies *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Bacteroides* spp., se pueden citar ciertas especies o subespecies de bacterias lácticas tales como *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Propionibacterium* sp. La cantidad de vitamina K2 sintetizada por estas bacterias generalmente varía de 29 a 90 µg/l aproximadamente de leche fermentada (Morishita *et al.*, 1999). Es importante acentuar que las mediciones de producción de vitamina K2 generalmente se realizan a partir de liofilizados de residuos celulares y los resultados de estas mediciones revelan una gran heterogeneidad de los niveles de producción en función de las cepas probadas, pudiendo incluso triplicarse (Morishita *et al.*, 1999; Parker *et al.*, 2003). En términos de actividad biológica, la vitamina K2 es conocida sobre todo por su acción en la calcificación de los tejidos suaves.

50 La vitamina K ha sido descrita inicialmente por su papel esencial en el proceso de coagulación de la sangre. De esta manera, grandes deficiencias en vitamina K provocan hemorragias, con alargamiento anormal del tiempo de coagulación, y equimosis. Se ha creído durante mucho tiempo que las grandes deficiencias en vitamina K eran más bien raras en el adulto, pudiendo estar las necesidades cubiertas en principio de manera satisfactoria por una dieta variada y equilibrada y gracias a la producción endógena de la vitamina por bacterias cólicas. A este respecto, las personas en riesgo son típicamente:

- 55
- los recién nacidos, cuyos intestinos no tienen al nacer las bacterias productoras de vitamina K;
  - las personas cuyas funciones hepáticas, biliares o intestinales están perturbadas (enfermedades hepáticas, mucoviscidosis, colitis, disenterías, etc.); y,
  - 60 - quienes toman antibióticos a largo plazo.

De manera más reciente, se descubrió que el impacto de la vitamina K en la salud del ser humano no se limitaba a su papel en los mecanismos de coagulación sanguínea. De hecho, desde los años 80, la vitamina K también se ha reconocido por su papel en el metabolismo óseo (Hart *et al.*, 1984; Hart *et al.*, 1985).

Esta vitamina juega el papel de cofactor en una reacción enzimática que condiciona la actividad de la osteocalcina en el contexto de regulación de formación ósea (Hauschka PV *et al.*, 1989; Ducy P *et al.*, 1996). Su papel de manera más precisa consiste en condicionar la carboxilación de la osteocalcina, una proteína clave que regula el proceso de formación ósea. En el caso de deficiencia de vitamina K, esta reacción no tiene lugar, provocando un aumento en la proporción sanguínea entre osteocalcina descarboxilada y osteocalcina carboxilada (Väänänen *et al.*, 1999).

La evolución demográfica en los países occidentales se ha traducido en un envejecimiento progresivo de la población, asociado consecuentemente a un aumento de la prevalencia de las patologías degenerativas, en particular de la osteoporosis. Por esta razón, la osteoporosis se reconoce desde entonces como un problema principal de salud pública.

Las estimaciones demográficas establecidas en los años 90 hicieron sonar la alarma al prever un aumento considerable de la incidencia de esta patología en los siguientes 50 años, en particular entre los de más edad. De esta manera se impuso rápidamente la necesidad y la urgencia de emprender acciones para prevenir esta patología, hasta entonces raramente investigada y tratada de manera tardía.

Desde entonces, se ha reconocido que la prevención de la osteoporosis debe comenzar en la infancia, a través de un crecimiento óseo óptimo, y continuar toda la vida manteniendo la masa ósea. Se sabe que los factores nutricionales juegan un papel importante en el desarrollo y el mantenimiento del patrimonio óseo. Hasta ahora, las estrategias nutricionales contempladas o propuestas para prevenir la osteoporosis recaen principalmente en dos factores clave que son el calcio y la vitamina D. Sin embargo, se sabe en la actualidad que otros factores nutricionales podrían ser de importancia notable.

Debido a su papel principal en la formación ósea, la vitamina K aparece cada vez más en la bibliografía como una vía prometedora para conservar la salud ósea del ser humano a lo largo de toda su vida.

Las aportaciones nutricionales recomendadas de vitamina K en el ser humano (1,5 µg/d/kg de peso) se han establecido teniendo en cuenta solamente su papel en los fenómenos de coagulación. Ahora bien, unos estudios recientes sugieren que estas aportaciones nutricionales recomendadas se subestiman finalmente si se tiene en cuenta asimismo la actividad de vitamina K en el metabolismo óseo (Ronden *et al.*, 1998).

Aunque todavía se desconocen las necesidades de vitamina K, no por ello es menos cierto que una baja aportación está asociada a una baja masa ósea y a un riesgo aumentado de fracturas en el adulto (Hart *et al.*, 1985; Knapen *et al.*, 1989; Szulc *et al.*, 1993; Booth *et al.*, 2000). Además, los estudios de intervención en las mujeres menopáusicas mostraron que la vitamina K podía permitir disminuir las pérdidas óseas en este grupo objetivo (Shiraki *et al.*, 2000; Braam *et al.*, 2003). Por último, unos estudios en animales sugieren que podría jugar un papel favorable durante el pico de masa ósea y esto, aún mejor en caso de asociación sinérgica con la vitamina D. Sin embargo, los estudios que claramente conectan la vitamina K y el crecimiento óseo se han emprendido en la actualidad solamente en animales.

Además, unos estudios recientes han proporcionado unos argumentos adicionales en favor del impacto de la vitamina K en el metabolismo óseo y, en particular, en la constitución y la preservación de la masa ósea (Booth *et al.*, 2000; Shiraki *et al.*, 2000; Braam *et al.*, 2003; Hirano e Ishi, 2002).

Contrariamente al adulto, pocos datos están disponibles con respecto a los efectos benéficos de la vitamina K en EL metabolismo óseo del niño. Solamente se sabe que es esencial optimizar la masa ósea durante el periodo de crecimiento, para constituir una reserva ósea máxima y proteger al adulto contra el riesgo de osteoporosis futura.

En cualquier caso, se desprende del conjunto de los datos disponibles hasta la fecha que la mejora del contenido de vitamina K de los productos alimenticios es una vía particularmente interesante y prometedora para permitir que el individuo construya y mantenga una buena constitución ósea.

En este contexto, ya existen productos industriales en el mercado de alimentos que contienen una cantidad notable de vitamina K. Se pueden citar en particular algunos productos lácteos que contienen bacterias lácticas, tales como "Petits Gervais aux Fruits" vendidos en Francia por el Solicitante. Sin embargo, se debe observar que, por un lado, el contenido de vitamina K de estos productos depende generalmente del tipo de fermentos utilizados y, por el otro lado, las cepas de *Lactococcus lactis* utilizadas típicamente en los productos lácteos no producen una cantidad suficiente de vitamina K para satisfacer verdaderamente las necesidades de la población, o incluso ayudar a mitigar posibles deficiencias de vitamina K.

Existe por lo tanto una necesidad en la técnica actual de unos productos alimenticios, en particular unos productos fermentados y/o unos productos lácteos frescos, que contienen vitamina K en cantidades suficientes para ayudar a satisfacer las necesidades, y si es necesario, para satisfacer las deficiencias, tanto en el niño y el adolescente, así como en el adulto y en las personas mayores.

En la continuación de la descripción, los términos "vitamina K2" y "vitamina K" se utilizan de manera indiferente para

designar la vitamina K2.

La presente invención prevé por lo tanto responder a esta necesidad proponiendo por primera vez preparar productos alimenticios, tales como productos fermentados y/o productos lácteos frescos, en los que los fermentos capaces de producir la vitamina K se utilizan en condiciones que favorecen sustancialmente la producción de vitamina K en comparación con las condiciones de producción tradicionales.

Además, en el curso de sus estudios, los inventores obtuvieron nuevas variantes naturales de cepas naturales de bacterias lácticas, productoras de unas cantidades de vitamina K significativamente superiores a las producidas por las cepas naturales de las cuales se derivan (véase la sección "Ejemplos" a continuación). De esta manera, se podrán utilizar ventajosamente estas variantes "sobreproductoras" de vitamina K en unas condiciones de utilización particularmente favorables para la producción de vitamina K que constituyen el objeto de la presente invención.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar la cantidad de vitamina K2 obtenida al cultivar por lo menos una cepa de bacteria láctica productora de vitamina K2, en el que dicha cepa se cultiva en unas condiciones de "resting cells", comprendiendo dicho procedimiento por lo menos:

- a) el precultivo de dicha cepa en unas condiciones de respiración, en un medio de precultivo apropiado que contiene por lo menos una porfirina a una concentración final de por lo menos 0,5 µg/ml;
- b) la inoculación de un medio de cultivo adecuado que contiene por lo menos 0,5% de materia grasa con una cantidad de células bacterianas vivas que varía de  $10^8$  a  $10^{11}$  ufc/ml aproximadamente; y,
- c) la fermentación del medio así inoculado durante un periodo que varía de 4 a 48 horas aproximadamente, preferentemente que varía de 8 a 48 horas aproximadamente, a una temperatura que varía de 4 a 50°C aproximadamente, preferentemente que varía de 4 a 40°C aproximadamente, de tal manera que al final de la etapa c) la cantidad de vitamina K2 producida por el cultivo en "resting cells" es superior, en un factor por lo menos igual a aproximadamente 1,2, a la obtenida cultivando dicha cepa en unas condiciones de fermentación estándar.

La expresión "cultivo en "resting cells" o cultivo en unas condiciones de "resting cells" forma parte del lenguaje común en el campo técnico de la presente invención. El concepto de "resting cells" es de esta manera perfectamente claro para el experto en la materia. En Francia, los expertos en la materia comprenden y utilizan habitualmente los términos "resting cells", que no necesitan por lo tanto ser traducidos. Se precisa útilmente que una traducción francesa apropiada pero poco utilizada de los términos "resting cells" es "cellules non proliférantes"

Las "condiciones de fermentación estándar" son, como su nombre indica, muy habituales y bien conocidas por el experto en la materia (se habla asimismo de "condiciones de laboratorio"). Las "condiciones de fermentación estándar" preferidas en el contexto de la presente invención son las siguientes: se precultiva la cepa en medio comercial M17 (Difco™ Agar M17) o en un medio equivalente, complementado con 20 µl/ml de 0,5 mg/ml de solución de hemina en sosa 0,1 M. Para el siguiente cultivo, la inoculación se lleva a cabo al 1% utilizando el precultivo. La temperatura de incubación es aproximadamente 30°C. La aeración se asegura por simple agitación. Las condiciones de fermentación pueden modificarse según sea necesario por el experto en la materia, en base a su conocimiento general y, eventualmente, después de los experimentos rutinarios de puesta a punto. Sin embargo, se procurará conservar de manera sistemática los siguientes tres criterios esenciales: (i) el medio de cultivo es un medio adecuado para cultivar las cepas de bacterias lácticas, en particular las cepas de *Lactococcus* spp.; (ii) por lo menos un compuesto que contiene un núcleo hémico (por ejemplo, hemina, catalasa o derivados de clorofila) se añade al medio de precultivo y/o de cultivo (preferentemente a la vez en el medio de precultivo y en el medio de cultivo); y (iii) el precultivo y/o cultivo (preferentemente, precultivo solamente) se realiza(n) bajo agitación.

Unos modos de realización particulares del procedimiento según la invención son tales como:

- en la etapa b), el medio de cultivo se inocula con una cantidad de células bacterianas vivas que varía de  $5 \cdot 10^8$  a  $10^{10}$  ufc/ml aproximadamente, más particularmente que varía de  $2 \cdot 10^9$  a  $6 \cdot 10^9$  ufc/ml aproximadamente;
- en la etapa c), la fermentación del medio se lleva a cabo en unas condiciones estándar durante un periodo que varía de 12 a 36 horas aproximadamente, preferentemente de 15 a 24 horas aproximadamente ;
- en la etapa c), la fermentación del medio se lleva a cabo en las condiciones estándar a una temperatura que varía de 15 a 35°C, preferentemente de 20 a 30°C aproximadamente.

Preferentemente, al final de la etapa c), la cantidad de vitamina K2 producida por el cultivo en "resting cells" es superior, en un factor por lo menos igual a aproximadamente 1,5, a la obtenida cultivando dicha cepa en unas condiciones de fermentación estándar. Este factor es más preferentemente por lo menos igual a aproximadamente 1,7, más preferentemente aún por lo menos igual a aproximadamente 1,8, y más preferentemente aún por lo menos

igual a aproximadamente 1,9. Unos valores aún más preferidos de este factor son de aproximadamente 2; 2,2; 2,4; 2,5; 2,7; 2,8; 2,9; 3.

Se busca así alcanzar preferentemente, gracias a los medios de la invención, unos niveles de producción de vitamina K2 del orden de 30 µg de vitamina K2 por 100 g de leche fermentada en unas condiciones de fermentación estándar. Mejor, los niveles de producción pueden alcanzar aproximadamente 40 µg de vitamina/100 g de leche fermentada, y, aún más preferentemente, pueden ser aproximadamente, o incluso exceder, aproximadamente 45 o 50 µg de vitamina K2/100 g de leche fermentada. De esta manera, se prefieren en particular unos niveles de producción de aproximadamente 55, 60, 65, 70, o 75 µg de vitamina K2/100 g de leche fermentada, o incluso más.

Según un modo de realización, la cepa de bacteria láctica productora de vitamina K2, utilizada en el contexto del procedimiento de la invención, se selecciona de entre los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Propionibacterium*. En particular, la cepa de bacteria láctica utilizada se selecciona de entre las especies *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Enterococcus faecium*, y *Propionibacterium* sp. Ventajosamente, la cepa de bacteria láctica se selecciona de entre las variantes naturales de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* productoras de vitamina K2 obtenidas por los inventores en el contexto de los trabajos reportados en los Ejemplos a continuación: la variante I-3557 depositada en la *Collection Nationale de Culture des Microorganismes* (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, Francia) el 20/01/2006, la variante I-3558 depositada en la CNCM el 20/01/2006 y la variante I-3626 depositada en la CNCM el 19/06/2006.

Aquí, el término "variantes" comprende en la presente memoria:

- las variantes naturales, es decir las obtenidas de manera espontánea a partir de una cepa de bacteria láctica de referencia bajo el efecto de una presión de selección; las variantes naturales no experimentan así ninguna manipulación genética, sino que se obtienen principalmente por mutación y selección a partir de la cepa de referencia; y
- los mutantes que comprenden una o varias mutaciones en su genoma, que han sido inducidas por ingeniería genética, es decir por técnicas de mutagénesis dirigida, en particular por transformación genética con la ayuda de vectores, aplicadas a la cepa de referencia.

En todos los casos, las "variantes" son, en el contexto de la invención, unas cepas capaces de producir vitamina K2. Ventajosamente, si el nivel de producción es de por lo menos aproximadamente 5,5 µg de vitamina K2 por 100 g de leche fermentada en unas condiciones de fermentación estándar (también llamadas "condiciones de laboratorio"), se podrá hablar de variante "sobrepadora" de vitamina K2.

Debe observarse que, en ciertos países (en particular en Europa), los fabricantes de alimentos deben tomar precauciones cuando desarrollan unos productos destinados al consumo humano y/o animal, en los cuales se incorporan unos microorganismos, más particularmente unos microorganismos vivos. De hecho, los organismos (en este caso, microorganismos) genéticamente modificados (GMO o mutantes) pueden suscitar un sentimiento de temor y de aprensión en los consumidores. Esta imagen negativa que sufren los GMO en ciertos países es tal que el público tiende a "boicotear" los alimentos que contienen GMO. Por eso, en un contexto en el que los consumidores exigen siempre más transparencia en los niveles del contenido de los productos alimenticios que les son propuestos y del origen de los ingredientes contienen que estos productos, los fabricantes pueden llegar a proponer productos que son casi exclusivamente, incluso exclusivamente, sin GMO. En el contexto de la presente invención, puede ser ventajoso por lo tanto que los productos alimenticios procedentes de la industria y que contienen unos microorganismos se preparen utilizando exclusivamente cepas naturales o variantes naturales de cepas naturales.

En la etapa b), el medio de cultivo adecuado contiene por lo menos aproximadamente 0,5% de grasa, preferentemente por lo menos aproximadamente 1,5%, más preferentemente aún por lo menos aproximadamente 3,5% de materia grasa. Un medio de este tipo, por ejemplo, puede ser a base de crema láctea o de soja. También puede ser leche sola o leche cuyo poder tampón ha aumentado. Muy evidentemente, también se pueden prever las combinaciones de estos diferentes medios. A título de ejemplos de "leche con poder tampón aumentado" se citarán en particular una leche complementada con β-glicerofosfato y/o citrato y/o proteínas de leche y/o cualquier ingrediente alimenticio adecuado provisto de un poder tampón.

Por ejemplo, una leche semi-desnatada contiene típicamente aproximadamente 1,5% de grasa; una leche entera contiene generalmente aproximadamente 3,5% de grasa.

El procedimiento objeto de la presente invención comprende una etapa preliminar a la etapa b), que consiste en precultivar la cepa en unas condiciones de respiración, en un medio de precultivo adecuado que contiene por lo menos una porfirina a una concentración final de por lo menos aproximadamente 0,5 µg/ml. Unas concentraciones y/o gamas de concentraciones de porfirina todavía más preferidas son de por lo menos aproximadamente 1 µg/ml, mejor de por lo menos aproximadamente 5 µg/ml, y mejor aún de por lo menos aproximadamente 10 µg/ml.

El documento WO 2000/05342 describe un procedimiento en el que se cultivan unas cepas bacterianas en presencia de porfirina. Sin embargo, esta solicitud no sugiere que esta etapa permita aumentar la producción de vitamina K2 en bacterias lácticas.

- 5 Ventajosamente, el precultivo se incuba a una temperatura que varía de 4 a 40°C aproximadamente, preferentemente a una temperatura que varía de 18 a 35°C aproximadamente, con un valor preferido de aproximadamente 30°C.

10 El tiempo de incubación del precultivo puede variar en función de las cepas y de las demás condiciones de utilización. Preferentemente, es de por lo menos aproximadamente 8 horas, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 12 horas, y aún más preferentemente de por lo menos aproximadamente 16 horas.

La oxigenación del precultivo se puede realizar por agitación o aeración.

- 15 También se puede realizar una etapa intermedia entre la etapa de precultivo preliminar y etapa b) del procedimiento objeto de la presente invención. Esta etapa intermedia consiste en concentrar la biomasa obtenida al final del precultivo, por ejemplo por centrifugación del precultivo seguida por la recuperación del residuo bacteriano.

20 Debe observarse que, teniendo en cuenta las aplicaciones del objeto de la presente invención en el campo alimentario, se utilizarán preferentemente las condiciones que son a la vez (i) aplicables y explotables a escala industrial (en términos de factibilidad, rendimiento, coste, equipo, etc.), y (ii) adecuadas para productos alimenticios (en términos de propiedades físicas y organolépticas de los productos terminados (sabor, olor, textura, apariencia, etc.)).

- 25 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a la biomasa enriquecida que se puede obtener mediante el cultivo de por lo menos una cepa de bacteria láctica productora de vitamina K2 en unas condiciones de "resting cells" de acuerdo con el procedimiento previamente descrito.

30 En un tercer aspecto de la presente invención, se utiliza la biomasa arriba mencionada para preparar un producto alimenticio enriquecido con vitamina K2.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para producir vitamina K2, que comprende por lo menos:

- 35 a) la realización del procedimiento para aumentar la cantidad de vitamina K2 obtenida cultivando por lo menos una cepa de bacteria láctica productora de vitamina K2, de acuerdo con la descripción anterior; y,  
b) la recuperación de la vitamina K2 así producida.

40 De acuerdo con un quinto aspecto, la presente invención se refiere a unos procedimientos para preparar un producto alimenticio enriquecido con vitamina K2, o para enriquecer un producto alimenticio con vitamina K2.

De acuerdo con un primer modo de realización, un procedimiento de este tipo comprende por lo menos:

- 45 a) producir vitamina K2 según el procedimiento del cuarto aspecto de la invención;  
b) añadir la vitamina K2 así producida a dicho producto alimenticio, o a una preparación intermedia del mismo;  
y,  
50 c) obtener dicho producto alimenticio enriquecido con vitamina K2.

De acuerdo con un segundo modo de realización, un procedimiento para preparar un producto alimenticio enriquecido con vitamina K2 comprende por lo menos:

- 55 a) cultivar por lo menos una cepa de bacteria láctica productora de vitamina K2 en unas condiciones de "resting cells" de acuerdo con el procedimiento para aumentar la cantidad de vitamina K2 obtenida a partir de un cultivo de esta cepa (primer aspecto de la invención);  
b) añadir la biomasa obtenida a partir del cultivo de la etapa a), a dicho producto alimenticio o a una preparación  
60 intermedia del mismo; y,  
c) obtener dicho producto alimenticio enriquecido con vitamina K2.

Alternativamente, se puede prever realizar simultáneamente las etapas a) y b) anteriores:

- 65 a) cultivar por lo menos una cepa de bacteria láctica productora de vitamina K2 en unas condiciones de "resting

cells" de acuerdo con el procedimiento para aumentar la cantidad de vitamina K2 obtenida a partir de un cultivo de esta cepa (primer aspecto de la invención), en dicho producto alimenticio o en una preparación intermedia del mismo; y,

- 5           b) obtener el producto alimenticio enriquecido con vitamina K2.

En este caso, la cepa o cepas se pueden utilizar en particular utilizando unos concentrados de bacterias precultivadas en el sitio (en el sitio de producción de los productos alimenticios), o utilizando unas bacterias precultivadas por un proveedor de fermentos, y después acondicionadas y enviadas al sitio o sitios de producción de los productos alimenticios. Los proveedores pueden acondicionar las bacterias en el estado fresco o congelado; alternativamente, las bacterias pueden ser secadas o liofilizadas. En todos los casos, las bacterias se añaden a la masa láctea de manera completamente convencional (como cualquier otro fermento láctico conocido). Para la etapa siguiente de cultivo en unas condiciones favorables para la producción de vitamina K2, se aplican las condiciones de realización de la presente invención.

15           Aún otro modo de realización de un procedimiento para enriquecer un producto alimenticio con vitamina K2 comprende por lo menos:

- 20           a) añadir la biomasa de acuerdo con la presente invención, a dicho producto alimenticio o a una preparación intermedia del mismo; y,

- b) obtener dicho producto alimenticio enriquecido con vitamina K2.

Típicamente, se utiliza la biomasa como un fermento láctico tradicional.

25           Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a un producto alimenticio enriquecido con vitamina K2 que se puede obtener mediante la realización de un procedimiento tal como se ha descrito arriba.

30           Alternativamente, un producto alimenticio enriquecido con vitamina K2 de acuerdo con la presente invención contiene la biomasa descrita arriba.

35           La invención se refiere a los productos alimenticios para el ser humano y/o el animal, con una preferencia por los productos destinados para la alimentación humana. Ventajosamente, un producto alimenticio de este tipo enriquecido con vitamina K2 refuerza la solidez de los huesos de la persona que lo consume. Preferentemente, esta persona es un niño.

40           Preferentemente, un producto alimenticio en el contexto de la invención se selecciona de entre los productos fermentados, los productos lácteos frescos fermentados o no, los productos a base de zumo de origen vegetal (frutas, vegetales, cereales, soja, etc.) fermentados o no, y sus combinaciones. De manera más particularmente preferida, un producto alimenticio en el contexto de la invención es un producto fermentado y/o un producto lácteo fresco.

45           En el contexto de la invención, los "productos lácteos frescos" designan más particularmente los productos lácteos frescos y fermentados, listos para el consumo humano, es decir unos alimentos lácteos frescos y fermentados. En la presente solicitud se prevén más particularmente las leches fermentadas y los yogures. Dichos alimentos lácteos frescos y fermentados pueden alternativamente ser quesos frescos o "petits-suisses".

50           A los términos "leches fermentadas" y "yogures" se les da las definiciones habituales utilizadas en la industria láctea, es decir productos que están destinados al consumo humano y que resultan de la fermentación láctica acidificante de un sustrato lácteo. Estos productos pueden contener unos ingredientes secundarios tales como frutas, plantas, azúcar, etc. Se puede hacer referencia, por ejemplo, al Decreto Francés no. 88-1203 del 30 de Diciembre de 1988 que se refiere a las leches fermentadas y al yogur, publicado en el Boletín Oficial de la República Francesa del 31 de diciembre de 1988.

55           También se puede hacer referencia al "Codex Alimentarius" (preparado por la Commission du Codex Alimentarius bajo el patrocinio de FAO y de la OMS, y publicado por la División de Información de la FAO, disponible en línea en <http://www.codexalimentarius.net>; véase más particularmente el volumen 12 del Codex Alimentarius "Normes Codex pour le lait et les produits laitiers" y la norma "CODEX STAN A-11(a)-1975").

60           La expresión "leche fermentada" se reserva así en la presente solicitud al producto lácteo preparado con un sustrato lácteo que ha experimentado un tratamiento por lo menos equivalente a la pasteurización, inoculado con unos microorganismos que pertenecen a la especie o a las especies característica(s) de cada producto. Una "leche fermentada" no ha experimentado ningún tratamiento para restar un elemento constitutivo del sustrato lácteo utilizado y en particular no ha experimentado ningún drenaje del coágulo. La coagulación de las "leches fermentadas" no se debe obtener por otros medios que los que resultan de la actividad de los microorganismos utilizados.

El término "yogur" se reserva por su parte, para la leche fermentada obtenida, según los usos locales y constantes, por el desarrollo de las bacterias lácticas termofílicas específicas denominadas *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que deben encontrarse vivas en el producto terminado, a razón de por lo menos 10 millones de bacterias por gramo aplicadas a la parte láctea.

En algunos países, la reglamentación autoriza la adición de otras bacterias lácticas en la producción de yogur, y en particular el uso adicional de cepas de *Bifidobacterium* y/o *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus casei*. Estas cepas lácticas adicionales están destinadas a conferir al producto terminado varias propiedades, tales como la de favorecer el equilibrio de la flora intestinal o la de modular el sistema inmunitario.

En la práctica, la expresión "leche fermentada" se utiliza por lo tanto generalmente para designar las leches fermentadas diferentes del yogur. Dependiendo del país, también puede llamarse, por ejemplo, "Kefir", "Kumiss", "Lassi", "Dahi", "Leben", "Filmjôlk", "Villi", "Acidophilus milk".

Al tratarse de leches fermentadas, la cantidad de ácido láctico libre contenida en el sustrato lácteo fermentado no debe ser inferior a 0,6 g por 100 g en el momento de la venta al consumidor, y el contenido de materia proteica aportado a la parte láctea no debe ser inferior al de una leche normal.

Por último, la denominación "queso fresco" o "petit suisse", en la presente solicitud, se reserva para un queso no afinado, no salado, y que ha experimentado una fermentación por bacterias lácticas solamente (y ninguna otra fermentación que la fermentación láctica). El contenido de materia seca de los quesos frescos puede disminuir hasta 15 g o 10 g por 100 g de queso fresco, ya sea su contenido en materias grasas superior a 20 g, o como máximo igual a 20 g por 100 g de queso fresco, después de desecación completa. El contenido en materia seca de un queso fresco está comprendido entre 13 y 20%. El contenido en materia seca de un petit suisse no es inferior a 23 g por 100 g de petit suisse. Generalmente está comprendido entre 25 y 30%. Los petits suisses generalmente están agrupados bajo la denominación "quesos frescos", utilizada de manera tradicional en el campo técnico de la presente invención.

Las siguientes figuras ilustran la presente invención, sin limitar por ello ni su objeto ni su alcance.

- Figura 1: Histograma que ilustra la influencia de la concentración de materia grasa de la leche en la producción de vitamina K2 por las bacterias lácticas. Cepas 1 y 2: ejemplos de cepas naturales de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.
- Figura 2: Ejemplos de cinética de producción de vitamina K2 en leche entera y de cinética de acidificación (marco superior izquierdo) para una cepa natural de bacteria láctica (cepa nº 1).
- Figura 3: Histograma que presenta la producción de vitamina K2 por unos cultivos en "resting cells" a diferentes temperaturas. Control: cultivo en unas condiciones de crecimiento estándar.
- Figura 4: Histograma que presenta la influencia de las condiciones de precultivo en la producción de vitamina K2 según las cepas.
- Figura 5: Gráfica que ilustra la influencia de la población bacteriana inicial de la variante natural I-3558 en la producción de vitamina K2 durante la fase de "resting cells", realizada en leche convencional o leche tamponada. "Sin respiración": precultivo tradicional y después cultivo en condiciones en "resting cells" en leche entera. "Respiración en laboratorio": precultivo en unas condiciones de respiración realizada en tubo, y después cultivo en condiciones de "resting cells" en leche entera. "Respiración en laboratorio en leche tamponada": precultivo en unas condiciones de respiración, y después cultivo en condiciones de "resting cells" en leche tamponada por el  $\beta$ -glicerolofosfato. "Respiración en fermentador": precultivo en unas condiciones de respiración realizada en un fermentador seguido de un cultivo en condiciones de "resting cells" en leche tradicional.
- Figura 6: Histograma que presenta la influencia de la viabilidad bacteriana de la variante natural I-3558 en la producción de vitamina K2 durante la fase de "resting cells". VitK STZ: precultivo en condiciones de respiración tratado con estreptozotocina, y después cultivo en condiciones de "resting cells" en leche entera complementada con eritromicina. VitK R+: precultivo en unas condiciones de respiración realizada en tubo, y después cultivo en condiciones de "resting cells" en leche entera.

Está claro que la presente invención no está limitada a la única descripción anterior. Otros modos de realización y ventajas de la invención se desprenderán de la lectura de los ejemplos siguientes, que se proporcionan a título puramente ilustrativo.

## Ejemplos

### 5 PARTE A: OBTENCIÓN DE VARIANTES NATURALES DE CEPAS NATURALES DE BACTERIAS LÁCTICAS CAPACES DE PRODUCIR UNAS CANTIDADES VENTAJOSAS DE VITAMINA K

10 A título de apuntes preliminares, se debe observar que los protocolos para obtener las variantes naturales descritas a continuación son aplicables a cualquier tipo de cepa de bacteria láctica de partida. Dependiendo de las cepas de partida que utilice el experto en la materia, se podrá, principalmente por razones prácticas, modificar algunas de las condiciones experimentales desarrolladas por los inventores. En cualquier caso, las modificaciones que el experto en la materia probablemente aporte a los procedimientos siguientes serán menores y requerirán solamente manipulaciones de rutina que no implican ninguna actividad inventiva.

#### 15 A-I- Obtención y utilización de variantes naturales resistentes a la bacitracina

Aunque una exposición a agentes tales como la bacitracina o el peróxido es conocida por permitir seleccionar cepas bacterianas que presentan una resistencia incrementada a estos agentes, nunca se ha establecido una relación en la bibliografía entre resistencia a la bacitracina o peróxido y niveles de producción de vitamina K2 por las bacterias.

20 En el contexto de sus estudios, los inventores descubrieron de manera completamente inesperada que las bacterias eran capaces de desarrollar un mecanismo original de resistencia a ciertos agentes tales como la bacitracina o el peróxido, que implican un aumento de la producción de vitamina K2. Los inventores han previsto aprovechar este descubrimiento para obtener, utilizando la bacitracina o el peróxido, por ejemplo, como agente de selección, variantes naturales de cepas de bacterias lácticas (en particular *Lactococcus lactis*) capaces de sobreproducir vitamina K2.

#### 25 A-I-1- Protocolo para obtener variantes resistentes a la bacitracina

30 Se realizó un precultivo a partir de un cristal de una cepa natural de *Lactococcus lactis* en presencia de 2 ml de medio de cultivo M17 comercial tradicional (medio M17 Agar, Difco™) complementado con 5 g/l de lactosa (de aquí en adelante, M17 Lac) y con hemina (20 µl/ml) (de aquí en adelante, medio M17 Lac + hemina). La incubación se llevó a cabo bajo agitación a 30°C.

35 El precultivo sirvió para inocular 2 ml de M17 Lac + hemina complementado con bacitracina (4 µg/ml). La tasa de inoculación fue 1%. El cultivo se incubó entonces durante 48 horas bajo agitación a 30°C.

40 Después, 100 µl de esta suspensión se depositaron sobre gelosa de M17 Lac. Un disco de papel embebido con 2,5 mg de bacitracina se depositó en el centro de la caja. La gelosa se incubó durante 48 horas a 30°C. Los clones cercanos al disco de papel se cultivaron en presencia de bacitracina (4 µg/ml) en 2 ml de M17 Lac + hemina. La incubación duró 24 horas bajo agitación a 30°C.

45 Las células se aislaron sobre gelosa M17 Lac en presencia de bacitracina (2 µg/ml) después de una incubación de 48 h a 30°C. Los clones aislados se cultivaron en M17 Lac + hemina, y después se incubaron durante 24 h bajo agitación a 30°C. Esta suspensión sirvió para la elaboración de la reserva congelada.

Estos experimentos permitieron que los inventores seleccionaran la variante natural *Lactococcus lactis subsp. cremoris* I-3557 depositada en la CNCM el 20/01/2006.

#### 50 A-I-2- Protocolo de realización un ejemplo de producto lácteo con la variante "bacitracina"

El precultivo se realizó a partir de un cristal de la cepa en 2 ml de M17 Lac.

El precultivo sirvió para inocular, al 1%, 50 ml de leche entera UHT que se incubaron a 30°C durante 24 horas.

55 La Tabla I siguiente da el resultado de la dosificación de vitamina K2 expresado en µg Equivalente MK-4/100 g de producto, para la variante resistente a la bacitracina y la cepa correspondiente silvestre.

Tabla I

Cepa	I-3557	Silvestre
Vitamina K (en µg/100 g)	8,90	3,32

60 La variante resistente a bacitracina sobreproduce por lo tanto, a razón de un factor de 3, la vitamina K cuando se compara con la cepa silvestre de partida.

A-II- Obtención y utilización de variantes naturales resistentes al peróxido

La respiración de *Lactococcus lactis* se ha demostrado bastante recientemente (Duwat *et al.*, 2001). La secuenciación del genoma de una cepa de *L. lactis* (IL1403) confirmó la presencia de los genes que codifican las funciones necesarias para la respiración aeróbica (Bolotin *et al.*, 2001). *L. lactis* de hecho tiene los operones *men* y *cytABCD* que codifican las proteínas necesarias para la síntesis de menaquinona y para biogénesis del citocromo D. Esta especie también tiene los tres genes implicados en las últimas etapas de síntesis de hem (*hemH*, *hemK* y *hemN*, que se requieren en la oxidación de porfirina para la unión del hierro a hem), pero no posee los genes implicados en las primeras etapas de este proceso. Sin embargo, *L. lactis* es capaz de realizar una fosforilación oxidativa en presencia de protoporfirinógeno.

También se ha demostrado que la respiración de *L. lactis* podía respirar en presencia de oxígeno y de hem en el medio de cultivo. Esta respiración permite que las células alcancen una mayor biomasa y el pH final observado es más alto que el obtenido habitualmente. Unos cultivos en presencia de oxígeno y/o de hem permiten obtener unas curvas de crecimiento comparables durante aproximadamente las 6 o 7 primeras horas de fermentación. A continuación, el consumo de glucosa disminuye en el caso de los cultivos en presencia de oxígeno y de hem, y la producción de lactato es entonces menor. Esto traduce un "shift" de metabolismo que se produce preferentemente de manera tardía durante el cultivo. La respiración de *L. lactis* ocurre por lo tanto hacia el final de la fase exponencial de crecimiento (Duwat *et al.*, 2001).

El papel de la respiración de *L. lactis* aún no se conoce, no más que el papel que puede tener la vitamina K2 en esta especie con metabolismo más bien fermentativo. Los inventores han constatado por otra parte que la vitamina K2 era producida por unas cepas de *L. lactis* mientras que la respiración no era inducida en las condiciones ensayadas (sin hem en el medio y sin agitación que permita una buena oxigenación del medio).

En el citoplasma, las proteínas presentan sólo pocos puentes disulfuros contrariamente a las proteínas extracelulares. Existe un sistema enzimático difundido que permite limitar el número de puentes disulfuros. Los enlaces S-S se reducen en función HS por medio de una enzima, la tiorredoxina. Esta enzima es regenerada por la tiorredoxina reductasa. Vido *et al.* (2005) crearon por ingeniería genética un mutante *trxB1* de *L. lactis*. El gen *trxB1* codifica para la tiorredoxina reductasa. El estudio por electroforesis bi-dimensional de proteínas sintetizadas por este mutante demostró que sobreproducía algunas de las enzimas de la vía de síntesis de la vitamina K2, a saber las enzimas MenB y MenD.

A la vista de estos datos, así como según unas observaciones personales, los inventores supusieron que una de las vías posibles para mejorar la producción de vitamina K2 por *L. lactis* podría ser inducir la respiración. Otra vía podría ser tratar de movilizar la vitamina K2 para responder a un estrés oxidativo.

Los inventores buscaron así obtener unas variantes naturales resistentes a un estrés oxidativo.

A-II-1- Protocolo para obtener variantes resistentes a un estrés oxidativo

El peróxido se seleccionó como un ejemplo de un agente oxidante que se puede utilizar. Por supuesto, se podrían utilizar en unas condiciones similares otros agentes oxidantes tales como los iones hipocloríticos, los iones ferrosos, la menadiona, el paraquat, el oxígeno, o cualquier otro compuesto oxidante adecuado.

Después del precultivo en medio M17 Lac, las cepas iniciales naturales se volvieron a repicar en el mismo medio que contiene unas concentraciones crecientes de peróxido (por ejemplo, una gama que va de por lo menos 20 mg/l a por lo menos 25, 27 y 28,5 mg/l aproximadamente). Los cultivos se incubaron a 30°C. Después de 24 horas, los primeros tubos de prueba de la gama de concentración que no presentaban ningún crecimiento se volvieron a incubar durante 24 h más. Los clones se aislaron entonces por extracción en medio gelosado. Se seleccionó un clon para una concentración de peróxido de 27 mg/l. Los inventores observaron que más allá de una concentración de peróxido de 28,5 mg/l, no había ningún crecimiento.

Estos experimentos permitieron así que los inventores seleccionaran la variante natural *Lactococcus lactis subsp. cremoris* I-3558 depositada en la CNCM el 20/01/2006.

A-II-2- Protocolo de realización de un ejemplo de producto lácteo con la variante "peróxido"

El clon seleccionado se puso en crecimiento en leche entera durante 24 horas. Las muestras se extrajeron después y se congelaron a -80°C para una última dosificación de vitamina K.

La Tabla II siguiente indica la cantidad de vitamina K2 producida por la variante resistente a peróxido, en comparación con la cantidad producida por la cepa de partida (cantidades expresadas en µg Equivalente MK-4/100 g de leche fermentada).

Tabla II

Cepa	Vitamina K ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )
Silvestre	2,92 $\pm$ 0,45
I-3558	5,94 $\pm$ 0,76

5 Como muestra la Tabla II anterior, la variante produce aproximadamente dos veces más de vitamina K2 que la cepa silvestre correspondiente.

#### A-III- Obtención y utilización de variantes naturales resistentes a análogos estructurales de los aminoácidos aromáticos

10 Los aminoácidos aromáticos ejercen un "feed-back" negativo en su propia vía de síntesis, a nivel de una etapa común con las vías de síntesis de la vitamina K y de los folatos. Cuando estos aminoácidos están presentes en el medio, estas vías no se activan. Los inventores buscaron por lo tanto retirar esta regulación negativa.

#### A-III-1 Protocolo de obtención de variantes resistentes a análogos estructurales de los aminoácidos aromáticos

15 Una cepa natural de *L. lactis* se extendió sobre un medio gelosado químicamente definido (Cocaign-Bousquet, M., *et al.*, 1995) que no contenía ni triptófano, ni fenilalanina, ni tirosina. El experto en la materia entiende perfectamente los términos "medio químicamente definido". Es un medio que contiene solamente unos compuestos simples y claramente definidos (por ejemplo: vitamina B9, vitamina B12, adenina, tirosina, etc.), al contrario que un medio  
20 semi-sintético que contiene unos compuestos complejos (por ejemplo: extracto de levadura, hidrolizado de caseína, etc.).

Un disco de papel secante se dispuso en el centro de las cajas de Petri y se embebió con 80  $\mu\text{l}$  de una solución que  
25 contenía 50 mM de los compuestos siguientes: m-fluorofenilalanina, p-fluorofenilalanina, m-fluorotirosina y fenilalaninamida. Estos compuestos son unos análogos estructurales de los aminoácidos aromáticos. Las cajas se incubaron a 30°C. Una zona de inhibición de crecimiento apareció alrededor de los discos. Después de 48 horas, los clones resistentes aparecieron en esta zona. Estos clones se pusieron en crecimiento en el medio químicamente  
30 definido que no contenía aminoácidos aromáticos. El medio se complementó con una solución que contenía los análogos estructurales de estos aminoácidos. La concentración final de cada uno de estos compuestos era de 1 mM.

#### A-III-2- Protocolo de realización de un ejemplo de producto lácteo con los clones "aminoácidos aromáticos"

35 Los cultivos obtenidos de acuerdo con la sección A-III-1 anterior sirvieron para inocular 50 ml de medio M17 Lac (tasa de inoculación de 1%) complementado con 1 ml de solución de hemina (500 mg/l). Los mismos cultivos se utilizaron para inocular un medio que no contenía hemina, pero colocado bajo agitación. Se realizó un último tipo de cultivo. Un medio M17L se inoculó y se colocó a 30°C sin agitación. Los cultivos se colocaron durante la noche a 30°C bajo agitación (250 rpm). Estos cultivos se centrifugaron entonces durante 5 minutos a 6000 g. El  
40 sobrenadante se retiró y se sustituyó por 50 ml de leche entera. Después de 24 h, las leches fermentadas se colocaron a -80°C a la espera de la dosificación de la vitamina K2 (véase la sección B-VI a continuación).

Los experimentos de dosificación de la vitamina K2 permitieron que los inventores seleccionaran uno de los clones como siendo una variante natural que sobreproduce la vitamina K2 (véase la sección B-VI a continuación): se trata  
45 de la variante natural *Lactococcus lactis subsp. cremoris* I-3626 presentada en la CNCM el 19/06/2006.

### PARTE B: PUESTA A PUNTO DE LAS CONDICIONES DE UTILIZACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS PARA FAVORECER LA PRODUCCIÓN DE VITAMINA K

#### B-I- La influencia de grasa en el medio

50 En el momento de las dosificaciones efectuadas en varios productos, los inventores observaron que el producto que contiene más vitamina K2 era la crema fermentada. Además, la vitamina K2 es muy hidrófoba. Los inventores establecieron la hipótesis por lo tanto de que la presencia de materia grasa, o al menos, un entorno hidrófobo, podía  
55 favorecer la producción de vitamina K2.

Se realizaron por lo tanto unas fermentaciones en leches que contenían varias concentraciones de materia grasa. Los precultivos se realizaron en medio M17 Lac. Las leches se inocularon a 1%. La fermentación se mantuvo a 30°C durante 24 horas. A continuación, las muestras se congelaron a la espera de una dosificación ulterior.

60 Los resultados se presentan en la figura 1, para dos cepas naturales de *L. lactis subsp. cremoris* (cepas nº 1 y nº 2).

Aunque se considera que los resultados obtenidos con una de las dos cepas naturales estudiadas a título de ejemplos, la utilización de una leche semi-desnatada (1,5% de materia grasa aproximadamente) en lugar de una

leche desnatada aumentó la producción de vitamina K2 en un factor de 4. El paso de una leche semi-desnatada a una leche entera (3,5% de materia grasa aproximadamente) permitía alcanzar un factor de 2.

Esta tendencia era la misma independientemente de la cepa natural considerada.

5 Sin embargo, el aumento en la cantidad de vitamina K2 producida con la del contenido del medio de materia grasa parece asintótico ya que la fermentación de una crema al 40% de materia grasa no permitió obtener unas cantidades de vitamina K2 superiores a las obtenidas en una leche entera (datos no mostrados).

10 B-II- Influencia de la tasa de crecimiento de las bacterias lácticas

En el momento del crecimiento en leche de una cepa natural de *L. lactis subsp. cremoris* (cepa natural nº 1), los inventores realizaron un seguimiento de la cinética de producción de vitamina K2.

15 Como se muestra en la figura 2, la producción de vitamina comenzaba solamente cuando el crecimiento se ralentizaba. La velocidad de crecimiento se podía determinar mediante el seguimiento de la cinética de acidificación. Cuando se alcanza la velocidad máxima de acidificación, la bacteria entraba en fase de ralentización.

20 Este tipo de comportamiento es relativamente clásico en el momento de la síntesis de metabolitos secundarios. Se pueden estudiar varios parámetros para disminuir la tasa de crecimiento: unas condiciones fisicoquímicas sub-óptimas (pH, temperatura, etc.), unos compuestos bacterioestáticos (antibióticos), el cultivo en "resting cells". Esta última técnica consiste en realizar una inoculación con una cantidad de células que corresponde por lo menos a la obtenida normalmente al final de la fermentación clásica. En este caso, no hay crecimiento bacteriano, la velocidad de crecimiento es cero.

25 Los inventores buscaron así combinar cultivo en "resting cells" y efecto de temperatura.

Se inoculó una leche entera con un FED (fermento de inoculación directa) que contenía  $10^{11}$  ufc/g a razón de 10 g/l. La leche se incubó entonces a varias temperaturas.

30 Como se muestra en la figura 3, el descenso de la temperatura no tenía un impacto positivo en la producción de vitamina K2. Por el contrario, el hecho de cultivar las bacterias en "resting cells" permitió multiplicar la producción por un factor de 2 aproximadamente: 20 µg/100 g contra 10 µg/100 g para una fermentación clásica con crecimiento.

35 B-III- La influencia de utilizar el precultivo en condiciones de respiración

La vitamina K2 participa en la cadena respiratoria. *L. lactis* es capaz de respirar pero esta respiración solamente interviene al final de la fermentación, es decir, cuando el flujo metabólico se ralentiza. Esta propiedad puede compararse con la observada en las cinéticas de producción de la vitamina K2.

40 Es importante observar que fabricar completamente un producto alimenticio en condiciones de respiración parece difícil de realizar a escala industrial. En efecto, se plantearían entonces problemas de aeración, de agitación, de espumación, etc., difíciles de superar sin revisar los aparellajes y procesos de fabricación habituales, lo cual requeriría unas inversiones muy grandes y generaría unos sobrecostes adicionales inaceptables para la industria agroalimentaria.

45 Por el contrario, llegado el caso, se podría realizar el precultivo en condiciones de respiración sin que se planteen demasiadas dificultades para los fabricantes.

50 Los inventores estudiaron por lo tanto el impacto del precultivo en condiciones de respiración sobre la producción de vitamina K2 por bacterias lácticas.

Para ello, se realizaron los precultivos en medio M17 Lac complementado con 20 µl/ml de una solución de hemina a 0,5 mg/ml en sosa 0,1 M. La inoculación se realizó al 1% y la temperatura de incubación era de 30°C. La aeración estaba asegurada por agitación simple.

55 En un primer momento, estos precultivos permitieron inocular leche entera al 1%, es decir una fermentación tradicional. Bajo estas condiciones, no se observó ningún impacto positivo en la producción de vitamina K2 (datos no mostrados).

60 Estos precultivos se utilizaron entonces para realizar unas fermentaciones en condiciones de "resting cells". Los precultivos se realizaron como se ha descrito anteriormente y se mantuvieron durante una noche. Después, unas muestras de 50 ml se centrifugaron a 6000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se retiró y se sustituyó por leche entera. La leche se incubó a continuación a 30°C durante 24 h. Las muestras se congelaron a -80°C para una dosificación ulterior.

65

Como se muestra en la figura 4, el comportamiento observado era diferente según las cepas. El precultivo en condiciones de respiración no tuvo un impacto en la producción de vitamina K2 por la cepa natural *L. lactis subsp. cremoris* nº 1. Por el contrario, permitió aumentar en un factor de 2 la producción de vitamina K2 por la variante natural I-3558.

5 La vía del precultivo en condiciones de respiración pareció por lo tanto ventajosa para ciertas cepas por lo menos.

10 Sin embargo, en la práctica, es importante poder disponer, no de precultivos frescos, sino de fermentos congelados. Además, con el fin de realizar unas fermentaciones en condiciones de "resting cells", es conveniente disponer de fermentos concentrados.

B-IV- Resultados complementarios concernientes al efecto estimulante de la respiración en la producción de vitamina K2

15 Estos resultados se deben relacionar con la sección A-III anterior.

20 Como se indica en el párrafo A-III-2 anterior, el cultivo de la variante natural I-3626 seleccionada en presencia de análogos estructurales de los aminoácidos aromáticos sirvió para inocular 50 ml de medio M17 Lac (tasa de inoculación del 1%) complementado con 1 ml de solución de hemina (500 mg/l). El mismo cultivo sirvió para inocular un medio que no contenía hemina pero colocado bajo agitación. Se realizó un último tipo de cultivo. Un medio M17 Lac se inoculó y se colocó a 30°C sin agitación. Los cultivos se dispusieron durante una noche a 30°C bajo agitación (250 rpm). Estos cultivos se centrifugaron a continuación durante 5 minutos a 6000 g. Se retiró el sobrenadante y se sustituyó por 50 ml de leche entera. Después de 24 h, las leches fermentadas se colocaron a -80°C a la espera de la dosificación de vitamina K2.

25 La Tabla III siguiente da los resultados de producción de vitamina K2 por la variante natural I-3626 en función de las condiciones de utilización. La cantidad de vitamina K2 se expresa en µg Equivalente MK-4 por 100 g de leche fermentada.

30 Tabla III

Tipo de precultivo	Sin agitación Sin hemina	Con agitación Con hemina
Vitamina K2	0,77	25,77

35 Estos resultados muestran que la respiración (presencia de hemina bajo agitación) tiene un impacto muy importante en la producción de vitamina K2. En estas condiciones, la producción de vitamina se multiplicó por 5. La cepa madre producía 21,5 µg/100 g después del precultivo sin respiración (datos no mostrados). Cuando el precultivo se realizaba en condiciones de respiración, la producción caía a 10,3 µg/100 g (datos no mostrados). De esta manera, para la cepa madre, el precultivo en condiciones de respiración tenía un efecto negativo en la producción de vitamina K2.

40 B-V- La influencia de la dosis de inoculación, de la población bacteriana final y del pH de la leche

En las condiciones de "resting cells" descritas anteriormente para el precultivo en respiración, la población bacteriana inicial aumenta a aproximadamente 10<sup>10</sup> UFC/ml.

45 Ya que esta dosis de inoculación es difícilmente aplicable en el marco de un proceso industrial, los inventores estudiaron la influencia precisa de la cantidad inicial de células en la producción de vitamina K2 durante la fase de fermentación de leche.

50 Por otra parte, ya que la cantidad de células es mayor en un precultivo en condiciones de respiración que en un precultivo tradicional, los inventores intentaron determinar si la ganancia de producción observada para los precultivos en condiciones de respiración se debía a un simple aumento de la dosis de inoculación, o bien a una aportación específica del proceso de respiración.

55 Los inventores también intentaron determinar si la población bacteriana final, después de la fase de "resting cells", jugaba un papel determinante en la cantidad de vitamina K2 obtenida. Sabiendo que existe una cierta mortalidad bacteriana debida, entre otros, a la disminución del pH durante la fermentación, los inventores estudiaron el impacto de la utilización de una leche tamponada en el nivel de producción de vitamina K2.

60 Para responder estas diversas preguntas, las pruebas se realizaron en condiciones de "resting cells", en leche tradicional o tamponada, con dosis de inoculación variando de aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/ml a 10<sup>10</sup> UFC/ml aproximadamente, y ello, a partir de precultivos tradicionales o en respiración.

Los precultivos de la cepa I-3558 se realizaron en medio M17 Lac a 30°C. Para los experimentos en condiciones de

respiración, el medio se complementó con 20 µl/ml de una solución de hemina a 0,5 mg/ml (en sosa 0,1 M) y el precultivo se agitó durante incubación durante una noche. Varios volúmenes de estos precultivos (véase la Tabla IV a continuación) se centrifugaron entonces a 10000 g durante 10 minutos.

5

Tabla IV

Inoculación	Volumen de precultivo (R+)	Volumen de precultivo (R-)
100%	40 ml	160 ml
75%	30 ml	120 ml
50%	20 ml	80 ml
30%	12 ml	48 ml
20%	8 ml	32 ml
10%	4 ml	16 ml
5%	2 ml	8 ml
1%	0,4 ml	1,6 ml
0,01%	0,4 ml	0,16 ml

10

El sobrenadante se retiró y se sustituyó o bien por 40 ml de leche entera tradicional (precultivos R+ y R-), o bien complementado con β-glicerofosfato a 0,075 M final (precultivo R+ solamente). Las muestras se incubaron a continuación a 30°C durante 24 h. Se extrajo una alícuota para efectuar un recuento y después las muestras se congelaron a -80°C para una dosificación ulterior. Los resultados de la dosificación y de los recuentos realizados antes y después de la fase de "resting cells" están indicados en la Tabla V siguiente. Esta tabla proporciona los resultados de la dosificación de vitamina K2 y de los recuentos realizados antes (T0) y después de la fase de "resting cells" (Tf) a partir de precultivos tradicionales o aquellas en respiración.

15

Tabla V

Dosis	T0 R-	Tf R-	VitK R-	T0 R+	Tf R+	VitK R+	T0 R+ TP	Tf R+ TP	VitK R+ TP
100%	1,08E+10	9,70E+09	44,47	3,40E+09	2,65E+09		3,40E+09	5,30E+09	35,9
75%	8,10E+09	4,30E+09	29,01	2,55E+09	2,40E+09		2,55E+09	5,80E+09	
50%	5,40E+09	4,15E+09	18,58	1,70E+09	1,64E+09	19,82	1,70E+09	6,40E+09	26,7
30%	3,24E+09	4,25E+09	13,72	1,02E+09	1,20E+09	16,75	1,02E+09	7,70E+09	
20%	2,16E+09	2,10E+09	9,13	6,80E+08	1,60E+09	14,09	6,80E+08	6,40E+09	18,55
10%	1,08E+09	2,10E+09		3,40E+08	1,17E+09		3,40E+08	4,60E+09	
5%	5,40E+08	1,10E+09	6,4	1,70E+08	1,29E+09	9,41	1,70E+08	3,60E+09	13,666
1%	1,08E+08	2,15E+09	6,88	3,40E+07	1,25E+09	6,35	3,40E+07	4,20E+09	
0,1%	1,08E+07	1,50E+09	6,26	3,40E+06	1,27E+09	6,19	3,40E+06	4,80E+09	

20

R- = precultivo tradicional

R+ = precultivo en respiración

TP = fermentación en leche tamponada con β-glicerofosfato

T0 = población bacteriana inicial en Ufc/ml de cultivo

Tf = población bacteriana final en Ufc/ml de cultivo

VitK = dosificación de la vitamina K2 en µg Equivalente MK-4/100 g de producto.

25

Los resultados obtenidos se representan en la figura 5. También se representan, a título indicativo, los resultados obtenidos con un precultivo en condiciones de respiración, realizado en fermentador seguido por una fase de "resting cells" en leche tradicional (curva "respiración en fermentador"). Los resultados son comparables con los obtenidos con precultivos en tubo (curva "respiración en laboratorio").

30

Los resultados obtenidos (Tabla V y figura 5) indicaban que:

35

- El contenido de vitamina K2 dependía de la dosis de inoculación;
- La "pendiente" de la curva era más importante para un precultivo en condiciones de respiración que para precultivo tradicional. De esta manera, para una población bacteriana dada, la producción de vitamina K2 era más importante cuando el precultivo se realizaba en condiciones de respiración. La ganancia observada en condiciones de respiración parecía por lo tanto deberse a una aportación específica del proceso de respiración más que a un aumento simple de la dosis de inoculación, lo cual ha confirmado el interés de esta vía;
- La producción de vitamina K2 era más importante cuando la fase de "resting cells" se realizaba en leche tamponada. Esto se podría deber o bien a una mejor supervivencia de las bacterias en este medio, ya que para una misma población inicial, la población final era de 2 a 6 veces más elevada en leche tamponada que con leche tradicional (véase la Tabla V), o bien a una mejor "extracción" de vitamina K2 en leche tamponada.

45

**Referencias**

- Bolotin *et al.* 2001. *Genome Research* 11, 731-753
- 5 - Duwat *et al.* 2001. *J. Bacteriol.* 183(15), 4509-16
- Morishita *et al.* 1999. *J. Dairy Sci.* 82,1897-1903
- Parker *et al.* 2003. *Journal of Food Science* 68(7), 2325-2330
- Vido *et al.* 2005. *J. Bact.* 187, 601-10
- Hart JP, *et al.* [letter]. *Lancet.* 1984;2:283
- 10 - Hart JP, *et al.* *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;60:1268-9
- Hauschka PV, *et al.* *Physiol Rev.* 1989;69:990-1047
- Ducy P, *et al.* *Nature.* 1996;382:448-52
- Väänänen HK, *et al.* *Calcif Tissue Int.* 1999;64:S79
- Ronden JE, *et al.* *Biochim Biophys Acta.* 1998;1379:16-22
- 15 - Knapen MH, *et al.* *Ann Intern Med.* 1989 Dec 15;111(12):1001-5
- Szulc P, *et al.* *J Clin Invest.* 1993 Apr;91 (4):1769-74
- Booth SL, *et al.* *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1201-8
- Shiraki M, *et al.* *J Bone Miner Res.* 2000;15:515-21
- Braam LAJLM, *et al.* *Calcif Tissue Int.* 2003 Jul;73(1):21-6
- 20 - Hirano J and IshiiY. *J Orthop Sci.* 2002; 7:364-369.
- Cocaign-Bousquet, M., *et al.* *Journal of Applied Bacteriology* 1995; 79, 108-116
- Demain AI 1981. *Science* 214, 987-995

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para aumentar la cantidad de vitamina K2 obtenida cultivando por lo menos una cepa de bacteria láctica productora de vitamina K2, en el que el cultivo de dicha cepa se realiza en unas condiciones de "resting cells", comprendiendo dicho procedimiento por lo menos:
- 5
- a) el precultivo de dicha cepa en unas condiciones de respiración, en un medio de precultivo apropiado que contiene por lo menos una porfirina con una concentración final de por lo menos 0,5 µg/ml;
  - 10 b) la inoculación de un medio de cultivo apropiado que contiene por lo menos 0,5% de materia grasa con una cantidad de células bacterianas vivas que varía de  $10^8$  a  $10^{11}$  ufc/ml aproximadamente; y,
  - 15 c) la fermentación del medio así inoculado durante un periodo que varía de 4 a 48 horas, a una temperatura de 4°C a 50°C, de tal manera que al final de la etapa c), la cantidad de vitamina K2 producida por el cultivo de "resting cells" es superior, en un factor por lo menos igual a aproximadamente 1,2 a la obtenida cultivando dicha cepa en unas condiciones de fermentación estándar.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho medio de cultivo apropiado contiene por lo menos 1,5% de grasa.
- 20
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que dicho medio de cultivo apropiado es una leche o una leche cuyo poder tampón ha sido aumentado.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha cepa de bacteria láctica productora de vitamina K2 se selecciona de entre los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Propionibacterium*.
- 25
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que dicha cepa de bacteria láctica se selecciona de entre las especies *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Enterococcus faecium*, y *Propionibacterium* sp.
- 30
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que dicha cepa de bacteria láctica se selecciona de entre las variantes naturales de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* productoras de vitamina K2:
- 35
- I-3557 depositada en la Collection Nationale de Culture des Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, Francia) el 20/01/2006,
  - I-3558 depositada en la CNCM (Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, Francia) el 20/01/2006, y,
  - 40 - I-3626 depositada en la CNCM (Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, Francia) el 19/06/2006.
7. Procedimiento para producir vitamina K2, que comprende por lo menos:
- 45
- a) la realización del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y,
  - b) la recuperación de la vitamina K2 así producida.
8. Procedimiento para preparar un producto alimenticio enriquecido con vitamina K2, que comprende por lo menos:
- 50
- a) la producción de vitamina K2 según el procedimiento de la reivindicación 7;
  - b) la adición de la vitamina K2 así producida a dicho producto alimenticio, o a una preparación intermedia del mismo; y,
  - 55 c) la obtención de dicho producto alimenticio enriquecido con vitamina K2.
9. Procedimiento para preparar un producto alimenticio enriquecido con vitamina K2, que comprende por lo menos:
- 60
- a) el cultivo de por lo menos una cepa de bacteria láctica productora de vitamina K2 en unas condiciones de "resting cells" de acuerdo con el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
  - b) la adición de la biomasa obtenida a partir del cultivo en a), a dicho producto alimenticio o a una preparación intermedia del mismo; y,
  - 65 c) la obtención de dicho producto alimenticio enriquecido con vitamina K2.

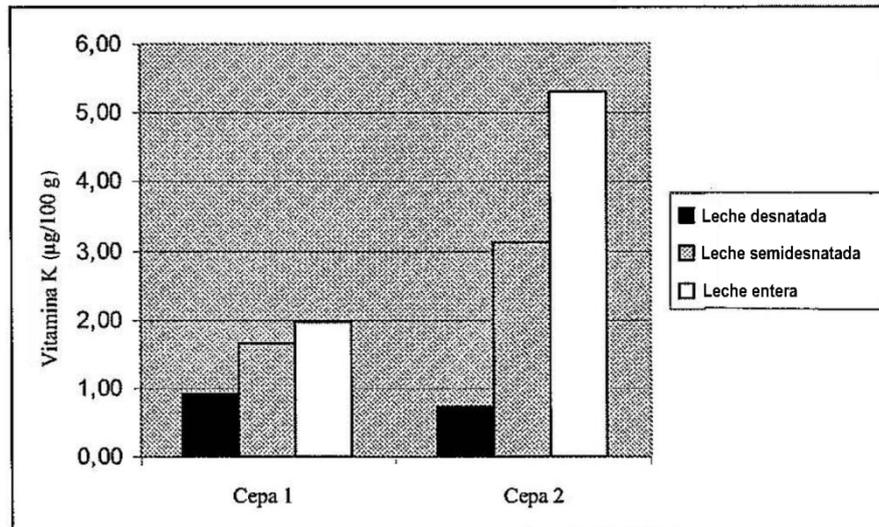


FIG 1

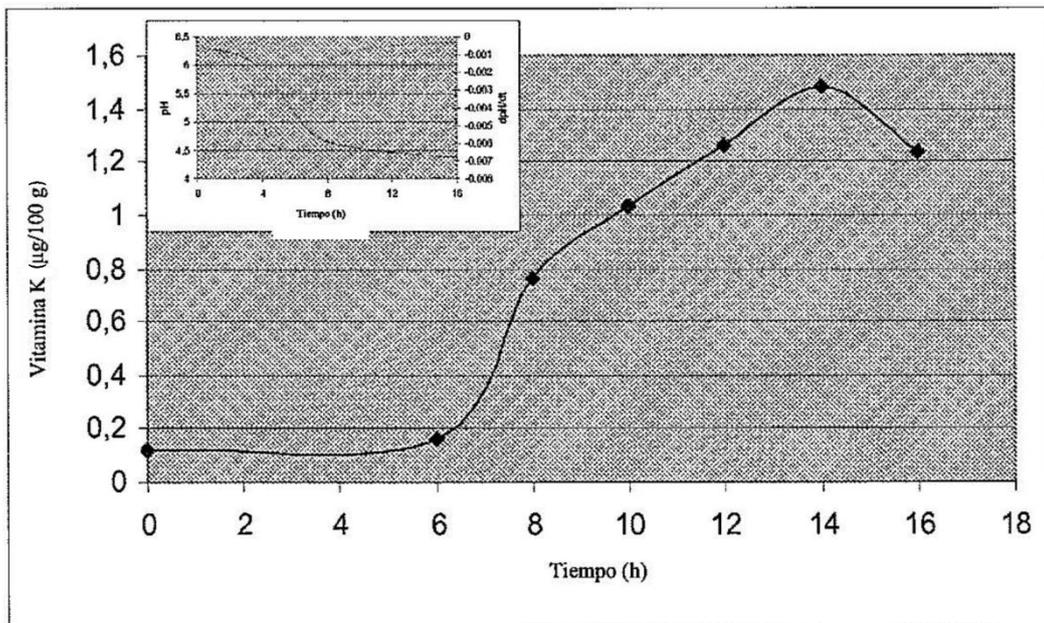


FIG 2

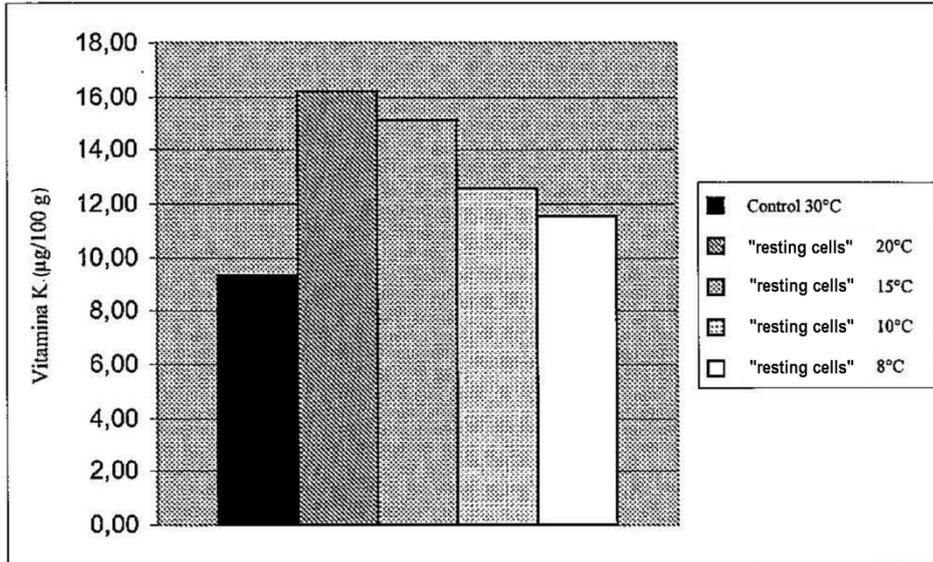


FIG 3

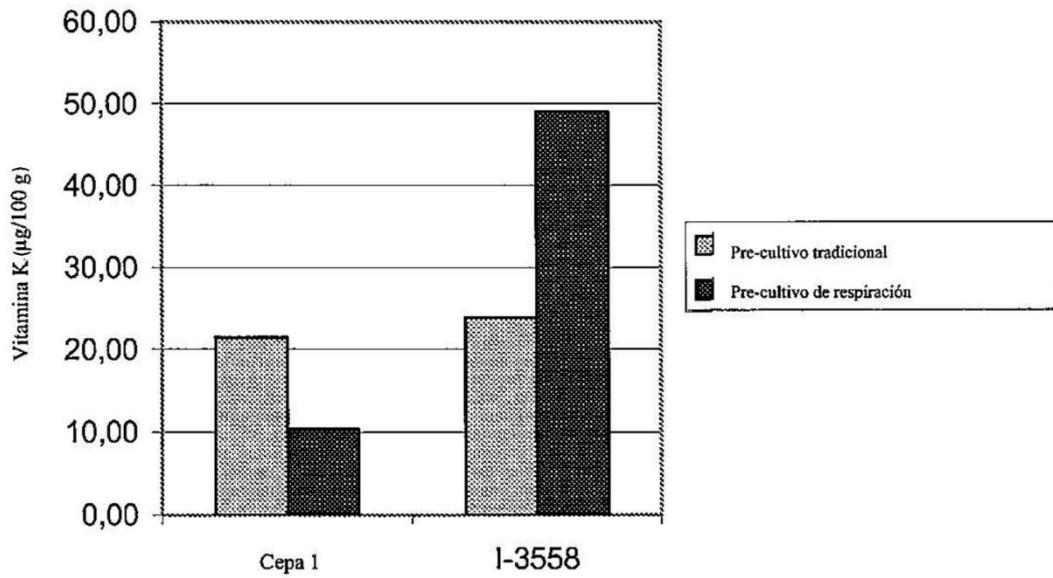


FIG 4

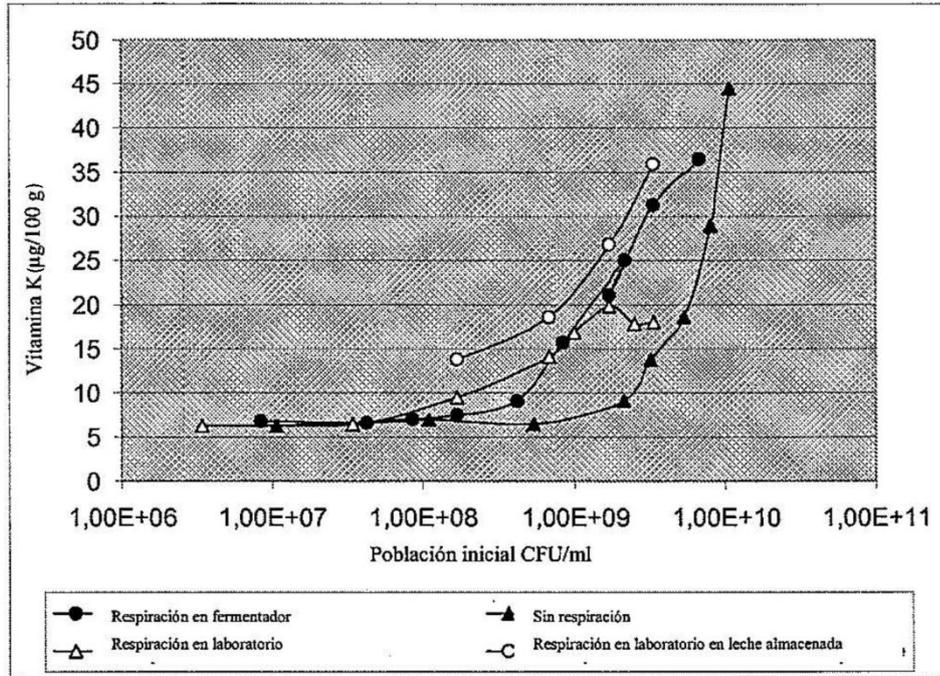


FIG 5

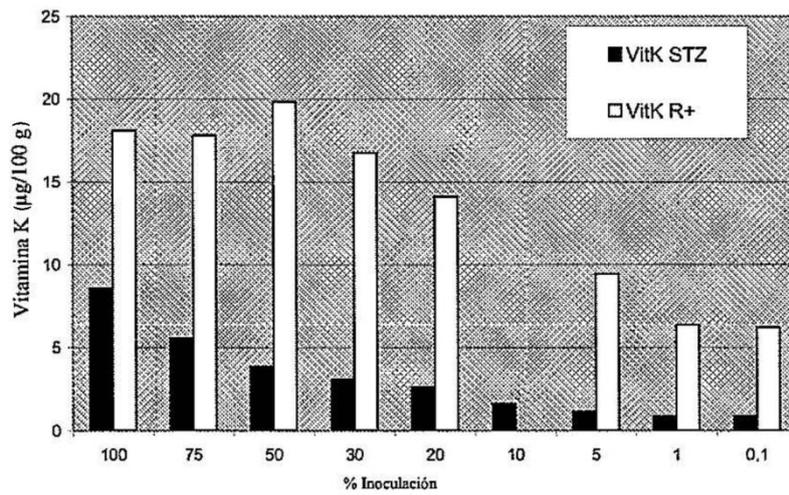


FIG 6