

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 583**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)

A23L 1/304 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/744 (2015.01)

A61K 35/747 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2008 E 08789404 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2173195**

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

30 Prioridad:

26.07.2007 IT TO20070555

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

10.12.2015

73 Titular/es:

**BIOMAN S.R.L. (100.0%)
VIA ALFIERI 18
10121 TORINO, IT**

72 Inventor/es:

**BENEDETTI, ALBERTO y
GIRARDO, FRANCESCO**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 553 583 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 cinc, método para la preparación de la misma y productos probióticos, cosméticos, dietéticos y nutracéuticos que comprenden la misma

5 La presente invención se refiere a una biomasa enriquecida en cinc, a un método para la preparación de la misma, así como a productos alimenticios, probióticos, dietéticos, nutracéuticos y cosméticos que comprenden la misma. La invención se refiere además a cepas bacterianas adecuadas para usarse en el método de la invención.

10 El cinc es un mineral esencial que está presente en los organismos en cantidades superiores a las de cualquier otro oligoelemento, con la excepción del hierro. Está asociado a la absorción normal de vitaminas y a su actividad, particularmente las vitaminas del complejo B. Es un elemento constituyente de un enorme número de enzimas que desempeñan un papel en la digestión y el metabolismo, incluyendo la anhidrasa carbónica, requeridas para la respiración tisular. En el cuerpo humano, el cinc se encuentra especialmente en huesos, dientes, piel, hígado, músculos y cabello. El cinc se absorbe rápidamente en la parte superior del intestino delgado. El cinc también se deposita por sí mismo en determinadas estructuras oculares, la próstata, los espermatozoides, la piel, el cabello, las uñas y se encuentra también en los glóbulos blancos. Estos aportes no son fácilmente utilizables, por tanto el alimento tiene que contener cantidades suficientes del mismo con el fin de satisfacer las necesidades del organismo. Es indispensable para el crecimiento corporal, la reparación tisular y para una respuesta inmunitaria normal. También es importante para la digestión de hidratos de carbono y para el metabolismo del fósforo. Participa en la síntesis de ácido nucleico que controla la creación de diversas proteínas en células, es importante para la absorción de vitaminas, es útil en procesos de cicatrización e inhibe las lipasas saprofitas de bacterias, levaduras y la piel. Muchas enzimas necesitan cinc para activarse, lo que es necesario para la síntesis de proteínas, para determinados aspectos de las funciones hormonales, para las funciones cerebrales, la vista y el gusto. Además, la enzima alcohol dehidrogenasa (implicada en la descomposición del alcohol) contiene cinc, por lo que el alcohol produce una pérdida de cinc. El cinc se usa para reducir las secreciones sebáceas, en procesos de cicatrización para heridas internas y externas (acelera la cicatrización de heridas), en terapias para el acné y la dermatitis seborreica. Este metal puede promover el crecimiento de nuevo del cabello en personas que padecen alopecia areata total y puede usarse en terapia contra la diabetes, gracias a sus efectos reguladores sobre la insulina de la sangre. Se ha encontrado que añadir cinc a la insulina prolonga el efecto de la hormona sobre los niveles de azúcar en sangre.

La deficiencia de cinc produce graves trastornos en todos los seres vivos. Se sabe que determinados fármacos pueden inducir una deficiencia de cinc, entre ellos los anticuerpos anti-MAO (anti-monoaminoxidasa), corticosteroides, diuréticos. La deficiencia de cinc puede producir retraso en el crecimiento, maduración sexual retardada y tiempos más largos para la cicatrización de heridas. La deficiencia de cinc también puede conducir a aterosclerosis y aumento en la propensión a infecciones. Las estrías y las manchas blancas en las uñas pueden ser síntomas de deficiencia de cinc. Otros síntomas de la deficiencia de cinc son uñas y cabello frágiles, falta de pigmento del cabello, ciclos menstruales irregulares en chicas adolescentes, impotencia en hombres jóvenes y dolores en articulaciones de rodilla y cadera en adolescentes. La disminución de cinc crónica puede incluso predisponer a las células del cuerpo a cáncer. Incluso pequeñas deficiencias de cinc son perjudiciales para el organismo, por ejemplo, pueden determinar una reducción en la concentración de espermatozoides e impotencia. Además, la deficiencia de cinc produce fatiga, probabilidades superiores de contraer infecciones o experimentar heridas, y agilidad mental reducida. De hecho, la deficiencia de cinc obstaculiza la producción de energía, la síntesis de proteínas, la formación de colágeno y la tolerancia al alcohol.

45 En la técnica anterior se describen composiciones alimenticias o dietéticas que contienen cinc en combinación con agentes probióticos.

50 Por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense 20070009502 A describe composiciones nutricionales para alimentación animal, diseñadas para la mejora o el mantenimiento de la microflora gastrointestinal, que comprenden agentes probióticos (tales como levaduras y/o bacterias, por ejemplo *Bifidobacterium*, *Enterococcus* o *Lactobacillus*), agentes prebióticos, glutamina o sus análogos, glucosa, glicina, electrolitos, vitaminas y minerales, incluyendo mineral cinc (100-200 mg/kg).

55 La solicitud de patente WO 2006/112998 describe un complemento nutricional líquido que va a usarse en combinación con leche humana, diseñado para promover el crecimiento de bebés lactantes que padecen retraso en el crecimiento, que comprende numerosos componentes, entre ellos probióticos (tales como *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium*) y minerales, incluyendo cinc.

60 La solicitud de patente CA 2525342 A describe una preparación alimenticia probiótica de amplio espectro útil en complementos alimenticios, por ejemplo para mejorar la respuesta inmunitaria frente a enfermedades, que comprende cepas bacterianas específicas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* *ssp.* *pseudoplantarum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, en combinación con componentes auxiliares, ligadores y componentes vigorizantes adicionales, incluyendo cinc.

65 El documento WO 92/21749 A se refiere a un aditivo rico en oligoelementos, a un método para preparar el mismo, a

la preparación en la que se incluye el aditivo y al uso del mismo. El documento RU 2002 117254 A divulga la preparación de un complejo.

5 Los documentos de la técnica anterior citados anteriormente describen composiciones adecuadas para el suministro de cinc dentro del cuerpo humano o animal, en las que el cinc está en forma de cinc inorgánico y está en combinación con muchos otros componentes, incluyendo microorganismos probióticos.

10 Estas composiciones tienen la desventaja de que contienen cinc exclusivamente en forma inorgánica, que es más difícil de absorber por el cuerpo humano que el cinc orgánico.

15 Los inventores han encontrado ahora que determinadas especies bacterianas que pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, especialmente las cepas *Bifidobacterium animalis Subsp. lactis BB1BM* y *Streptococcus thermophilus ST 16 BM*, cuando se hacen crecer en un medio de cultivo que contiene cinc inorgánico, muestran la capacidad inesperada y ventajosa de acumular cantidades extremadamente altas de cinc dentro de la célula, sin que tales altas cantidades de cinc intracelular sean perjudiciales para la supervivencia de la propia biomasa. Tal capacidad para acumular cinc de manera intracelular hace que las especies bacterianas mencionadas anteriormente sean particularmente adecuadas para su uso como medios de suministro de cinc dentro del cuerpo humano o animal, particularmente útiles para la fabricación de productos probióticos que, por definición, deben contener una biomasa viva. La biomasa enriquecida en cinc de la invención también puede usarse en aplicaciones cosméticas, especialmente para la fabricación de productos cosméticos o cosmeceúticos. Para la fabricación de productos cosméticos, es necesario que la biomasa esté constituida por microorganismos muertos, mientras que para la fabricación de productos cosmeceúticos, es necesario que la biomasa esté constituida por microorganismos vivos.

25 Por tanto, un objeto de la invención es un método para la fabricación de una biomasa enriquecida en cinc, caracterizado porque la biomasa se obtiene

30 (i) cultivando microorganismos seleccionados del grupo que consiste en *Bifidobacterium animalis Subsp. lactis BB1BM*, *Streptococcus thermophilus ST 16 BM* y combinaciones de los mismos, en un medio de cultivo nutriente que comprende una sal de cinc, de modo que dichos microorganismos acumulan cinc a nivel intracelular; y

(ii) separando los microorganismos enriquecidos en cinc del medio de cultivo.

35 Mediante el método de la invención se logra una biomasa que comprende microorganismos vivos que contienen una alta cantidad de cinc acumulada dentro de las células, tal como resulta evidente a partir de los estudios notificados a continuación en el presente documento.

40 El método para la fabricación de la biomasa enriquecida en cinc de la invención proporciona una primera etapa de fermentación, en la que los microorganismos seleccionados de *Bifidobacterium animalis Subsp. lactis BB1BM* y *Streptococcus thermophilus ST 16 BM* se cultivan en un medio nutriente adecuado para hacer crecer microorganismos de los géneros *Bifidobacterium* y *Streptococcus* complementado con una sal de cinc, preferiblemente sulfato de cinc ($ZnSO_4$). El medio nutriente es preferiblemente un medio líquido que contiene fuentes de carbono, por ejemplo glucosa y/o lactosa; fuentes de nitrógeno, por ejemplo peptonas, hidrolizados de caseína, extractos de levadura; sales inorgánicas; fuentes de vitaminas y microelementos.

45 La concentración de la sal de cinc en el medio de cultivo es preferiblemente de entre 5 y 50 mM, incluso más preferiblemente de entre 10 y 40 mM.

50 Se prefiere sulfato de cinc.

55 La fermentación se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de entre 25°C y 48°C, más preferiblemente de entre 35°C y 45°C. El valor de pH del medio líquido es preferiblemente de entre 2,5 y 8,0, más preferiblemente de entre 3,5 y 7,5. La duración del tiempo de fermentación es preferiblemente de entre 6 y 40 horas, más preferiblemente de entre 8 y 36 horas. La fermentación puede llevarse a cabo en condiciones aerobias, microaerobias y/o anaerobias. Tras la etapa de fermentación, durante la que se produce el crecimiento de biomasa y la acumulación de cinc dentro de las células bacterianas, la biomasa obtenida se separa del medio de cultivo mediante cualquier método conocido *per se* adecuado, por ejemplo mediante centrifugación o microfiltración, de tal forma que no se comprometa la viabilidad celular. Por tanto, el método de la invención permite que se obtenga una biomasa de microorganismos enriquecida en cinc que comprende microorganismos vivos. Si se desea, la biomasa obtenida puede someterse entonces a liofilización, secado, microencapsulación y/o congelación, llevados a cabo según procedimientos convencionales.

65 Los presentes inventores también han seleccionado dos cepas de microorganismos de las especies *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium animalis*, que están dotadas particularmente de una capacidad particularmente alta para acumular cinc dentro de la célula. Tales cepas se han designado *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM y *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 BM y se han depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung für

Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Braunschweig, Alemania), según el Tratado de Budapest, como *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM depositada el 13 de julio de 2007, con el número de registro DSM 19526, y *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 BM depositada el 23 de diciembre de 2005, con el número de registro DSM 17850, respectivamente.

5 Tal como se describió anteriormente, la biomasa enriquecida en cinc que puede lograrse mediante el método de la invención es particularmente adecuada para su uso como agente probiótico, porque contiene altas concentraciones de cinc en forma orgánica.

10 Para este fin, la biomasa que comprende microorganismos visos, y por tanto que tiene actividad probiótica, puede prepararse de diferentes formas. Por ejemplo, puede añadirse a un producto alimenticio, preferiblemente a leche o a un producto lácteo tal como yogur, con el fin de obtener una preparación alimenticia que tiene actividad probiótica. Alternativamente, puede usarse para la fabricación de una composición que tiene actividad probiótica, tal como por ejemplo un complemento alimenticio, un producto dietético, un alimento funcional, o para la fabricación de una preparación no alimenticia para administración oral, tal como por ejemplo un producto nutracéutico, en combinación con vehículos y/o excipientes adecuados. Para este fin, la biomasa se usa preferiblemente en forma de una composición liofilizada o secada como tal y/o de una composición microencapsulada.

15 La carga bacteriana del producto liofilizado o secado que va a usarse posteriormente en la composición que tiene actividad probiótica es de al menos de 10^{10} - 10^{11} UFC/g de producto.

20 Para la fabricación del producto liofilizado o secado, se suspende la biomasa húmeda en un medio líquido, por ejemplo agua o una disolución fisiológica estéril, con la inclusión de agentes protectores tales como por ejemplo leche desnatada, lactosa, glucosa, extracto de levadura, almidón de patata, glutamato de sodio, inositol, citrato de sodio, gelatina, maltodextrina, estearato de magnesio, ácido ascórbico, ácido esteárico y combinaciones de los mismos.

25 El producto liofilizado o secado se diluye entonces para la fabricación de probióticos con sustancias inertes seleccionadas por ejemplo de las indicadas anteriormente para la liofilización, tal como para obtener una carga bacteriana preferiblemente de al menos 10^9 UFC/g de producto. El producto liofilizado puede microencapsularse con el fin de aumentar la estabilidad a temperatura ambiente (18-24 meses).

30 Para la fabricación de un producto en el que la biomasa debe estar muerta (por ejemplo, un producto cosmético o algunos productos alimenticios, tales como productos de panadería), la biomasa enriquecida en cinc que puede lograrse mediante método de la invención se somete a métodos conocidos *per se*, tales como secado, para obtener células muertas.

35 La siguiente sección experimental se proporciona exclusivamente a modo de ilustración y no se pretende que limite el alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

40 Pruebas de captación de cinc intracelular

Con el fin de comparar el contenido en cinc intracelular total y estimar la capacidad de acumulación del metal a nivel citoplasmático o de membrana, se llevó a cabo un examen de cepas de microorganismos probióticos crecidas en medios con o sin sulfato de cinc.

45 Se inocularon cultivos de *Bifidobacterium* almacenados en infusión de MRS en MRS líquido y se incubaron de manera anaerobia a 37°C. Tras un periodo de crecimiento de 24 horas, se inocularon 120 ml (el 10% v/v) de MRS líquido solo y 120 ml (el 10% v/v) de MRS líquido complementado con ZnSO₄ 10 mM, respectivamente. Se incubaron estos cultivos en condiciones anaerobias a 37°C durante 48 horas. Se siguió el mismo procedimiento experimental para establecer pruebas de captación intracelular en *Streptococcus*. En este caso, se usó un medio M17 líquido y se incubaron los cultivos en condiciones anaerobias a 42°C durante 48 horas.

50 Al final del crecimiento, habiendo mantenido una pequeña alícuota para la determinación del peso en seco, se procedió a separar la biomasa del medio de cultivo mediante centrifugación y a mineralizar la biomasa recogida.

55 Mineralización de la biomasa

Con el fin de determinar el cinc intracelular total, se alteraron completamente las células bacterianas y entonces se mineralizó la biomasa según el protocolo notificado a continuación en el presente documento.

60 Se centrifugaron durante 30 minutos cien ml de cultivos crecidos a 4500 rpm (en una centrífuga enfriada hasta 4°C, centrífuga Beckman GS-15R) para recoger las células. Entonces se lavó el sedimento 4 veces, cada vez con 140 ml de agua destilada, con el fin de eliminar el cinc residual del sobrenadante. El cuarto lavado con agua se retuvo para analizar su contenido en cinc mediante la técnica de ICP.

65

Se mineralizó la biomasa resuspendiendo el sedimento en una razón de 1:1 (p/v) con una disolución de ácido nítrico HNO₃. Durante la optimización del procedimiento de mineralización, con el fin de lograr la recuperación total del cinc intracelular, se usaron concentraciones crecientes de disoluciones de ácido nítrico, del 0,65%, el 6,5% y el 20%, respectivamente.

Se transfirió cada suspensión celular así obtenida a tubos con tapa de rosca y se almacenaron a -20°C durante al menos 2 horas. Entonces se descongelaron los tubos con tapa de rosca en un baño con termostato a 100°C durante 30 minutos bajo una campana química: para evitar la evaporación y presión excesivas dentro de los tubos, se sellaron estos con tapones dotados de una aguja de vacío. Se enfriaron las disoluciones a temperatura ambiente, permitiendo que se desprendieran los vapores de la reacción. Al final del procedimiento de mineralización, se centrifugaron las suspensiones celulares a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C con el fin de recoger el extracto mineralizado y de eliminar los desechos celulares.

Análisis de cinc total mediante ICP

Para el análisis mediante ICP, se acidificaron las muestras al 2% con HNO₃ concentrado al 65% y luego se diluyeron con agua bidestilada hasta un volumen final de 5 ml. Estas operaciones se realizaron bajo una campana química. Se filtraron las disoluciones así obtenidas mediante el uso de filtros de acetato de celulosa de 0,8 µm (Millex-AA, Millipore) hasta que fueron completamente transparentes.

Se llevó a cabo la cuantificación del cinc intracelular acumulado por las cepas en examen mediante la técnica de ICP - AES (OES - OPTIMA 4200 DV, Perkin Elmer).

El sistema usa frecuencias de 40 MHz. La inyección de plasma está automatizada y controlada por un sistema electrónico conectado a un ordenador.

El argón usado debe ser puro al 99,99% y su flujo debe estar siempre en un intervalo de desde 0 hasta 20 litros/minuto, con aumentos variables de 1 litro/minuto. El flujo de muestra nebulizada debe producirse dentro de valores de flujo másico de desde 0 hasta 0,01 litros/minuto, con aumentos variables de 1 litro/minuto.

El nebulizador está compuesto por materiales resistentes a la corrosión, por lo que el sistema puede resistir disoluciones con concentraciones de HCl, HNO₃, H₂SO₄, H₃PO₄ del 50% (v/v), concentraciones de NaOH del 30% (v/v) y concentraciones de HF del 20% (v/v).

El espectrofotómetro consiste en un policromador que se encuentra en un compartimento con termostato a 38°C. El método de detección usado es CCD y la lectura se realiza en el campo UV.

Parámetros del análisis usados:

Resolución: alta

Flujo de gas de purga: normal

Tiempo de retardo de lectura (s): 45

Repeticiones: 3

Tiempo de lectura: auto

Tiempo mín.: 1.000 s - Tiempo máx.: 10.000 s

Retardo de equilibrado de fuente: 15 s

Tipo de aerosol de plasma: húmedo

Condiciones de puesta en marcha del nebulizador: instantánea

Con el fin de obtener la concentración de cinc desconocida, se usó una línea de calibración construida con las siguientes disoluciones patrón al 2% acidificadas con HNO₃: 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm y 10 ppm de cinc.

El cinc celular total se expresa en mg de metal por gramo de biomasa seca.

La concentración intracelular total del metal acumulado se definió mediante la técnica de ICP-AES descrita anteriormente acidificando las muestras obtenidas al 2% con HNO₃.

La figura 1 notifica las concentraciones de cinc intracelular (expresadas como mg de cinc intracelular por gramo de peso celular seco) medidas en pruebas de captación llevadas a cabo en cepas de diferentes especies de *Bifidobacterium*. Específicamente, las pruebas se realizaron en cepas de *B. infantis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. longum*. Todas las cepas analizadas muestran una concentración de cinc intracelular muy baja, con valores que se encuentran entre 0,01 y 0,20 mg/g_{DW}, cuando se hacen crecer en medio MRS libre de cinc. La adición al medio de cultivo MRS de sulfato de cinc 10 mM induce un aumento en la concentración de cinc intracelular. Sin embargo, tal como puede observarse a partir de la figura 1, las concentraciones del metal internalizado son bastante bajas y se encuentran entre 0,72 mg/g_{DW} y 2,12 mg/g_{DW} en las cepas de todas las especies, excepto en la cepa *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 BM (número de registro DSM 17850; fecha

de presentación 23 de diciembre de 2005) en la que la concentración de cinc intracelular aumenta hasta 53,32 mg/g_{DW} (un aumento de hasta 1.000 veces la concentración basal).

5 Tal como puede observarse a partir de la figura 2, se han logrado valores de cinc intracelular comparables con la cepa *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM (número de registro DSM 19526; fecha de presentación 13 de julio de 2007) crecida en medio M17 enriquecido con sulfato de cinc 10 mM cinc (concentración de cinc intracelular = 59,31 mg/g_{DW}) (serie 1). La figura 2 muestra además que las cepas que pertenecen a otras especies de *Streptococcus*, tales como *S. salivarius*, *S. faecium* y *S. lactis*, demuestran una capacidad mucho más baja para
10 acumular cinc intracelular cuando se hacen crecer en el mismo medio. Además, la figura muestra la comparación con las concentraciones de cinc intracelular detectadas cuando las cepas se hacen crecer en el mismo medio M17 sin sulfato de cinc añadido (series 2).

Ejemplo 1

15 Se esterilizaron 200 ml de medio M17 (Merck), al que se ha añadido sulfato de cinc 10 mM, en un frasco de 500 ml. Se inoculó un cultivo de siembra de *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM (número de registro DSM 19526; fecha de presentación 13 de julio de 2007), crecido previamente durante 24 horas a 42°C en condiciones anaerobias, en el frasco en la cantidad del 10% (v/v). Entonces se dejó crecer el cultivo durante 40 horas a 42°C en condiciones anaerobias. Se obtuvieron $2,73 \times 10^9$ UFC/ml al final del cultivo. Se recogió la biomasa mediante centrifugación y se
20 trató y se analizó según los métodos descritos anteriormente. El cinc total acumulado por las células fue de 59,31 mg/g_{DW}. D.W. = peso seco.

Ejemplo 2

25 Igual que en el ejemplo 1, usando medio SBF31 + Zn²⁺ 15 mM esterilizado por separado por filtración. Medio SBF31: triptona 23 g/l; peptona de soja 16 g/l; extracto de levadura 12 g/l; MgSO₄ 0,25 g/l; K₂HPO₄ 2,5 g/l; ácido ascórbico 0,5 g/l; glucosa 45 g/l; diglicerofosfato de Na 19 g/l.

30 Tiempo de fermentación: 21 horas; producción de células vivas: $5,3 \times 10^{10}$ UFC/ml; cinc acumulado: 51,67 mg/g_{DW}.

Ejemplo 3

Igual que en el ejemplo 1, usando medio SBF32 + Zn²⁺ 30 mM esterilizado por separado por filtración. Tras 21
35 horas, se obtuvieron 2,1 g/litro de biomasa seca que tenía una viabilidad de $3,15 \times 10^{10}$ UFC/ml; cinc acumulado: 63,42 mg/g_{DW}. Medio SBF32: triptona 23 g/l; peptona de soja 16 g/l; extracto de levadura 12 g/l; MgSO₄ 0,25 g/l; K₂HPO₄ 2,5 g/l; ácido ascórbico 0,5 g/l; lactosa 45 g/l; glicerina 19 g/l.

Ejemplo 4

40 Se inocularon 71 ml de medio M17, al que se había añadido sulfato de cinc 10 mM (esterilizado por separado por filtración) con 500 ml de líquido de cultivo de siembra del mismo medio M17 + sulfato de cinc 10 mM en el que se había hecho crecer previamente *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM (número de registro DSM 19526; fecha de presentación 13.7.2007) durante 24 horas a 42°C en condiciones anaerobias. Condiciones del fermentador: 150 rpm; 0,5 l de aire/l/min; temperatura: 42°C; pH ajustado a 4,8 (± 0,2) con NaOH al 10%; tiempo de fermentación: 21 horas.
45 Se obtuvieron $2,75 \times 10^{10}$ UFC/ml. El cinc total acumulado por las células fue de 57,2 mg/g_{DW}.

Ejemplo 5

Igual que en el ejemplo 4, pero se realizaron dos adiciones de Zn²⁺ 15 mM durante la fermentación a log12 y log18.
50 Tiempo de fermentación: 24 horas. Viabilidad celular al final de la fermentación: $2,25 \times 10^{10}$ UFC/ml. El cinc total acumulado por las células fue de 91,3 mg/g_{DW}.

Ejemplo 6

55 Se mantuvieron 300 ml de medio MRS (Merck) + cisteína, esterilizado a 120°C durante 30 minutos, al que se había añadido sulfato de cinc 10 mM esterilizado con filtro, en reducción previa durante no menos de 24 horas en entorno aerobio. Se inoculó un líquido de cultivo de siembra de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 BM (número de registro DSM 17850; fecha de presentación 23 de diciembre de 2005), crecido previamente durante 24 horas en el mismo medio en condiciones anaerobias a 37°C, en los 300 ml mencionados anteriormente al 10% (v/v) y se hizo
60 crecer en condiciones anaerobias durante 24 horas a 37°C. Se obtuvieron 1×10^{11} UFC/ml al final del cultivo. El cinc total acumulado por las células fue de 53,32 mg/g_{DW}.

Ejemplo 7

65 Se preparó un fermentador anaerobio de 15 litros equipado con una placa de agitación en lugar del eje con 10 litros de medio y en las mismas condiciones que en el ejemplo 6. Se ajustó el sulfato de cinc a 15 mM. Se inoculó el

fermentador con el 10% v/v de un líquido de cultivo de siembra de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 BM (número de registro DSM 17850; fecha de presentación 23 de diciembre de 2005) de 24 horas y se incubó a 37°C durante 24 horas. La cantidad de células vivas fue de 1×10^{11} UFC/ml. El cinc total acumulado por las células fue de 67,1 mg/g_{DW}.

5

Ejemplo 8

Se esterilizaron 90 ml de medio MRS que contenía cisteína al 0,05%, al que se había añadido sulfato de Zn 10 mM, en un frasco de 100 ml. Se inoculó un cultivo de siembra de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 BM, crecido previamente durante 24 horas a 37°C en condiciones anaerobias en el mismo medio, en el frasco en la cantidad del 10% v/v. Entonces se dejó crecer el cultivo durante 40 horas a 37°C en condiciones anaerobias. Se obtuvieron $3,12 \times 10^9$ UFC/ml al final del cultivo. Se recogió la biomasa mediante centrifugación y se trató y se analizó según el método dado a conocer. El Zn total acumulado por las células fue de 54,36 mg/g p.s.

Ejemplo 9

Se formularon 90 ml de medio basal mínimo (en gramos por litro) tal como sigue: Casaminoácidos (Difco Laboratories, Sparks, Md.), 15; base de nitrógeno de levadura (Difco Laboratories), 6,7; ácido ascórbico, 10; acetato de sodio, 10; (NH₄)₂SO₄, 5; urea, 2; MgSO₄·7H₂O, 0,2; Fe-SO₄·7H₂O, 0,01; MnSO₄·7H₂O, 0,007; NaCl, 0,01; Tween 80, 1; cisteína, 0,5 (pH ajustado a 7,0 y esterilizado en autoclave durante 30 minutos a 110°C). Se esterilizó en autoclave por separado uno de los siguientes hidratos de carbono (glucosa, fructo-oligosacáridos, inulina, rafinosa, lactosa, galacto-oligosacáridos, fructosa, galactosa o xilo-oligosacáridos) y se añadió al medio basal con el fin de lograr una concentración de 10 g/l. Se añadió adicionalmente sulfato de Zn 10 mM. Se inoculó un cultivo de siembra de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 BM, crecido previamente durante 24 horas a 37°C en condiciones anaerobias en el mismo medio, en el frasco en la cantidad del 10% v/v. Entonces se dejó crecer el cultivo durante 40 horas a 37°C en condiciones anaerobias. Se obtuvieron concentraciones de biomasa en el intervalo de desde $1,5 \times 10^8$ UFC/ml hasta $3,2 \times 10^9$ UFC/ml al final del cultivo. Se recogió la biomasa mediante centrifugación y se trató y se analizó según el método descrito. El cinc total acumulado en las células estaba en el intervalo de desde 48,12 hasta 54,37 mg/g p.s.

30

Ejemplo 10

Se esterilizaron 2 litros de medio MRS que contenía cisteína al 0,05% y al que se añadió sulfato de Zn 10 mM, en un biorreactor de 3,6 litros y se inocularon al 10% con un cultivo de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 BM crecido durante 24 horas en el mismo medio. Se esterilizó el biorreactor *in situ* y se presurizó con nitrógeno. Las condiciones del procedimiento fueron: insuflación de nitrógeno constante a 0,01, 150 rpm, 37°C, pH mantenido a 6,2 con NaOH 0,1 M. Tras 48 horas, la biomasa tenía una concentración de $3,6 \times 10^9$ UFC/ml. Se recogió la biomasa y se analizó para determinar la cantidad de cinc. El cinc total acumulado en las células fue de 53,81 mg/g p.s.

Ejemplo 11

Se esterilizaron 2 litros de medio MRS que contenía cisteína al 0,05% en un biorreactor de 3,6 litros y se inocularon al 10% con un cultivo de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 BM crecido durante 24 horas en el mismo medio. Se esterilizó el biorreactor *in situ* y se presurizó con nitrógeno. Las condiciones del procedimiento fueron: insuflación de nitrógeno constante a 0,01, 150 rpm, 37°C, pH mantenido a 6,2 con NaOH 0,1 M. Tras un periodo de crecimiento de 24 horas, se añadió sulfato de Zn al cultivo con el fin de lograr una concentración final de 10 mM. 24 horas desde la adición del metal, la biomasa tenía una concentración de $3,6 \times 10^9$ UFC/ml. Se recogió la biomasa y se analizó para determinar la cantidad de cinc. El cinc total acumulado en las células fue de 53,81 mg/g p.s.

Ejemplo 12

Se esterilizaron 10 litros de medio MRS que contenía cisteína 0,05% con una adición de sulfato de Zn 10 mM, en un biorreactor de 3,6 litros y se inocularon al 10% con un cultivo de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 BM crecido durante 24 horas en el mismo medio. Se esterilizó el biorreactor *in situ* y se presurizó con nitrógeno. Las condiciones del procedimiento fueron: insuflación de nitrógeno constante a 0,01, 150 rpm, 37°C, pH mantenido a 6,2 con NaOH 0,1 M. Una vez que el cultivo había terminado la acidificación, tal como se indica por la terminación de la atracción de NaOH, se suministró al cultivo en modo semicontinuo disolución de sulfato de Zn 10 mM y glucosa al 30%. Una vez alcanzado un volumen de 15 litros, la biomasa tenía una concentración de $1,2 \times 10^{10}$ UFC/ml y se recogió y se analizó para determinar la cantidad de cinc. El cinc total acumulado en las células fue de 52,15 mg/g p.s.

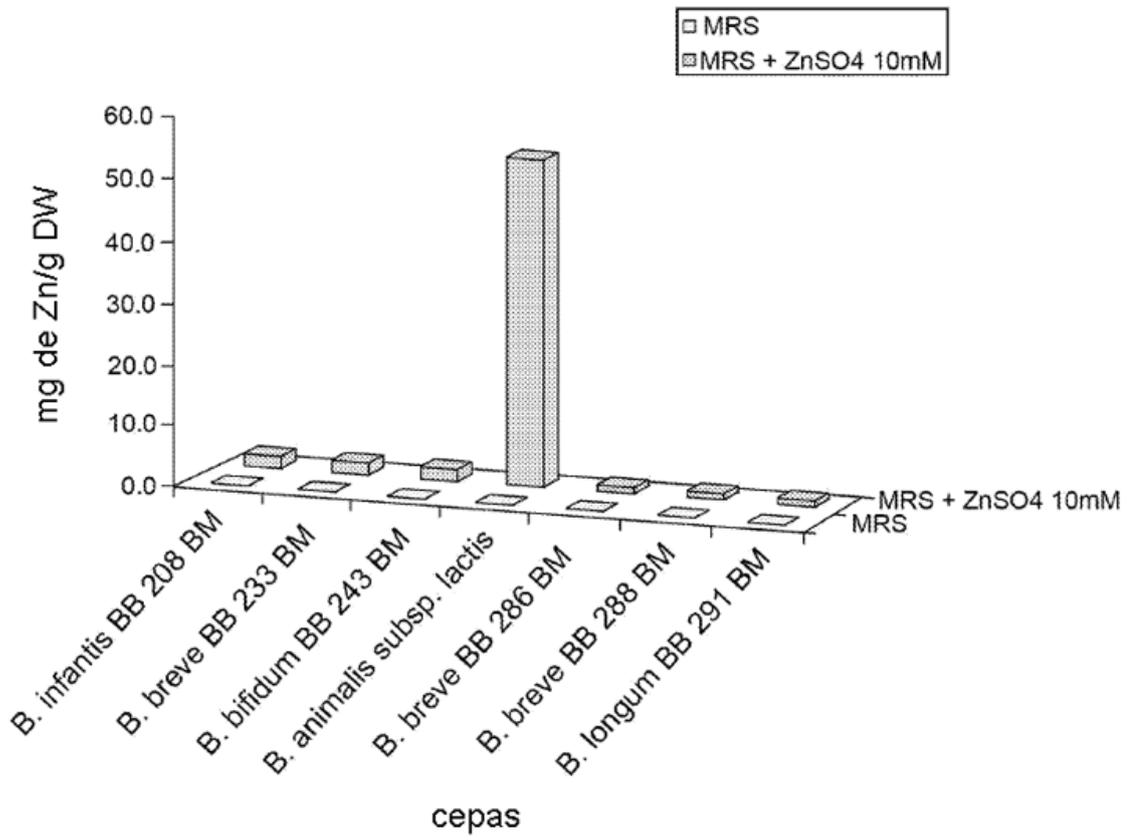
60

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de una biomasa enriquecida en cinc, caracterizado porque dicha biomasa se obtiene
 - i) cultivando microorganismos seleccionados del grupo que consiste en *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM, depositado según el Tratado de Budapest en la DSMZ, Braunschweig, Alemania, con el número de registro DSM 19526 el 13 de julio de 2007, y *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 BM, depositado según el Tratado de Budapest en la DSMZ, Braunschweig, Alemania, con el número de registro DSM 17850 el 23 de diciembre de 2005, y combinaciones de los mismos, en un medio de cultivo nutriente que comprende una sal de cinc, de modo que dichos microorganismos acumulan cinc; y
 - ii) separando los microorganismos enriquecidos en cinc del medio de cultivo.
2. Método según la reivindicación 1, en el que los microorganismos separados del medio de cultivo se someten a liofilización, secado, microencapsulación y/o congelación.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la sal de cinc es sulfato de cinc.
4. Método según la reivindicación 3, en el que el medio de cultivo nutriente comprende una cantidad de sulfato de cinc en el intervalo de desde 5 hasta 50 mM, preferiblemente desde 10 hasta 40 mM.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el medio de cultivo es un medio líquido.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el medio de cultivo comprende los nutrientes convencionales para el crecimiento de dichos microorganismos, seleccionados del grupo que consiste en sales inorgánicas, fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y micronutrientes, y mezclas de los mismos.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho medio de cultivo tiene un pH en el intervalo de desde 2,5 hasta 8,0, más preferiblemente en el intervalo de desde 3,5 hasta 7,5.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichos microorganismos se cultivan en dicho medio de cultivo a una temperatura en el intervalo de desde 25°C hasta 48°C, más preferiblemente en el intervalo de desde 35°C hasta 45°C.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dichos microorganismos se cultivan en dicho medio de cultivo durante de 6 a 40 horas, más preferiblemente de 8 a 36 horas.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichos microorganismos se separan del medio de cultivo por centrifugación o microfiltración.
11. Biomasa enriquecida en cinc que puede obtenerse mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Biomasa según la reivindicación 11, que comprende microorganismos vivos.
13. Biomasa según la reivindicación 12, como agente probiótico.
14. Uso de la biomasa según la reivindicación 12, para la fabricación de una composición que tiene actividad probiótica.
15. Uso según la reivindicación 14, en el que dicha composición que tiene actividad probiótica se selecciona del grupo que consiste en complementos alimenticios, productos dietéticos, productos alimenticios funcionales, productos nutracéuticos y preparaciones alimenticias.
16. Biomasa según la reivindicación 11, que comprende microorganismos muertos.
17. Uso de la biomasa según la reivindicación 16, para la fabricación de un producto cosmético o un producto alimenticio.
18. Composición que tiene actividad probiótica que comprende una biomasa viva enriquecida en cinc según la reivindicación 12, en combinación con vehículos y/o excipientes adecuados.
19. Composición según la reivindicación 18, con una carga bacteriana de al menos 10⁹ UFC/g.

ES 2 553 583 T3

20. Preparación alimenticia, complemento alimenticio, producto dietético, alimento funcional, producto nutracéutico o producto cosmeceútico, que comprende una composición según la reivindicación 18 ó 19.
- 5 21. Producto cosmético o alimenticio que comprende una biomasa según la reivindicación 16.
22. Microorganismo seleccionado de la cepa *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM, depositada según el Tratado de Budapest en la DSMZ, Braunschweig, Alemania, con el número de registro DSM 19526 el 13 de julio de 2007, y la cepa *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB 1 BM, depositada según el Tratado de Budapest en la DSMZ, Braunschweig, Alemania, con el número de registro DSM 17850 el 23 de diciembre de 2005.
- 10



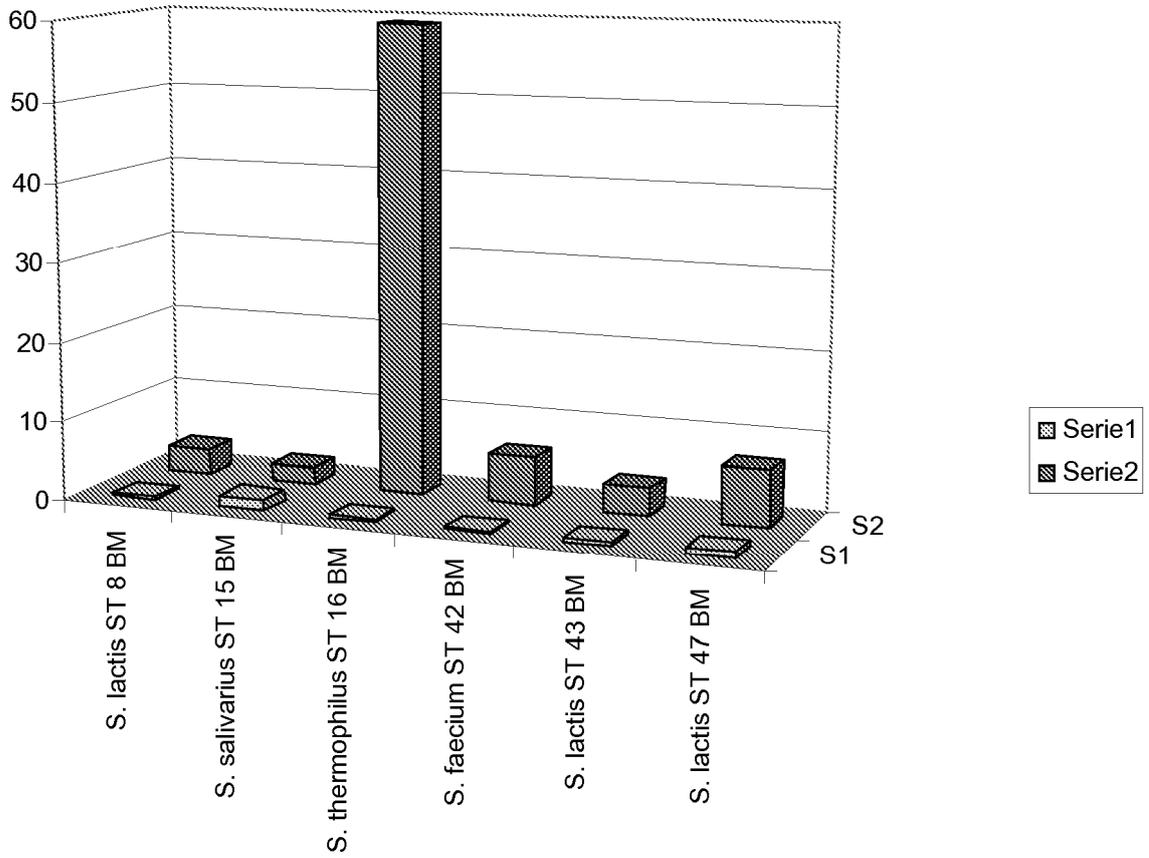


Fig. 2