

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 270**

51 Int. Cl.:

**C12P 11/00** (2006.01)

**C12P 7/00** (2006.01)

**C12P 7/40** (2006.01)

**C11B 1/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2016 PCT/US2016/062228**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17087488**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2016 E 16867017 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 3371318**

54 Título: **Procedimiento de producción y extracción de ácido dihidrolipoico**

30 Prioridad:

**17.11.2015 US 201514943185**

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

**05.12.2019**

73 Titular/es:

**PREMIER RESEARCH LABS, LP (100.0%)  
3500 Wadley Place, Building B  
Austin, TX 78728, US**

72 Inventor/es:

**MARSHALL, ROBERT, J.;  
LABINSKY, NICKOLAS;  
DUNHAM, LINDSEY;  
RATKOVICH, MICHAEL y  
TRIKOSKO, WALTER**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 734 270 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 producción y extracción de ácido dihidrolipoico

### 5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a la biotransformación de ácido R-lipoico a ácido dihidrolipoico (DHLA). El procedimiento fermenta el ácido lipoico con bacterias seleccionadas de entre el género de cualquiera de las siguientes bacterias: Lactobacillus, Enterococcus, Pediococcus o Bacillus. Más particularmente, la presente  
10 invención se refiere a un procedimiento para la extracción del DHLA usando un sistema de solvente no tradicional, a saber, un aceite alimenticio. En general, el DHLA que se produce en este procedimiento se aísla de las células que han sido inactivadas o muertas.

### ANTECEDENTES

15 El ácido dihidrolipoico es una sustancia nutritiva valiosa. Su producción y aislamiento se dificultan debido a la facilidad de oxidación a su forma disulfuro, a saber, ácido lipoico, bajo varias condiciones estándar.

El DHLA se produce normalmente dentro del cuerpo a través de la conversión redox del ácido lipoico o ácido alfa  
20 lipoico (ALA) durante la actividad metabólica normal. Sin embargo, el cuerpo generalmente solo produce una cantidad de DHLA suficiente para ayudar en la función metabólica. Sin embargo, se ha demostrado que DHLA, al menos en parte, es un agente antioxidante y quelante eficaz que puede usarse para eliminar especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de oxígeno (ROS) como, por ejemplo, oxígeno singlete, que puede contribuir a una serie de síndromes patológicos degradativos, como diabetes, glaucoma, aterosclerosis y otras neuropatías.  
25 También se ha descubierto que el DHLA, al menos en parte, es eficaz para prevenir o reparar el daño oxidativo en las células y para regenerar ciertos nutrientes importantes en el cuerpo como, por ejemplo, las vitaminas C y E. Sin embargo, no hay DHLA disponible comercialmente; solo el ALA que se deriva de fuentes no vivas que no presentan ADN y puede inducir la degradación del ADN celular, especialmente en el uso a largo plazo. Como resultado, se cree que dicho ALA usado en la célula para producir cantidades mínimas de DHLA no es beneficioso para el uso a  
30 largo plazo. A la inversa, el DHLA derivado de fuentes antaño vivas incluye el ADN que se sabe que respalda el ADN celular. En la Patente de los EE. UU. n.º 8.530.209 para Marshall, el ácido dihidrolipoico estabilizado (DHLA) para su uso en un medicamento o suplemento nutricional se deriva de una fuente que alguna vez vivió. En particular, el compuesto DHLA estabilizado puede derivarse de un medio de cultivo microbiológico que incluye al menos un organismo probiótico vivo, ácido R-lipoico y al menos un agente nutraceutico o nutritivo.

35 Es evidente que existe dificultad para aislar y/o estabilizar grandes cantidades de DHLA. Para fuentes naturales, se pueden aislar cantidades relativamente pequeñas *in vivo*, como se discutió anteriormente. Sin embargo, si se pudiera descubrir una manera de preparar y aislar grandes cantidades de DHLA *in situ*, esto representaría una valiosa contribución a las técnicas nutraceuticas y medicas. El documento de los EE. UU. 2005/112111 A1 describe  
40 un DHLA estabilizado, derivado de un medio de cultivo microbiológico que incluye al menos un organismo probiótico vivo, ácido R-lipoico y al menos un agente nutritivo. El DHLA estabilizado se puede preparar dispersando los medios microbiológicos en agua destilada para formar un caldo, incubando el caldo a una temperatura predeterminada durante un período de tiempo selecto para inducir la actividad probiótica, agregando etanol orgánico al caldo para detener la actividad probiótica, y separando el DHLA estabilizado derivado del caldo. La composición se usa en un  
45 medicamento o en un suplemento nutricional.

### RESUMEN

50 Esta invención se refiere a la biotransformación del ácido lipoico a ácido dihidrolipoico (DHLA) mediante el uso de bacterias.

Un objeto general de la invención es proporcionar un procedimiento para producir compuestos beneficiosos que incluyen DHLA, o una sal del mismo, para su uso en un medicamento o un suplemento nutricional.

55 En una realización de la presente invención, se describe un procedimiento para producir DHLA que incluye la dispersión de un medio de cultivo microbiológico, el cual incluye al menos un organismo probiótico vivo, ácido R-lipoico y/o al menos un agente nutritivo, en agua destilada para formar un caldo; la incubación del caldo a una temperatura predeterminada durante un período de tiempo seleccionado para inducir la actividad probiótica, con la adición opcional de etanol orgánico para detener la actividad probiótica; y la separación del compuesto deseado del  
60 caldo mediante una extracción con aceite de oliva.

En otra realización, se describe un procedimiento para la producción de ácido dihidrolipoico (DHHLA), o una sal del mismo, que comprende las etapas de:

- 5 (a) preparar un cultivo microbiológico que comprenda al menos una especie de las siguientes: *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., o *Bacillus* spp.;
- (b) tratar un caldo acuoso que contiene melaza, N-acetil-L-cisteína, proteína de arroz, levadura nutricional, azúcar, una o más sales minerales, uno o más nucleótidos y un primer aceite comestible con el cultivo microbiológico para formar un caldo microbiano;
- 10 (c) incubar el caldo microbiano a una temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 40 °C durante un período de alrededor de 48 horas como mínimo;
- (d) alimentar el caldo microbiano con ácido R-lipoico, rizoma de cúrcuma, N-acetil-L-cisteína, glutatión, L-arginina y dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH);
- (e) ajustar el pH a aproximadamente 8,0;
- 15 (f) incubar el caldo microbiano durante un período de alrededor de 10 días como mínimo;
- (g) opcionalmente, alimentar el caldo microbiano después de al menos 12 días con melaza, proteína de arroz, levadura nutricional y natamicina;
- (h) opcionalmente, ajustar el pH a aproximadamente 8,0;
- (j) incubar el caldo microbiano desde un período de alrededor de 2 días como mínimo hasta alrededor de 9 días;
- 20 (k) ajustar el pH a aproximadamente 2,0;
- (l) agregar un segundo aceite comestible en un volumen aproximadamente del 60 al 100 % del volumen total del caldo microbiano, y agua en un volumen aproximadamente del 100 % del volumen total del caldo microbiano para formar dos capas;
- (m) mezclar la capa de aceite comestible y la capa acuosa para efectuar la extracción del DHHLA, o una sal del
- 25 mismo, en la capa de aceite comestible; y
- (n) separar la capa de aceite comestible que contiene DHHLA, o una sal del mismo.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 30 La fig. 1 representa un esquema de una realización de un procedimiento de fermentación en bloque realizado en modo discontinuo para la producción de DHHLA contenido en una capa de aceite.

La fig. 2A representa en una realización un reactor representativo sobre un patín, usado según los principios del procedimiento de fermentación en bloque.

- 35 La fig. 2B representa una vista desde arriba del patín del reactor de la fig. 2A, que muestra varios puertos ejemplares para su uso en el procedimiento de fermentación en bloque. Se muestra el diseño del puerto y las descripciones de cada puerto.

- 40 La fig. 3 muestra la conversión del DHHLA en mg/ml producido a lo largo del tiempo en el procedimiento de fermentación en bloque y antes de la adición del aceite de oliva.

La fig. 4A representa una cromatografía en fase líquida de alta eficacia (HPLC) del estándar analítico del DHHLA.

- 45 La fig. 4B representa una cromatografía HPLC de una muestra de DHHLA producida después de 14 días de fermentación según una realización del procedimiento de fermentación en bloque.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 50 Durante las últimas décadas, las industrias médica, farmacéutica y nutricional han demostrado un mayor interés en el uso de medicamentos tradicionales a base de hierbas y/o homeopáticos para el tratamiento y/o prevención de una variedad de enfermedades, así como para el mantenimiento de una buena salud y función corporal. Los avances en los campos de la biología, la química y la medicina han permitido a los investigadores estudiar más de cerca y con precisión el impacto y los efectos de varios compuestos en el cuerpo humano y su gran cantidad de procedimientos
- 55 metabólicos y fisiológicos. Tales avances han conducido a una mejor comprensión de la absorción de muchos compuestos como, por ejemplo, nutrientes, vitaminas, minerales y otros compuestos naturales o sintéticos, y el papel que desempeñan estos compuestos en el funcionamiento diario del cuerpo.

- 60 Un área de estudio se ha centrado en comprender los efectos fisiológicos de las "especies reactivas de oxígeno" (ROS). Las ROS son subproductos de los procedimientos metabólicos normales de los organismos vivos. Las ROS

incluyen los radicales libres derivados del oxígeno y los derivados no radicales que pueden causar daño oxidativo a las estructuras biológicas. También se ha demostrado que las ROS desempeñan un papel en el procedimiento de envejecimiento y una serie de síndromes patológicos como, por ejemplo, la diabetes. Sin embargo, el daño oxidativo causado por las ROS puede reducirse o prevenirse a través de una serie de mecanismos como, por ejemplo, el uso de antioxidantes que pueden reaccionar directamente con las ROS en el cuerpo.

Si bien es posible usar varios agentes nutracéuticos o nutritivos en los medios de cultivo microbiológicos de la invención, los agentes nutracéuticos o nutritivos adecuados deberían contribuir a la producción del compuesto beneficioso deseado así como a la estabilidad de los medios microbiológicos. El o los agentes nutracéuticos o nutritivos particulares usados en los medios de cultivo microbiológicos dependerán del compuesto beneficioso a derivar. Por ejemplo, si el compuesto beneficioso a derivar del medio de cultivo microbiológico es ácido dihidrolipoico (DHLA) estabilizado, el agente nutritivo contenido en el medio microbiológico puede ser el rizoma de la cúrcuma (*curcuma longa*). En otra realización preferida, el agente nutracéutico o nutritivo usado en los medios de cultivo microbiológico puede ser una forma sintética o el precursor del compuesto beneficioso a derivar, o bien puede ser una fuente natural del compuesto beneficioso, tal como, por ejemplo, una planta o hierba, la cual debe ser procesada para aislar el compuesto beneficioso.

Los posibles usos del DHLA incluyen su uso como nutracéutico o ingrediente farmacéutico activo (API) para neutralizar los radicales libres, evitando que causen daño. El mismo destruye directamente los radicales superóxido dañinos, radicales hidroperoxi y radicales hidroxilo. Se ha demostrado *in vitro* que el dihidrolipoato (ácido DL-6,8-ditiooctanoico) presenta una actividad antioxidante contra la peroxidación lipídica microsomal. El dihidrolipoato se analiza en cuanto a su actividad neuroprotectora usando modelos de daño neuronal hipóxico y excitotóxico *in vitro* y modelos de roedores de isquemia cerebral *in vivo*. El dihidrolipoato, al igual que la dimetilurea, puede proteger a las neuronas contra el daño isquémico al disminuir la acumulación de especies reactivas de oxígeno dentro del tejido cerebral.

El procedimiento descrito en la presente invención proporciona una manera de producir grandes cantidades de DHLA en un tiempo relativamente corto. Además, el procedimiento de extracción proporciona una manera de extraer el DHLA y el ácido lipoico sin los solventes convencionales que se usan normalmente en el procedimiento de extracción. Este procedimiento no deja residuos de solventes que normalmente estarían presentes en el producto final de todos los procedimientos de extracción de solventes.

En un aspecto, el procedimiento en su realización principal contiene los siguientes ingredientes para producir DHLA *in situ*. Con esta fórmula, la relación de conversión no es tan alta como en otros procedimientos ejemplares, y la cantidad de tiempo que lleva alcanzar la conversión máxima supera los 21 días.

Lactobacillus fermentum

40 Ácido R-Lipoico

Cúrcuma (fuente de rizoma)

N-acetil-L-cisteína

45 NADH

Melaza

Agua RO

50

Hidróxido de sodio

Ácido clorhídrico

55 Aceite de oliva

Proteína de arroz

Hojuelas de levadura

60

Azúcar de caña orgánica

Sulfato de manganeso

5 Sulfato de magnesio

Fosfato dipotásico

Natamicina

10

En general, es posible usar los sistemas solventes que disuelven el ácido R-lipoico para extraer el DHLA. Sin embargo, se prefieren los disolventes que no son miscibles con agua para evitar extraer los componentes solubles en agua, o al menos minimizar la coextracción de tales componentes. Las bacterias usadas también pueden ser alteradas. La mayoría de las bacterias producen DHLA. Las especies bacterianas descritas en la presente invención

15

y enumeradas son algunas de las más eficientes cuando se usan en la producción de DHLA, por ejemplo, y producen el mayor rendimiento.

En otra realización, los siguientes ingredientes se usan para producir DHLA a gran escala *in situ*.

20 Lactobacillus fermentum

Lactobacillus casei

Ácido R-Lipoico

25

Cúrcuma

Glutación N-acetil-L-cisteína

30 L-Arginina

NADH

Melaza

35

Agua RO

Hidróxido de sodio

40 Ácido clorhídrico

Aceite de oliva

Proteína de arroz

45

Hojuelas de levadura

Azúcar de caña orgánica (como sacarosa)

50 Sulfato de manganeso

Sulfato de magnesio

Fosfato Dipotásico

55

Natamicina

Los nucleótidos nucleocelulares están disponibles de manos de Future Food, Santa Rosa, California.

60 Los minerales australianos están disponibles de manos de Symbio Alliance, Eight Mile Plains, Q4113, Australia.

La Natamicina al 50 % está disponible de manos de ProFood International, Inc., Lisle, Illinois.

Un aceite de oliva útil para la extracción es el aceite de oliva Cibaria Moroccan, Riverside, California.

5

De manera alternativa, es posible usar otros aceites naturales en el presente procedimiento con el propósito de extraer el DHLA. Los aceites adecuados incluyen aceites comestibles, incluidos aceites alimenticios o vegetales que se pueden usar en realizaciones del procedimiento, y también incluyen, pero no se limitan a, aceite de semillas de uva, aceite de sésamo, aceite de borraja, aceite de pescado, aceite de espinillo amarillo, aceite de lino, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de canola, aceite de jojoba, aceite de maíz, aceite de palma, aceite de onagra, aceite de cártamo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de palma, aceite de semillas de algodón, aceite de almendra, aceite de anacardo, aceite de avellana, aceite de macadamia, aceite de nuez pecan, aceite de pistacho, aceite de nuez, aceite de acai, aceite de grosella negra, aceite de albaricoque, aceite de argán, aceite de alcachofa, aceite de aguacate, aceite de babasú, aceite de behen, aceite de nuez de sebo de Borneo, aceite de calabaza búfalo, aceite de vaina de algarroba, aceite de semillas de cilantro, aceite de lino falso, aceite de cáñamo, aceite de semillas de kapok, aceite de lallemantia, aceite de semillas de hierba de la pradera, aceite de mostaza, aceite de semillas de quimbombó, aceite de semillas de perilla, aceite de pequi, aceite de piñones, aceite de semillas de amapola, aceite de semillas de ciruelas pasas, aceite de semillas de calabaza, aceite de quinua, aceite de ramtil, aceite de salvado de arroz, aceite de té, aceite de cardo y aceite de germen de trigo. Además, se puede usar acetato de isoamilol como extractor en el procedimiento.

Es posible usar uno o más aceites comestibles en el procedimiento de producción para la biotransformación del ácido lipoico a DHLA. El primer aceite comestible y el segundo aceite comestible pueden ser iguales o diferentes, y el aceite comestible se selecciona de entre el grupo que consiste en aceite alimenticio, aceite vegetal, aceite botánico, aceite de semillas de uva, aceite de sésamo, aceite de borraja, aceite de pescado, aceite de espinillo amarillo, aceite de lino, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de canola, aceite de jojoba, aceite de maíz, aceite de palma, aceite de onagra, aceite de amaranto, aceite de cártamo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de palma, aceite de semillas de algodón, aceite de almendra, aceite de anacardo, aceite de avellana, aceite de macadamia, aceite de nuez pecan, aceite de pistacho, aceite de nuez, aceite de acai, aceite de grosella negra, aceite de albaricoque, aceite de argán, aceite de aguacate, aceite de babasú, aceite de behen, aceite de nuez de sebo de Borneo, aceite de calabaza búfalo, aceite de vaina de algarroba, aceite de semillas de cilantro, aceite de lino falso, aceite de cáñamo, aceite de semillas de kapok, aceite de lallemantia, aceite de semillas de hierba de la pradera, aceite de mostaza, aceite de semillas de quimbombó, aceite de semillas de perilla, aceite de pequi, aceite de piñones, aceite de semillas de amapola, aceite de semillas de ciruelas pasas, aceite de semillas de calabaza, aceite de quinua, aceite de ramtil, aceite de salvado de arroz, aceite de té, aceite de cardo y aceite de germen de trigo.

La biotransformación se lleva a cabo en un procedimiento de fermentación para la producción de DHLA, usando ácido lipoico como materia prima. Se entiende que el cultivo microbiológico contiene células bacterianas de una o más especies como se describe. El cultivo microbiológico se usa para preparar un caldo microbiano que contiene levadura.

Como principio general, el caldo proporcionado por la lista de ingredientes anterior contiene varias ventajas inesperadas y propiedades beneficiosas. Sin limitarse a la teoría, el caldo de fermentación incluye las siguientes propiedades en términos de uno o más de los componentes. La proteína de arroz y la L-cisteína (es decir, en forma de N-acetil-L-cisteína) pueden proporcionar compuestos nitrogenados y carbonosos. Los copos de levadura proporcionan vitaminas B esenciales y el azúcar de caña orgánica (sacarosa) es la fuente de energía y carbohidratos fermentables. El aceite de oliva (porción de caldo) suministra ácido oleico y otros ácidos grasos necesarios para el metabolismo de los lactobacilos. El sulfato de magnesio y el sulfato de manganeso proporcionan iones esenciales para la multiplicación de los lactobacilos. La sal de fosfato proporciona una buena acción amortiguadora. La natamicina previene el crecimiento de hongos y levaduras. El glutatión, la L-arginina, la N-acetil-L-cisteína y el NADH son promotores del crecimiento y agentes reductores. La cúrcuma puede prevenir la polimerización del ácido R-lipoico (como materia prima del material de partida). Los nucleótidos se usan como factor(es) de crecimiento. Los minerales australianos pueden proporcionar minerales esenciales. La melaza proporciona factores de crecimiento adicionales para los organismos *Lactobacillus*.

Los procedimientos descritos anteriormente se pueden entender mejor en relación con los siguientes ejemplos. Además, para ilustrar la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos no limitantes.

## 60 EJEMPLO 1

Procedimiento de fermentación en bloque de DHLA (modo por lotes) (1) Se prepara un cultivo de inoculación de 48 horas a partir del cultivo de reserva de L. Casei y L. Fermentum de la siguiente manera.

5 (1A) Preparación de inóculo de Lactobacillus casei: El inóculo de Lactobacillus casei se preparó 48 horas antes de la fecha de inicio de la mezcla. Se agregaron diez (10) gramos de materia prima (0022) 10 mil millones de CFU/g de Lactobacillus casei liofilizado de Nebraska Cultures, Inc. a 500 mL de caldo MRS suministrado por Edge Biologicals, Inc. n.º de catálogo B-0965 Memphis, TN. El inóculo se incubó a 37°C con una atmósfera del 90 % de N<sub>2</sub>: 5 % de CO<sub>2</sub>: 5 % de O<sub>2</sub>. Después de la incubación de 48 horas, el inóculo de 500 mL se lavó dos veces con tampón fosfato  
10 usando la centrifugadora. Después, se reconstituyeron los sedimentos lavados con un total de 100 mL de tampón fosfato y se combinaron en un recipiente para inocular el lote del bloque de fermentación de DHLA.

(1b) Preparación de inóculo de Lactobacillus Fermentum: El inóculo de Lactobacillus fermentum usado se aisló del kéfir. El cultivo madre de glicerol creado siguió la instrucción de trabajo del Programa de Cultivo Madre FM9802-11.  
15 Este inóculo se preparó 48 horas antes de la fecha de inicio de la mezcla. Se agregó un raspado caldo de glicerol de L. Fermentum (Lote # 2014-30.04) a 500 mL del caldo MRS suministrado por Edge Biologicals, Inc. n.º de catálogo B-0965 Memphis, TN. El inóculo se incubó a 37°C con una atmósfera del 90 % de N<sub>2</sub>: 5 % de CO<sub>2</sub>: 5 % de O<sub>2</sub>. Después de la incubación de 48 horas, el inóculo de 500 mL se lavó dos veces con tampón fosfato usando la centrifugadora. Después, se reconstituyeron los sedimentos lavados con un total de 100 mL de tampón fosfato y se  
20 combinaron en un recipiente para inocular el lote del bloque de fermentación de DHLA.

(2) El cultivo de inoculación se lava dos veces. El lavado implica centrifugar las células, decantar el sobrenadante y después sumergir las células en agua RO. (3) El medio se prepara mezclando melaza (14 kg) en caldo PRL (como en la tabla 1 a continuación) e inoculando con los cultivos celulares de la etapa (2) ("el inóculo"). Este medio está  
25 dentro de un sistema de cultivo que permite la agitación de intervalos en el reactor que se describe a continuación. Los ajustes de intervalo son 3 minutos a 150 RPM y un descanso de 1 minuto. Por lo tanto, los ingredientes anteriores se agregan al reactor configurado a 36,67°C (98°F), con las condiciones atmosféricas de 5 % de CO<sub>2</sub>:5 % de O<sub>2</sub>:90 % de N<sub>2</sub>.

30

TABLA 1

Nombre del artículo	Fuente	Cantidad usada
N-acetil-L-cisteína	Selva amazónica	350,0 g
Proteína de arroz integral 80 %	Axiom Foods	7,0 Kg
Levadura nutricional	Amcor Rigid Plastics USA, Inc.	7,0 Kg
Melaza	Edulcorantes saludables	14,0 Kg
Azúcar de caña	Selva amazónica	6,3 Kg
Nucleótidos nucleocelulares	Future Foods	1,4 Kg
Aceite de oliva	Cibaria	700,0 g
Monohidrato de sulfato de manganeso	Jost Chemical CO.	39,2 g
Heptahidrato de sulfato de magnesio	Jost Chemical CO.	143,4 g
Líquido mineral australiano	Symbio Alliance	1,1 Kg
Fosfato dipotásico	ProFood International, Inc.	1,4 Kg
Natamicina al 50 %	ProFood International, Inc.	25,2 Kg
Agua, purificada	In House	331,0 Kg
Inóculo de Lactobacillus Casei	Nebraska Cultures	1 u., como arriba
Inóculo de Lactobacillus Fermentum	In House Kefir Isolate	1 u., como arriba

Reactor y equipo (véanse también las figuras 2A y 2B).

35 Todas las modificaciones al reactor de acero inoxidable DCI de 150 galones fueron realizadas de manera interna por el departamento de mantenimiento. Se usaron siete de los once puertos disponibles en el recipiente para crear la atmósfera requerida y adquirir todos los datos pertinentes a este procedimiento. La capacidad de contar con un recipiente sellado herméticamente es esencial para regular la atmósfera. Los esquemas del recipiente se muestran en la figura 2A.

40 Los diseños de puertos y las descripciones de cada puerto se definen en la figura 2B. Todas las lecturas de pH se realizaron con un medidor de pH Accumet Ab15 que se calibró diariamente. El electrodo de pH de monitoreo de flujo de Hannah Instruments se usó como ayuda secundaria para medir el pH en tiempo real dentro del recipiente durante el procedimiento de ajuste. Todas las lecturas de temperatura se midieron usando una sonda de datos de Dickson

## ES 2 734 270 T3

con acceso en vivo a las lecturas de temperatura en línea. El rango de temperatura para este proyecto fue de 85 a 105°F. Todas las condiciones atmosféricas se monitorearon usando el medidor de biogás de dióxido de carbono y oxígeno y registrador de datos de muestreo iSense. La tabla 2 describe cada proveedor y número de pieza para todas las piezas usadas para modificar el recipiente.

5

Por consiguiente, el equipo que se usó para mejorar el reactor y adquirir los datos se incluye en la tabla 2.

TABLA 2

Fuente	Pieza n.º	Descripción
DCI	96-PH-53798	Reactor portátil de 150 galones
Praxair	PRS 30021331570	Regulador de oxígeno
Praxair	PRS 30021531320	Regulador de dióxido de carbono
Praxair	PRS 502S1332- 580	Estación múltiple ProStar SS
Cole-Parmer	T-03214-36	Estructura de medición de flujo de gas multitubular
Cole-Parmer	T-32047-04	Tubo de flujo de dióxido de carbono 0-1 LPM
Cole-Parmer	T-32047-20	Tubo de flujo de nitrógeno 0-12 LPM
Cole-Parmer	T-32042-26	Tubo de flujo de oxígeno 0-1 LPM
Cole-Parmer	T-03218-67	Cartucho de válvula de alta resolución 201-100 mL/min x 2 unidades
Cole-Parmer	T-03218-70	Cartucho de válvula de alta resolución 6201+ mL/min
McMaster-Carr	3184K7	Tubo de caucho de silicona blanca resistente al aplastamiento x 25'
Cole-Parmer	T-06490-17	Tubo Bev-A-Line IV 3/8 "ID x 50'
Cole-Parmer	T-06490-19	Tubo Bev-A-Line IV 1/2 "ID x 50'
CO2Meter.com	CM-0200	medidor de biogás de dióxido de carbono y oxígeno y registrador de datos de muestreo iSense
CO2Meter.com	DAS0100	Software de adquisición de datos
Hannah Instruments	HI 1001	Electrodo de pH de control de flujo
Hannah Instruments	BL 931700	Mini controlador de pH
Dataq Instruments	EL-USB-4	Registrador de datos de bucle actual
Lascar	EL-WIN-USB	Software EasyLog
Dickson.	14240101	Sonda de temperatura y registrador de datos
McMaster-Carr	38705K38	Sonda RTD
McMaster-Carr	Varios	Accesorios de tubo de púas de nylon blanco para alimentos y bebidas

10 (4) En el día 3: El ácido R-lipoico, la cúrcuma, la N-acetil-L-cisteína, el glutatión, la L-arginina y el NADH se agregan al lote como se indica en la tabla 3.

TABLA 3

Nombre del artículo	Fuente	Cantidad usada
Ácido R-lipoico	Watson Industries, Inc.	8,75 Kg
Cúrcuma	Jiaherb	9,63 Kg
NADH	Maypro Industries, LLC.	350,0 g
N-acetil-L-cisteína	Selva amazónica	3,5 Kg
Glutatión	GWJ	3,5 Kg
L-Arginina	Chementry Industries Inc.	3,5 Kg

15 (5) El lote se ajusta al pH en 10 minutos usando hidróxido de sodio al 50 % a un pH de 8,0 y después se mantiene a 37°C en una atmósfera de 5 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub>.

(6) El lote se fermenta durante 14-21 días (incluidos los pasos 7 y 8). Nota: durante el procedimiento en los días 3-

13, el pH se ajusta a 8.0 (+/- 0.5) con hidróxido de sodio al 50 %.

(7) A partir del día 3, el lote se ajusta a un pH diario desde un pH ácido hasta un pH de 8.0 con hidróxido de sodio. Una vez que se alcanza y mantiene un pH de 8, los ajustes se detienen y se reinician según sea necesario.

- 5 (8) En el día 12: el lote se alimenta con melaza, proteína de arroz, hojuelas de levadura y natamicina (50 %), en agua, como en la tabla 4. Además, el pH se reajusta nuevamente a 8.0 después de esta alimentación.

TABLA 4

Nombre del artículo	Fuente	Cantidad usada
Proteína de arroz integral 80 %	Axiom Foods	1,75 Kg
Levadura nutricional	Amcor Rigid Plastics USA, Inc.	1,75 Kg
Melaza	Edulcorantes saludables	1,75 Kg
Natamicina al 50 %	ProFood International, Inc.	12,5 g
Agua, purificada	In House	1,0 Kg

- 10 (9) Una vez que se completa la fermentación y el lote alcanza una conversión de no menos del 70 % (como se muestra a continuación), el lote se ajusta al pH con ácido clorhídrico a un pH de 2.0. Generalmente la fermentación se completa entre los días 14 y 21. En una realización preferida, la fermentación se completa después de aproximadamente 14 días. (9a) Protocolo de HPLC para el análisis del DHLA

- 15 Las muestras se recolectaron diariamente, a partir del día 3, para monitorear la conversión de DHLA usando el análisis de conjuntos de diodos HPLC-UV Vis en un sistema de HPLC de red Dionex Chromeleon 7. La tabla 5 define todos los reactivos y estándares usados y la tabla 6 define todos los equipos y suministros generales usados para el análisis de HPLC.

20

TABLA 5

Reactivo	Grado de pureza química
Ácido fosfórico, 85 %	Grado de HPLC o mejor
Agua (H <sub>2</sub> O)	Grado de HPLC o mejor
Acetonitrilo (ACN)	Grado de HPLC o mejor
Glutación	Materias primas
N-acetil-L-cisteína	Materias primas
Ácido alfa lipoico	Estándar de referencia analítica
Ácido dihidrolipoico	Estándar de referencia analítica

TABLA 6

Componente	Descripción o pieza n.º
Pipeta	Ajustable a 2 mL o 1-5 mL
Filtros de jeringa	25 mm Nylon o PVDF
Objetos de vidrio para laboratorios	Varios clase A
Microbalanza con	Mettler Toledo UMX2 o equivalente
Balanza analítica	Denver Instruments SI-234 o equivalente
Sistema HPLC	Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 con fotodiodo
Bomba de HPLC	LPG-3400SD o DGP-3600SD, o equivalente
Procesador de muestras HPLC automático	WPS-3000TSL Analytical o equivalente
Horno de columna HPLC	TCC-3000SD o equivalente
Columna de HPLC	Polar Advantage II C18 150 x 4,6 mm, 5 µm o equivalente
Detector HPLC	VWD-3400RS o DAD-3000, o equivalente
Sistema de datos	Dionex Chromeleon versión 7.0 o superior

- 25 Las muestras de productos tanto en procedimiento como terminadas se analizaron siguiendo el procedimiento de prueba TM9802-095. Las muestras de fermentación en bloque se prepararon diariamente pipeteando 2.000 mL de muestra en un matraz volumétrico de 50 mL y diluyendo a volumen con un diluyente de fermentación en bloque de DHLA (0,1 % p/v de glutación y N-acetil-L-cisteína, 0,1 % de ácido fosfórico v/v en acetonitrilo/di-agua (499:499:2)). Las muestras se filtraron usando filtros de jeringa en viales de HPLC, descartando los primeros 1-2 mL de filtrado.

Las muestras de productos terminados se prepararon pipeteando 2.000 ml de muestra en un matraz volumétrico de 50 ml y diluyendo a volumen con IPA. Las muestras se filtraron usando filtros de jeringa en viales de HPLC, descartando los primeros 1-2 mL de filtrado. Las condiciones representativas de HPLC se describen en la tabla 7 a continuación.

5

TABLA 7

Componente/Condición	Descripción																					
Columna	Thermo Betasil C18 250 x 4,6 mm, 5 µm																					
Fase móvil A	0,1 % de fosfato																					
Fase móvil B	ACN																					
Fase móvil C	Cualquier alcohol (7,3)																					
Temp. de la muestra	5 °C																					
Tiempo de ejecución	12 minutos																					
Programa de gradientes	<p style="text-align: center;">Tabla de gradientes</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Minuto</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>	Minuto	%A	%B	0	50	50	5	50	50	6	0	100	8	0	100	9	50	50	14	50	50
Minuto	%A	%B																				
0	50	50																				
5	50	50																				
6	0	100																				
8	0	100																				
9	50	50																				
14	50	50																				
Longitud de onda	200 nm																					
Velocidad de flujo	1,0 mL/min																					
Temp. de la muestra	5 °C																					
Temp. de la columna	40 °C																					
Volumen de inyección	10 µL																					
Tiempo de ejecución	14 minutos																					

Resultados de HPLC de la conversión de bloques de fermentación de DHLA.

Todas las muestras realizadas diariamente se ejecutaron en la HPLC para rastrear la progresión de la conversión de DHLA. La tabla 8 muestra los resultados de cada día hasta el procesamiento (consulte también, gráfico de líneas en la Fig. 3). Se preparó un estándar DHLA diariamente y se inyectó a diferentes volúmenes para formar una curva con el fin de calcular el área de cada pico. Se observó una progresión continua de la conversión de DHLA cada día después del día 7 (figura 3). La figura 4A muestra una cromatografía HPLC del estándar DHLA, y la figura 4B muestra una cromatografía HPLC de una muestra de DHLA producida después de 14 días de fermentación.

15

TABLA 8

Día	Mg/ml de DHLA	% de área rel.
3	0,8	6,8
4	0,6	4,9
5	0,6	4,9
6	0,5	4,1
7	0,5	4,1
8	1,7	13,6
9	4,6	34,0
10	6,9	49,8
11	9,1	59,1
12	10,3	67,6
13	11,6	74,1
14	13,2	78,8

(10) Se agrega aceite de oliva al lote a un volumen de caldo total del 60 al 100 % y se agrega agua al lote al 100 % del volumen del caldo.

20

(11) Después, el lote se mezcla durante no menos de 45 minutos para extraer el aceite de DHLA del caldo acuoso.

(12) Después de mezclar, el caldo se deja reposar (o se centrifuga). La centrifugación eliminará la mayor parte de materia celular residual.

5 (13) Después de sedimentar, la capa de aceite de oliva que contiene DHLA se extrae con un sifón.

En una realización, la capa de aceite que contiene DHLA aislada se puede analizar para determinar el contenido de DHLA o la actividad antioxidante.

10 En una realización, la capa de aceite de oliva resultante que contiene DHLA puede presentar una concentración de DHLA de aproximadamente 10 mg/ml. En otra realización, la capa de aceite de oliva resultante que contiene DHLA puede presentar una concentración de DHLA de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml.

En otra realización del procedimiento, las células bacterianas pueden ser lisadas o inactivadas por medio de etanol.

15 Es decir, las células pueden ser inactivadas o eliminadas. Dicho de otra manera, las células muertas pueden ser consideradas "una vez en vida". Dicho de otra manera, las células lisadas o inactivadas pueden presentar un "estado celular" donde el recuento de CFU es cercano a cero (0) o esencialmente cero (0). El recuento de placas estándar con agar MRS se usa para evaluar la viabilidad de las células.

20 Ahora volviendo a la figura 1, se muestra el procedimiento de producción de DHLA (10). El caldo microbiano hecho a partir del cultivo microbiológico se agrega en el "Día Cero (0)" al reactor (20). Después de la fermentación durante aproximadamente 48 horas, en el ejemplo, el caldo microbiano se alimenta con ingredientes en el 'Día 3' e incluye ácido R-lipoico como materia prima, y se continúa la fermentación en el reactor (20) durante 14 a 21 días. En el 'Día 12', el lote de fermentación se alimenta con los ingredientes del 'Día 12', a saber, melaza, proteína de arroz, hojuelas de levadura y natamicina, en agua. Una vez completada la fermentación, el lote se ajusta a un pH de 2,0 y se agrega el aceite de oliva (30) al caldo microbiano fermentado en el reactor (20) para la extracción del producto de DHLA. El DHLA se aísla en la capa de aceite de oliva (40). El producto del procedimiento (10) es una capa de aceite que contiene DHLA (40).

30 Las sales de DHLA útiles pueden incluir sales de adición de ácidos carboxílicos que incluyen sodio, potasio, magnesio, calcio y similares.

Finalmente, ahora se sabe que los compuestos derivados de fuentes no vivas carecen de ADN, el cual se sabe que emite una luz coherente capaz de nutrir y regenerar el ADN celular. Cuando los nutrientes de fuentes no vivas entran a la célula, pueden inducir la degradación del ADN y la muerte celular temprana. A la inversa, los compuestos derivados de fuentes vivientes sustentan el ADN celular. Por lo tanto, se cree que los compuestos derivados de una fuente viviente son más adecuados para la ingestión porque se aproximan más a los compuestos que se ingieren o producen naturalmente en el cuerpo y, por lo tanto, son más seguros, especialmente para el uso a largo plazo. Una fuente de ADN ejemplar son los nucleótidos nucleocelulares, como se los usa en la presente invención.

40 Si bien es posible incluir varios organismos probióticos en los medios de cultivo de la invención, según ciertas realizaciones preferidas, al menos un organismo probiótico puede seleccionarse de entre las especies de: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, y *Streptococcus thermophilus* generalmente aceptadas como seguras (GRAS) y las combinaciones de las mismas.

45 Según otra realización, el procedimiento descrito en esta invención fermenta el ácido lipoico con bacterias seleccionadas de entre el género de cualquiera de las siguientes bacterias: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* o *Bacillus*.

50 Los ejemplos de especies adecuadas de *Lactobacillus* (spp.) incluyen, entre otras: *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. brevis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. grasserii*, *L. casei*, *L. lactis* y combinaciones de las mismas.

Los ejemplos de especies adecuadas de *Enterococcus* incluyen, entre otras: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. gallinarum* y combinaciones de las mismas.

Si bien es posible usar varios agentes nutracéuticos o nutritivos en los medios de cultivo microbiológicos de la invención, los agentes nutracéuticos o nutritivos adecuados deberían contribuir a la producción del compuesto beneficioso deseado así como a la estabilidad de los medios microbiológicos. El o los agentes nutracéuticos o nutritivos particulares usados en los medios de cultivo microbiológicos dependerán del compuesto beneficioso a

5 derivar. Por ejemplo, si el compuesto beneficioso a derivar del medio de cultivo microbiológico es ácido dihidrolipoico (DHHLA) estabilizado, el agente nutritivo contenido en el medio microbiológico puede ser el rizoma de la cúrcuma (*curcuma longa*). En otra realización preferida, el agente nutracéutico o nutritivo usado en los medios de cultivo microbiológico puede ser una forma sintética o el precursor del compuesto beneficioso a derivar, o bien puede ser una fuente natural del compuesto beneficioso, tal como, por ejemplo, una planta o hierba, la cual debe ser procesada para aislar el compuesto beneficioso.

10 Según ciertas realizaciones preferidas de la invención, el ácido dihidrolipoico estabilizado (DHHLA) para uso en un medicamento o suplemento nutricional se deriva de una fuente que vivió una vez. En particular, el compuesto DHHLA estabilizado puede derivarse de un medio de cultivo microbiológico que incluye al menos un organismo probiótico vivo, ácido *R*-lipoico y al menos un agente nutracéutico o nutritivo.

15 Las fuentes sintéticas de ácido alfa lipoico (ALA) generalmente incluyen, en cantidades iguales, ácido *R*-lipoico y ácido *S*-lipoico. Sin embargo, se ha descubierto que el ALA que contiene ácido *S*-lipoico posee propiedades proinflamatorias que dan como resultado la formación de compuestos indeseables y pueden restar valor a la función del ALA. En la práctica, por lo tanto, el ácido *R*-lipoico se usa en los medios de cultivo microbiológicos y en el caldo de fermentación microbiana.

20 Si bien se pueden usar varios agentes nutracéuticos o nutritivos en los medios de cultivo microbiológicos de la invención, los agentes nutracéuticos o nutritivos adecuados deben contribuir a la producción de DHHLA, así como también a la estabilidad de los medios microbiológicos. Según ciertas realizaciones preferidas, el agente nutracéutico o nutritivo puede ser el rizoma de cúrcuma (*curcuma longa*).

25 El ácido dihidrolipoico estabilizado (DHHLA) de la presente invención se puede preparar dispersando un medio de cultivo microbiológico que incluye al menos un organismo probiótico vivo, ácido *R*-lipoico y al menos un agente nutritivo en agua destilada para formar un caldo microbiano. El caldo se incuba después a un intervalo de pH predeterminado o preferido (por ejemplo, aproximadamente 8,0) y un intervalo de temperatura tal como, por ejemplo, aproximadamente 35 a aproximadamente 40°C, durante un período de tiempo seleccionado tal como, por ejemplo, aproximadamente 72 a aproximadamente 336 horas (es decir, desde aproximadamente 3 a alrededor de 14 días)  
30 para inducir la actividad probiótica. Al final del período de incubación, se puede agregar etanol orgánico al caldo para detener la actividad probiótica y preservar los compuestos sintetizados. Posteriormente, el producto de DHHLA se separa del caldo por extracción con aceite y se usa para preparar un medicamento o suplemento nutricional.

35 **[0053]** Si bien, en la especificación anterior, esta invención ha sido descrita en relación con ciertas realizaciones preferidas de la misma y se han establecido muchos detalles con fines de ilustración, para los expertos en la materia resultará evidente que la invención es susceptible a realizaciones adicionales y que ciertos detalles descritos en esta invención se pueden variar considerablemente sin alejarse de los principios básicos de la invención.

40 **[0054]** La presente invención puede realizarse de otras formas específicas sin alejarse de los atributos esenciales de la misma y, por consiguiente, debe hacerse referencia a las reivindicaciones adjuntas, en lugar de la especificación anterior, ya que indican el alcance de la invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para la producción de ácido dihidrolipoico (DHLA), o una sal del mismo, que comprende las etapas de:
- 5 (a) preparar un cultivo microbiológico que comprenda al menos una especie de las siguientes: *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., o *Bacillus* spp.;
- (b) tratar un caldo acuoso que contiene melaza, N-acetil-L-cisteína, proteína de arroz, levadura nutricional, azúcar, una o más sales minerales, uno o más nucleótidos y un primer aceite comestible con el cultivo microbiológico para
- 10 formar un caldo microbiano;
- (c) incubar el caldo microbiano a una temperatura de 35 a 40°C durante al menos 48 horas;
- (d) alimentar el caldo microbiano con ácido R-lipoico, rizoma de cúrcuma, N-acetil-L-cisteína, glutatión, L-arginina y NADH;
- (e) ajustar el pH a aproximadamente 8,0;
- 15 (f) incubar el caldo microbiano durante al menos 10 días;
- (g) opcionalmente, alimentar el caldo microbiano después de al menos 12 días con melaza, proteína de arroz, levadura nutricional y natamicina;
- (h) opcionalmente, ajustar el pH a aproximadamente 8,0;
- (j) incubar el caldo microbiano durante al menos 2 a 9 días;
- 20 (k) ajustar el pH a aproximadamente 2,0;
- (l) agregar un segundo aceite comestible en un volumen del 60 al 100 % del volumen total del caldo microbiano, y agua en un volumen de aproximadamente el 100 % del volumen total del caldo microbiano para formar dos capas;
- (m) mezclar la capa de aceite comestible y la capa acuosa para efectuar la extracción del DHLA, o una sal del mismo, en la capa de aceite comestible; y
- 25 (n) separar la capa de aceite comestible que contiene DHLA, o una sal del mismo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el cultivo microbiológico comprende *L. casei* y *L. fermentum*.
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 1, donde las etapas de incubación se llevan a cabo a una temperatura de 35 a 40 °C.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el ácido R-lipoico se agrega al caldo microbiano en una cantidad de 20 a 40 g/kg en base al peso total del caldo microbiano.
- 35 5. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la capa de aceite comestible que contiene DHLA, o una sal del mismo, presenta una concentración de DHLA de aproximadamente 10 mg/ml.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el primer aceite comestible y el segundo aceite comestible pueden ser iguales o diferentes, y el primer aceite comestible y el segundo aceite comestible se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo que consiste en aceite de oliva, aceite de semillas de uva, aceite de sésamo, aceite de borraja, aceite de pescado, aceite de espinillo amarillo, aceite de lino, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de canola, aceite de jojoba, aceite de maíz, aceite de palma, aceite de onagra, aceite de amaranto, aceite de cártamo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de palma, aceite de semillas de algodón, aceite de almendra, aceite de anacardo, aceite de avellana, aceite de macadamia, aceite de nuez pecan, aceite de pistacho, aceite de nuez, aceite de acai, aceite de grosella negra, aceite de albaricoque, aceite de argán, aceite de alcachofa, aceite de aguacate, aceite de babasú, aceite de behen, aceite de nuez de sebo de Borneo, aceite de calabaza búfalo, aceite de algarroba, aceite de semillas de cilantro, aceite de lino falso, aceite de cáñamo, aceite de semillas de kapok, aceite de lallemantia, aceite de semillas de hierba de la pradera, aceite de mostaza,
- 45 aceite de semillas de quimbombó, aceite de semillas de perilla, aceite de pequi, aceite de piñones, aceite de semillas de amapola, aceite de semillas de ciruelas pasas, aceite de semillas de calabaza, aceite de quinua, aceite de ramtil, aceite de salvado de arroz, aceite de té, aceite de cardo y aceite de germen de trigo.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, donde el primer aceite comestible y el segundo aceite comestible son, cada uno, aceites de oliva.
- 55 8. El procedimiento de la reivindicación 7, donde la capa de aceite comestible que contiene DHLA, o una sal del mismo, presenta una concentración de DHLA de aproximadamente 10 mg/ml.
- 60 9. El procedimiento de la reivindicación 1 para la producción de ácido dihidrolipoico (DHLA), o una sal del

mismo, que comprende las etapas de:

- (a) preparar un cultivo microbiológico que comprenda al menos uno de los siguientes: *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., o *Bacillus* spp.;
  - 5 (b) tratar un caldo acuoso que contiene melaza, N-acetil-L-cisteína, proteína de arroz, levadura nutricional, azúcar, una o más sales minerales, uno o más nucleótidos y aceite de oliva con el cultivo microbiológico para formar un caldo microbiano;
  - (c) incubar el caldo microbiano a una temperatura de 35 a 40°C durante al menos aproximadamente 48 horas;
  - (d) alimentar el caldo microbiano con ácido R-lipoico, rizoma de cúrcuma, N-acetil-L-cisteína, glutatión, L-arginina y
  - 10 NADH;
  - (e) ajustar el pH a aproximadamente 8,0;
  - (f) incubar el caldo microbiano durante un período de alrededor de 10 días como mínimo;
  - (g) opcionalmente, alimentar el caldo microbiano después de al menos 12 días con melaza, proteína de arroz, levadura nutricional y natamicina;
  - 15 (h) opcionalmente, ajustar el pH a aproximadamente 8,0;
  - (j) incubar el caldo microbiano desde al menos 2 días a 9 días;
  - (k) ajustar el pH a aproximadamente 2,0;
  - (l) agregar aceite de oliva en un volumen del 60 al 100 % del volumen total del caldo microbiano, y agua en un volumen de aproximadamente el 100 % del volumen total del caldo microbiano para formar dos capas;
  - 20 (m) mezclar la capa de aceite de oliva y la capa acuosa para efectuar la extracción del DHLA, o una sal del mismo, en la capa de aceite de oliva; y
  - (n) separar la capa de aceite de oliva que contiene DHLA, o una sal del mismo.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, donde el cultivo microbiológico comprende *L. casei* y *L.*
- 25 *fermentum*.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, donde las etapas de incubación se llevan a cabo a una temperatura de 35 a 40 °C.
- 30 12. El procedimiento de la reivindicación 9, donde el ácido R-lipoico se agrega al caldo microbiano en una cantidad de 20 a 40 g/kg en base al peso total del caldo microbiano.
13. El procedimiento de la reivindicación 9, donde la capa de aceite de oliva que contiene DHLA, o una sal del mismo, presenta una concentración de DHLA de aproximadamente 10 mg/ml.
- 35

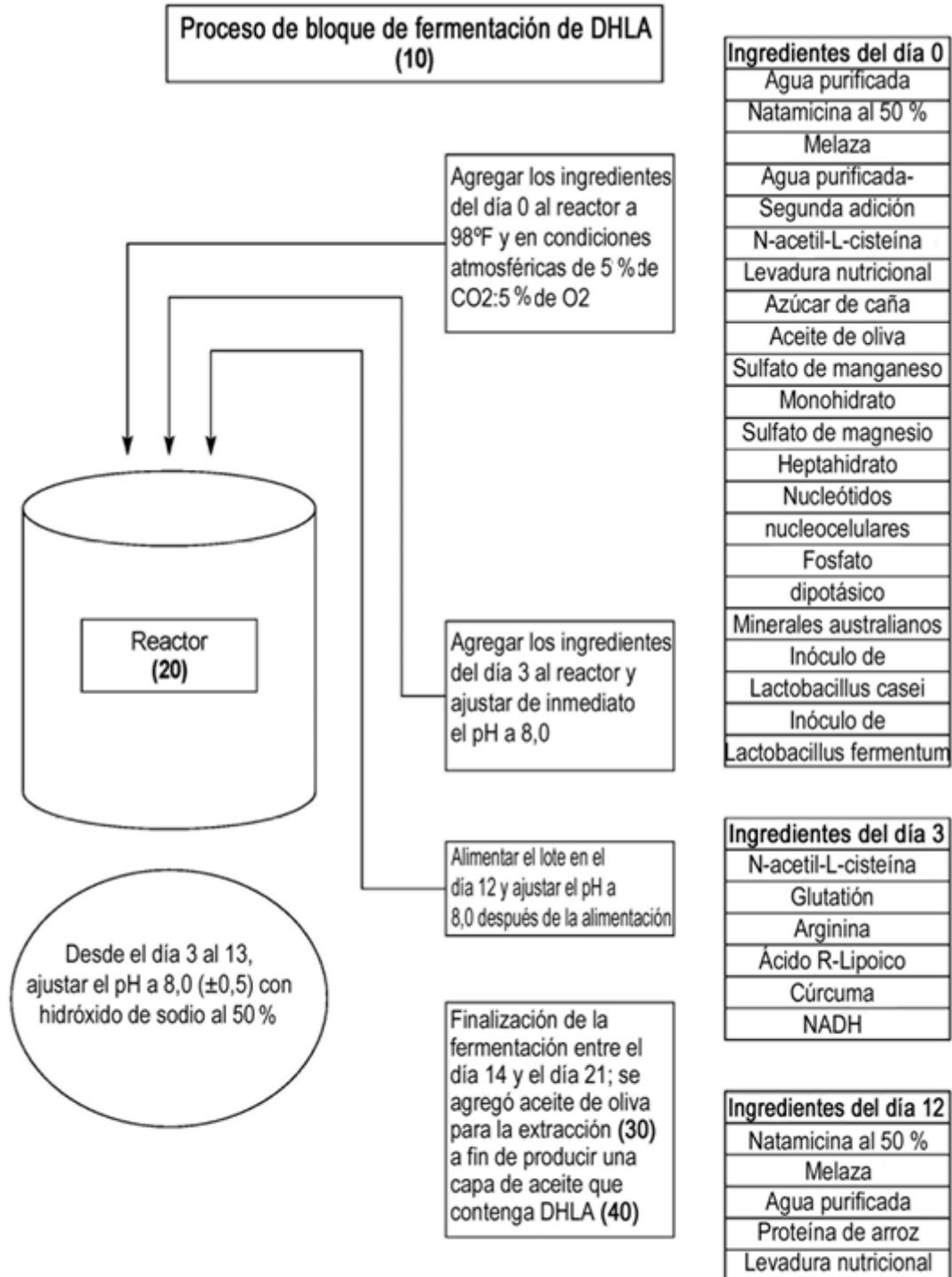


FIG. 1

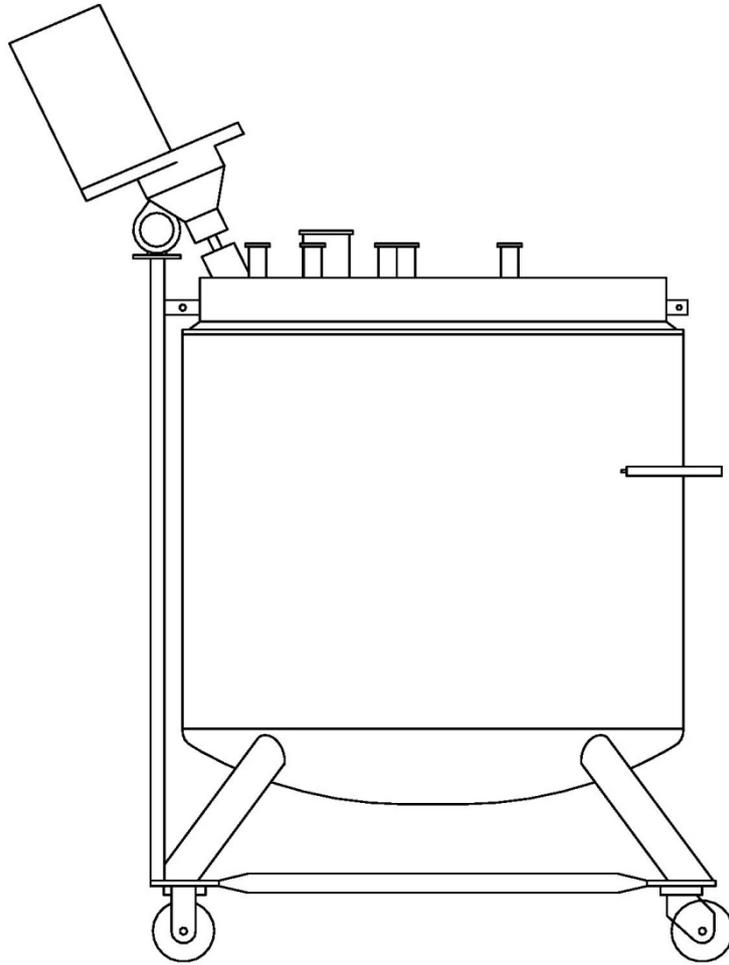
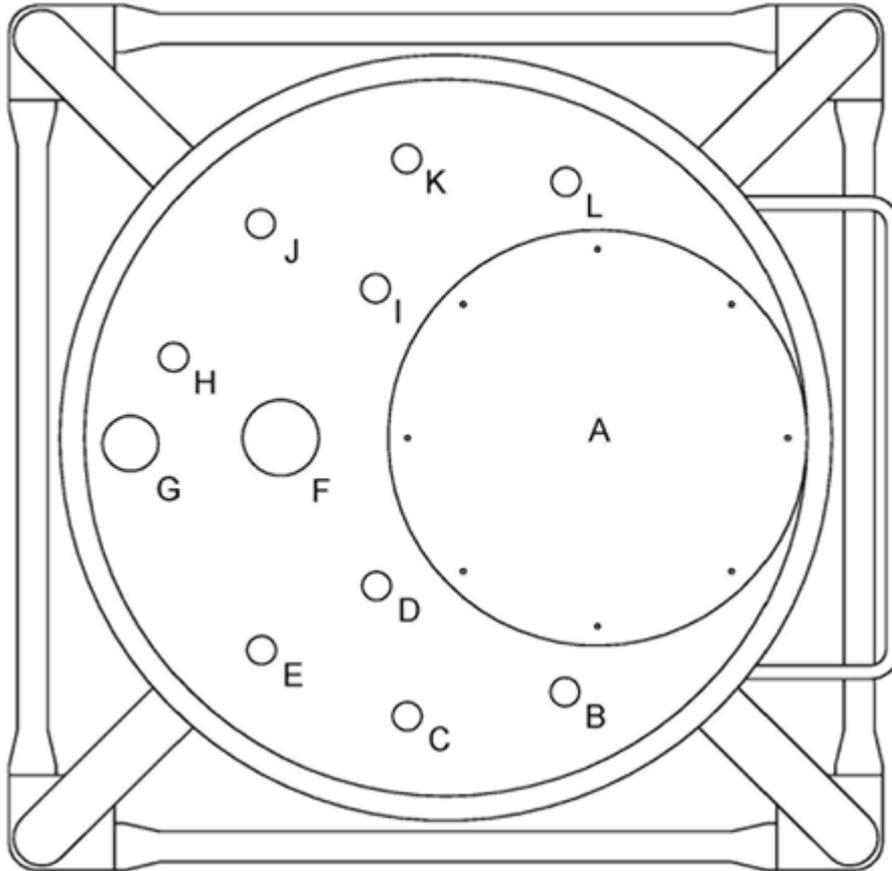


FIG. 2A



- A - Cubierta del pozo de inspección
- B - Medidor de pH
- C - Unidad de temperatura de control de calentamiento RTD
- D - No en uso
- E - Entrada de gas mixto
- F - Puerto de muestreo
- G - Motor
- H - Medidor de biogás iSense
- I - No en uso
- J - Sonda de temperatura Dickson One
- K - No en uso
- L - Gas de escape

FIG. 2B

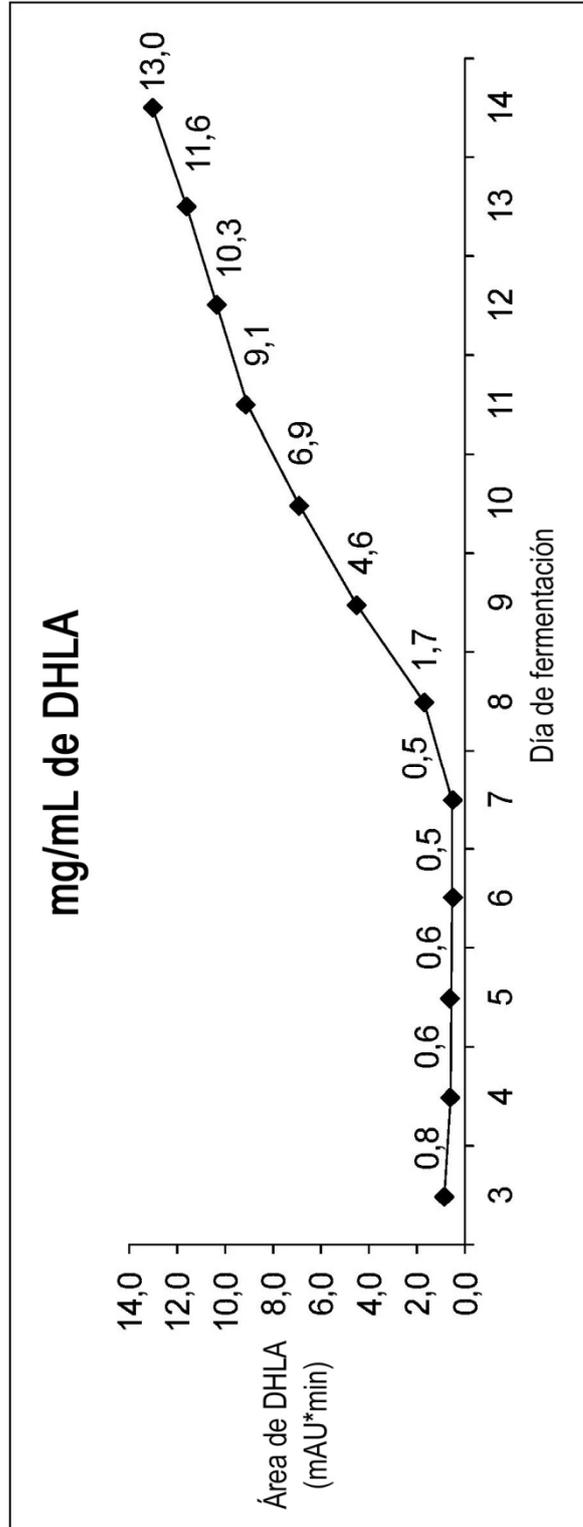


FIG. 3

