



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901545008
Data Deposito	26/07/2007
Data Pubblicazione	26/01/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	23	L		

Titolo

BIOMASSA ARRICCHITA IN ZINCO, PROCEDIMENTO PER LA SUA PREPARAZIONE E PRODOTTI PROBIOTICI, COSMETICI, DIETETICI E NUTRACEUTICI COMPRENDENTI TALE BIOMASSA

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"Biomassa arricchita in zinco, procedimento per la sua preparazione e prodotti probiotici, cosmetici, dietetici e nutraceutici comprendenti tale biomassa"

Di: BioMan S.r.l., nazionalità italiana, via Alfieri 18, 10121 Torino, Italia

Inventori designati: BENEDETTI, Alberto; GIRARDO, Francesco

Depositata il: 26 Luglio 2007

* * *

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda una biomassa arricchita in zinco, un procedimento per la sua preparazione, nonché prodotti alimentari, probiotici, dietetici, nutraceutici e cosmetici comprendenti tale biomassa. L'invenzione riguarda inoltre ceppi batterici adatti per l'uso nel procedimento dell'invenzione.

Lo zinco è un minerale essenziale, presente nell'organismo in quantità superiori a quelle di qualsiasi altro oligoelemento, ad eccezione del ferro. Esso è correlato con il normale assorbimento delle vitamine e con la loro attività, in particolare le vitamine del complesso B. Si tratta di un elemento costitutivo di numerosissimi enzimi che

svolgono un ruolo nella digestione e nel metabolismo, ivi compresa l'anidrasi carbonica, necessaria per la respirazione tissutale. Nel corpo umano lo zinco si trova specialmente nelle ossa, nei denti, nella pelle, nel fegato, nei muscoli e nei capelli. Lo zinco viene rapidamente assorbito nella parte superiore dell'intestino tenue. Lo zinco si deposita anche in alcune strutture dell'occhio, nella prostata, negli spermatozoi, nella pelle, nei capelli, nelle unghie ed è altresì presente nei globuli bianchi. Queste riserve non sono facilmente utilizzabili, per cui la dieta ne deve contenere quantità sufficienti per soddisfare il fabbisogno dell'organismo. Esso è indispensabile per la crescita corporea, per la riparazione dei tessuti e per una normale risposta immunitaria. E' inoltre importante per la digestione dei carboidrati e per il metabolismo del fosforo. Partecipa alla sintesi dell'acido nucleico che controlla la formazione di varie proteine nelle cellule, è importante per l'assorbimento delle vitamine, è utile nei processi di cicatrizzazione, ed inibisce le lipasi dei batteri, dei lieviti e dei saprofiti della pelle. Numerosissimi enzimi per essere attivi hanno bisogno dello zinco, che è indispensabile per la sintesi

delle proteine, per alcuni aspetti delle funzioni ormonali, per le funzioni cerebrali, per la vista, per il senso del gusto. Inoltre, l'enzima alcool deidrogenasi -deputato alla scomposizione dell'alcool- contiene zinco, per cui l'alcool ne provoca la carenza. Lo zinco è usato per ridurre la secrezione sebacea, nei processi di cicatrizzazione di lesioni interne ed esterne (aumenta la velocità di guarigione delle ferite), nella terapia dell'acne e della dermatite seborroica. Questo metallo può favorire la ricrescita dei capelli nelle persone che soffrono di alopecia aerata totalis e può essere utilizzato nella terapia del diabete, grazie ai suoi effetti regolatori sull'insulina del sangue. Si è riscontrato che l'aggiunta di zinco all'insulina prolunga l'effetto dell'ormone sui livelli di zucchero del sangue.

La carenza di zinco provoca gravi disturbi in ogni organismo vivente. E' noto che alcuni farmaci possono provocare un deficit di zinco, tra cui gli anti-MAO (anti-Mono Ammino Ossidasi), i corticosteroidi, i diuretici. La carenza di zinco può causare un ritardo nella crescita, una ritardata maturità sessuale e tempi prolungati di rimarginazione delle ferite. Una carenza di zinco può inoltre portare

all'aterosclerosi ed aumentare la vulnerabilità alle infezioni. Smagliature della pelle e macchie bianche sulle unghie possono essere sintomi di carenza di zinco. Altri sintomi di carenza di zinco sono unghie e capelli fragili, mancanza di pigmento nei capelli, cicli mestruali irregolari nelle donne adolescenti, impotenza maschile giovanile e dolori alle ginocchia e all'articolazione dell'anca negli adolescenti. L'esaurimento cronico dello zinco può addirittura predisporre le cellule del corpo al cancro. Anche piccole carenze di zinco sono deleterie per l'organismo, per esempio possono determinare la riduzione della concentrazione di spermatozoi e l'impotenza. La carenza di zinco è inoltre causa di stanchezza, aumentata probabilità di contrarre infezioni o di subire ferite e diminuita prontezza mentale. La carenza di zinco ostacola infatti la produzione di energia, la sintesi delle proteine, la formazione del collagene e la tolleranza all'alcool.

Composizioni alimentari o dietetiche contenenti zinco in combinazione con agenti probiotici sono descritte nella tecnica anteriore.

Ad esempio, la domanda di brevetto US 20070009502 A descrive composizioni nutritive per

l'alimentazione animale, destinate al miglioramento o al mantenimento della microflora gastrointestinale, comprendenti agenti probiotici (quali lieviti e/o batteri, ad esempio *Bifidobacterium*, *Enterococcus* o *Lactobacillus*), prebiotici, glutamina o suoi analoghi, glucosio, glicina, elettroliti, vitamine e minerali, ivi incluso lo zinco minerale (100-200 mg/kg).

La domanda di brevetto WO 2006/112998 descrive un integratore nutrizionale liquido da utilizzare in combinazione con latte umano, atto a favorire la crescita di lattanti con un ritardo della crescita, comprendente numerosi ingredienti, tra cui probiotici (come *Lactobacillus* e/o *Bifidobacterium*) e minerali, ivi incluso lo zinco.

La domanda di brevetto CA 2525342 A descrive una preparazione alimentare probiotica ad ampio spettro utile per integratori alimentari, ad esempio per migliorare la risposta immune contro malattie, comprendente specifici ceppi batterici di *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* sbp. *pseudoplantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*, in combinazione con ulteriori componenti ausiliari, agenti leganti e componenti energizzanti, tra cui lo zinco.

I documenti anteriori sopra citati descrivono composizioni adatte alla veicolazione di zinco all'interno dell'organismo umano o animale, in cui lo zinco è sotto forma di zinco inorganico ed è in combinazione con numerosi altri ingredienti, ivi inclusi microrganismi probiotici.

Tali composizioni presentano lo svantaggio di contenere esclusivamente zinco in forma inorganica, che è più difficilmente assimilabile da parte dell'organismo umano rispetto allo zinco organico.

Gli inventori hanno ora trovato che alcune specie batteriche appartenenti ai generi *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, segnatamente le specie *Bifidobacterium adolescentis* e *Streptococcus thermophilus*, quando fatte crescere su un terreno di coltura contenente zinco inorganico, dimostrano l'inattesa e vantaggiosa capacità di accumulare elevatissime quantità di zinco all'interno della cellula, senza che tali elevate quantità di zinco intracellulare risultino deleterie per la sopravvivenza della biomassa stessa. Queste capacità di accumulo intracellulare di zinco rendono le suddette specie batteriche particolarmente adatte ad essere utilizzate come mezzi per la veicolazione dello zinco nell'organismo umano o animale, utili in particola-

re per la preparazione di prodotti probiotici che, per definizione, devono contenere biomassa viva. La biomassa arricchita in zinco dell'invenzione può anche essere utilizzata in applicazioni cosmetiche, segnatamente per la preparazione di prodotti cosmetici o di prodotti cosmeceutici. Per la preparazione di prodotti cosmetici è richiesto che la biomassa sia costituita da microrganismi morti, mentre per la preparazione di prodotti cosmeceutici è richiesto che la biomassa sia costituita da microrganismi vivi.

Un oggetto dell'invenzione è dunque un procedimento per la preparazione di una biomassa arricchita in zinco, caratterizzato dal fatto che la biomassa è ottenuta mediante

(i) coltivazione di microrganismi scelti dal gruppo che consiste di *Bifidobacterium adolescentis*, *Streptococcus thermophilus* e loro combinazioni in un mezzo di coltura nutriente comprendente un sale di zinco, in modo tale che detti microrganismi accumulino zinco a livello intracellulare; e

(ii) separazione dei microrganismi arricchiti in zinco dal mezzo di coltura.

Con il procedimento dell'invenzione si ottiene una biomassa comprendente microrganismi vivi conte-

nenti un'elevata quantità di zinco accumulato nelle cellule, come risulta evidente dagli studi riportati nel seguito.

Il procedimento per la preparazione di biomassa arricchita in zinco dell'invenzione prevede una prima fase di fermentazione, in cui i microrganismi vengono coltivati in un mezzo nutriente adatto per la crescita di microrganismi dei generi *Bifidobacterium* e *Streptococcus* addizionato con un sale di zinco, preferibilmente solfato di zinco (ZnSO_4). Il mezzo nutriente è preferibilmente un mezzo liquido contenente fonti di carbonio, ad esempio glucosio e/o lattosio; fonti di azoto, ad esempio peptoni, idrolizzati di caseina, estratti di lievito; sali inorganici; fonti di microelementi e di vitamine.

La concentrazione del sale di zinco nel terreno di coltura è preferibilmente fra 5 e 50 mM, ancor più preferibilmente fra 10 e 40 mM.

E'preferito il solfato di zinco.

La fermentazione è preferibilmente condotta a una temperatura compresa tra 25°C e 48°C, più preferibilmente tra 35°C e 45°C. Il valore di pH del mezzo liquido è preferibilmente compreso tra 2,5 e 8,0, più preferibilmente tra 3,5 e 7,5. La durata della fermentazione è preferibilmente compresa tra

le 6 e le 40 ore, più preferibilmente tra le 8 e le 36 ore. La fermentazione può essere condotta in condizioni di aerofilia, microaerofilia e/o anaerobiosi.

Dopo la fase di fermentazione, durante la quale si verifica l'accrescimento della biomassa e l'accumulo di zinco nelle cellule batteriche, la biomassa ottenuta viene separata dal mezzo di coltura con qualsiasi procedimento adatto di per sé noto, ad esempio mediante centrifugazione o microfiltrazione, in modo tale che non sia compromessa la vitalità delle cellule. Il procedimento dell'invenzione permette quindi di ottenere una biomassa di microrganismi arricchiti in zinco comprendente microrganismi vivi. Se lo si desidera, la biomassa ottenuta può poi essere sottoposta a liofilizzazione, essiccamento, microincapsulazione e/o congelamento, effettuati secondo procedure convenzionali.

I presenti inventori hanno inoltre selezionato due ceppi di microrganismi delle specie *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium adolescentis* che si sono rivelati particolarmente vantaggiosi per l'uso nel procedimento dell'invenzione, in quanto dotati di una capacità particolarmente elevata di accumulare zinco all'interno della cellula. Tali

ceppi sono stati designati come *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM e *Bifidobacterium adolescentis* BB 1 BM e sono stati depositati presso il DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germania), ai sensi del Trattato di Budapest, rispettivamente come *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM depositato il 13.7.2007 con il numero di accesso DSM 19526, e *Bifidobacterium adolescentis* BB 1 BM depositato il 23.12.2005 con il numero di accesso DSM 17850.

Come precedentemente descritto, la biomassa arricchita in zinco ottenibile mediante il procedimento dell'invenzione è particolarmente adatta per l'uso come agente probiotico, in quanto essa contiene elevate concentrazioni di zinco in forma organica.

A tale scopo la biomassa comprendente microrganismi vivi, e quindi avente attività probiotica, può essere preparata in forme differenti. Ad esempio essa può essere aggiunta ad un prodotto alimentare, preferibilmente latte o un latticino quale yogurt, per ottenere una preparazione alimentare avente attività probiotica. In alternativa, essa può essere utilizzata per la preparazione di una composizione avente attività probiotica, quale ad

esempio un integratore alimentare, un prodotto dietetico, un alimento funzionale, oppure per la preparazione di una preparazione non alimentare per somministrazione orale, quale ad esempio un prodotto nutraceutico, in combinazione con adatti veicoli e/o eccipienti. A tale scopo la biomassa viene preferibilmente utilizzata sotto forma di composizione liofilizzata od essiccata come tale e/o microincapsulata.

La carica batterica del liofilizzato o essiccato da utilizzare successivamente nella composizione avente attività probiotica è di almeno 10^{10} - 10^{11} CFU/g di prodotto.

Per la preparazione del liofilizzato o essiccato la biomassa umida viene sospesa in un mezzo liquido, ad esempio acqua o soluzione fisiologica sterile, con l'aggiunta di protettivi come ad esempio latte scremato, lattosio, glucosio, estratto di lievito, amido di patata, glutammato di sodio, inositolo, citrato di sodio, gelatina, maltodestrina, stearato di magnesio, acido ascorbico, acido stearico e loro combinazioni.

Il liofilizzato e/o essiccato viene poi diluito per la preparazione di probiotici con degli inerti, scelti ad esempio tra quelli sopra indicati per la

liofilizzazione, in modo da ottenere una carica batterica preferibilmente di almeno 10^9 CFU/g di prodotto. Il liofilizzato può essere microincapsulato per aumentare la stabilità a temperatura ambiente (18-24 mesi).

Per la preparazione di un prodotto in cui la biomassa deve essere morta (ad esempio un prodotto cosmetico oppure alcuni prodotti alimentari, quali i prodotti da forno), la biomassa arricchita in zinco ottenibile con il procedimento dell'invenzione viene sottoposta a procedimenti di per sé noti, quali l'essiccamento, per ottenere cellule morte.

La sezione sperimentale che segue è fornita esclusivamente a titolo illustrativo e non ha lo scopo di limitare la portata dell'invenzione come definita nelle annesse rivendicazioni.

Prove di uptake intracellulare di zinco

Per confrontare il contenuto totale intracellulare di zinco e valutare le capacità di accumulo del metallo a livello citoplasmatico o di membrana, è stato svolto uno screening su ceppi di microrganismi probiotici, fatti crescere su terreni privi o addizionati di solfato di zinco.

Colture di *Bifidobacterium* conservate in infis-

sione di MRS sono state inoculate in MRS liquido e incubate anaerobicamente a 37°C. Dopo 24 ore di sviluppo, sono stati inoculati (10% v/v) rispettivamente 120 ml di MRS liquido da solo e 120 ml di MRS liquido addizionato di ZnSO₄ 10 mM. Tali colture sono state incubate in anaerobiosi a 37°C per 48 ore. La stessa procedura sperimentale è stata seguita per allestire prove di uptake intracellulare in *Streptococcus*. In questo caso è stato utilizzato terreno liquido M17 e le colture sono state incubate in anaerobiosi a 42°C per 48 ore.

Al termine dello sviluppo, conservata una piccola aliquota per la determinazione del peso secco, si è proceduto alla separazione della biomassa dal mezzo di coltura mediante centrifugazione ed alla mineralizzazione della biomassa raccolta.

Mineralizzazione della biomassa

Al fine di determinare lo zinco totale intracellulare, le cellule batteriche sono state disgregate completamente e quindi la biomassa è stata mineralizzata secondo il protocollo di seguito riportato.

Cento ml delle colture sviluppate sono stati centrifugati per 30 minuti a 4500 rpm (in centrifuga refrigerata a 4°C, GS-15R centrifuga Beckman) per raccogliere le cellule. Il pellet è stato poi

lavato 4 volte, ciascuna volta con 140 ml di acqua distillata, per eliminare lo zinco residuo del sur-natante. La quarta acqua di lavaggio è stata con-servata al fine di analizzarne il contenuto in zin-co con la tecnica ICP.

La biomassa è stata mineralizzata risospendendo il pellet in rapporto 1:1 (w/v) con una soluzione di acido nitrico HNO_3 . In fase di ottimizzazio0ne della procedura di mineralizzazione, allo scopo di ottenere il totale recupero dello zinco intracellu-lare, sono state utilizzate soluzioni di acido ni-trico a concentrazioni crescenti, rispettivamente 0,65%, 6,5% e 20%.

Ogni sospensione cellulare così ottenuta è sta-ta trasferita in tubi a vite e conservata a -20°C per almeno 2 ore. I tubi a vite sono poi stati scongelati e in un bagno termostatato a 100°C per 30 minuti sotto cappa chimica: per evitare una ec-cessiva evaporazione e pressione all'interno dei tubi, questi sono stati chiusi con tappi dotati di ago per lo sfiato. Le soluzioni sono state fatte raffreddare a temperatura ambiente, permettendo l'esaurimento dei vapori di reazione. Al termine della procedura di mineralizzazione, le sospensioni cellulari sono state centrifugate a 13000 rpm per

30 minuti a 4°C al fine di raccogliere l'estratto mineralizzato ed eliminare i detriti cellulari.

Analisi dello zinco totale mediante ICP

Per l'analisi in ICP, i campioni sono stati acidificati al 2% con HNO₃ concentrato al 65% e successivamente diluiti con acqua bidistillata fino ad un volume finale di 5 ml. Queste operazioni sono state eseguite sotto cappa chimica. Le soluzioni così ottenute sono state filtrate usando filtri di acetato di cellulosa da 0,8 µm (Millex-AA, Millipore) fino a risultare completamente limpide.

La quantificazione dello zinco intracellulare accumulato dai ceppi in esame è stata effettuata con la tecnica ICP - AES (OES - OPTIMA 4200 DV, Perkin Elmer).

Le frequenze utilizzate dal sistema sono di 40 MHz. L'iniezione del plasma è automatizzata e controllata da un sistema elettronico collegato a un computer.

L'argon utilizzato deve essere puro al 99,99% e il suo flusso si deve sempre trovare entro un campo tra gli 0 e i 20 litri/minuto con incrementi variabili di 1 litro/minuto. Il flusso del campione nebulizzato deve avvenire tra valori di flusso di massa di 0 e 0,01 litri/minuto con incrementi va-

riabili di 1 litro/minuto.

Il nebulizzatore è fatto di materiali resistenti alla corrosione, per cui il sistema può sopportare soluzioni con concentrazioni al 50% (v/v) di HCl, HNO₃, H₂SO₄, H₃PO₄, al 30% (v/v) di NaOH e al 20% (v/v) di HF.

Lo spettrofotometro è costituito da un policromatore che si trova in un compartimento termostato a 38°C. Il metodo di rilevamento utilizzato è il CCD e la lettura si effettua nel campo dell'UV.

Parametri di analisi utilizzati:

Resolution: high

Purge gas flow: normal

Read delay time (sec): 45

Replicates: 3

Read time: auto

Min. time: 1.000 sec. - Max. time: 10.000 sec.

Source equilibration delay: 15 sec.

Plasma aerosol type: wet

Nebulizer start-up conditions: instant

Per ricavare la concentrazione incognita dello zinco è stata utilizzata una retta di taratura costruita con le seguenti soluzioni standard acidificate al 2% con HNO₃: 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm e 10 ppm di zinco.

Lo zinco totale cellulare è espresso in mg di metallo per grammo di biomassa secca.

La concentrazione totale intracellulare del metallo accumulato è stata definita con la tecnica ICP - AES descritta acidificando i campioni ottenuti al 2% con HNO_3 .

La figura 1 riporta le concentrazioni intracellulari di zinco (esprese come mg di zinco intracellulare per grammo di peso secco cellulare) misurate in prove di uptake effettuate su ceppi di diverse specie di *Bifidobacterium*. Specificamente, le prove sono state effettuate su ceppi di *B. infantis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. longum*. Tutti i ceppi analizzati presentano una concentrazione di zinco intracellulare molto bassa, con valori compresi fra 0,01 e 0,20 mg/g_{DW}, quando fatti crescere su terreno MRS privo di zinco. L'addizione di solfato di zinco 10 mM al terreno di coltura MRS induce un incremento della concentrazione intracellulare di zinco. Tuttavia, come si può vedere dalla figura 1, le concentrazioni del metallo internalizzato risultano piuttosto basse e comprese tra 0,72 mg/g_{DW} e 2,12 mg/g_{DW} nei ceppi di tutte le specie, ad eccezione del ceppo di *Bifidobacterium adolescentis* BB 1 BM (numero di accesso

DSM 17850; data di deposito 23.12.2005) in cui la concentrazione di zinco intracellulare aumenta a 53,32 mg/g_{DW} (incremento fino a 1.000 volte la concentrazione basale).

Come si può vedere in figura 2, valori confrontabili di zinco intracellulare sono stati ottenuti con il ceppo *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM (numero di accesso DSM 19526; data di deposito 13.7.2007) fatto crescere su terreno M17 arricchito con solfato di zinco 10 mM (concentrazione intracellulare di zinco = 59,31 mg/ g_{DW}) (Serie1). La figura 2 mostra inoltre che ceppi appartenenti ad altre specie di *Streptococcus*, quali *S. salivarius*, *S. faecium* e *S. lactis*, mostrano una capacità di accumulo di zinco intracellulare estremamente più bassa quando fatti crescere su un medesimo terreno. La figura mostra anche il confronto con le concentrazioni intracellulari di zinco rilevate quando i ceppi vengono fatti crescere sullo stesso terreno M17 senza solfato di zinco aggiunto (Serie2).

Esempio 1

200 ml di terreno M17 (Merck), a cui è stato aggiunto solfato di zinco 10 mM, sono stati sterilizzati in una beuta da 500 ml. Una seed culture di *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM (numero di ac-

cesso DSM 19526, data di deposito 13.7.2007) precedentemente cresciuta per 24 ore a 42°C in anaerobiosi, è stata inoculata nella beuta nella quantità di 10% (v/v). La coltura è stata poi lasciata crescere per 40 ore a 42°C in anaerobiosi. A coltura completata, si sono ottenute $2,73 \times 10^9$ CFU/ml. La biomassa è stata raccolta per centrifugazione e trattata ed analizzata secondo le metodiche descritte sopra. Lo zinco totale accumulato dalle cellule era di 59,31 mg/g_{DW}. D.W. = dry weight (peso secco).

Esempio 2

Come nell'esempio 1, usando il terreno SBF31 + 15 mM di Zn²⁺ sterilizzato a parte per filtrazione. Terreno SBF31: triptone 23 g/l; peptone di soia 16 g/l; estratto di lievito 12 g/l; MgSO₄ 0,25 g/l; K₂HPO₄ 2,5 g/l; acido ascorbico 0,5 g/l; glucosio 45 g/l; diglicerofosfato di Na 19 g/l.

Durata della fermentazione: 21 ore; produzione di cellule vive: $5,3 \times 10^{10}$ CFU/ml; zinco accumulato 51,67 mg/g_{DW}.

Esempio 3

Come nell'esempio 1, usando il terreno SBF32 + 30 mM di Zn²⁺ sterilizzato a parte per filtrazione. Dopo 21 ore, si sono ottenuti 2,1 g/litro di bio-

massa secca avente una vitalità di $3,15 \times 10^{10}$ CFU/ml; zinco accumulato 63,42 mg/g_{DW}. Terreno SBF32: triptone 23 g/l; peptone di soia 16 g/l; estratto di lievito 12 g/l; MgSO₄ 0,25 g/l; K₂HPO₄ 2,5 g/l; acido ascorbico 0,5 g/l; lattosio 45 g/l; glicerina 19 g/l.

Esempio 4

71 ml di terreno M17, a cui è stato aggiunto solfato di zinco 10 mM (sterilizzato a parte per filtrazione), sono stati inoculati con 500 ml di seed culture liquor dello stesso terreno M17 + solfato di zinco 10 mM di *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM (numero di accesso DSM 19526, data di deposito 13.7.2007) precedentemente cresciuta per 24 ore a 42°C in anaerobiosi. Condizioni del fermentatore: 150 rpm; aria 0,5 l/l/min; temperatura 42°C; pH controllato a 4,8 ($\pm 0,2$) con NaOH 10%; tempo di fermentazione 21 ore. Si sono ottenute $2,75 \times 10^{10}$ CFU/ml. Lo zinco totale accumulato dalle cellule era di 57,2 mg/g_{DW}.

Esempio 5

Come nell'esempio 4, ma durante la fermentazione sono state effettuate due aggiunte di Zn²⁺ 15 mM a log12 e log18. Durata della fermentazione: 24 ore. Vitalità delle cellule a fine fermentazione

$2,25 \times 10^{10}$ CFU/ml. Lo zinco totale accumulato dalle cellule era di 91,3 mg/g_{DW}.

Esempio 6

300 ml di terreno MRS (Merck) + cisteina, sterilizzati a 120 °C per 30 minuti, a cui è stato aggiunto solfato di zinco 10 mM sterilizzato per filtrazione, sono stati mantenuti in pre-riduzione per non meno di 24 ore in ambiente aerobico. Un seed culture liquor di *Bifidobacterium adolescentis* BB 1 BM (numero di accesso DSM 17850, data di deposito 23.12.2005), precedentemente cresciuto per 24 ore nello stesso terreno in anaerobiosi a 37°C, è stato inoculato nel 300 ml di cui sopra con il 10% (v/v) e cresciuto in anaerobiosi per 24 ore a 37°C. A coltura completata si sono ottenuti 1×10^{11} CFU/ml. Lo zinco totale accumulato dalle cellule era di 53,32 mg/g_{DW}.

Esempio 7

Un fermentatore da 15 litri per anaerobiosi munito di piastra vibrante al posto dell'albero è stato preparato con 10 litri di terreno e nelle condizioni di cui all'esempio 6. Il solfato di zinco è stato portato a 15 mM. Il fermentatore è stato inoculato con il 10% v/v di seed culture liquor 24 ore di *Bifidobacterium adolescentis* BB 1 BM (numero

di accesso DSM 17850, data di deposito 23.12.2005) e incubato a 37°C per 24 ore. Il contenuto di cellule vive era di 1×10^{11} CFU/ml. Lo zinco totale accumulato dalle cellule era di 67,1 mg/g_{DW}.

Esempio 8

90 ml di terreno MRS contenente cisteina 0,05% a cui è stato aggiunto Zn-solfato 10 mM, sono stati sterilizzati in una beuta da 100 ml. Una *seed culture* di *Bifidobacterium adolescentis* BB 1 BM precedentemente cresciuto per 24 ore a 37° C in anaerobiosi nello stesso terreno, è stata inoculata nella beuta nella quantità del 10% v/v. La cultura è stata successivamente lasciata crescere per 40 ore a 37°C in anaerobiosi. A coltura completata si sono ottenuti $3,12 \times 10^9$ CFU/ml. La biomassa è stata raccolta per centrifugazione e trattata ed analizzata secondo la metodica descritta. Lo Zn totale accumulato nelle cellule è stato di 54,36 mg/g p.s.

Esempio 9

Sono stati formulati nel modo che segue 90 ml di terreno minimo basale (in grammi per litro): Casamino Acidi (Difco Laboratories, Sparks, Md.), 15; yeast nitrogen base (Difco Laboratories), 6,7; acido ascorbico, 10; sodio acetato, 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5; urea, 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01;

MnSO₄·7H₂O, 0,007; NaCl, 0,01; Tween 80, 1; cisteina, 0,5 (pH regolato a 7,0 e autoclavato per 30 minuti a 110°C). Uno dei seguenti carboidrati (glucosio, frutto-oligosaccaridi, inulina, raffinossio, lattosio, galatto-oligosaccaridi, fruttosio, galattosio o xilo-oligosaccaridi), è stato autoclavato separatamente ed addizionato al terreno basale per ottenere una concentrazione di 10 g/l. E' stato inoltre aggiunto Zn-solfato 10 mM. Una seed culture di *Bifidobacterium adolescentis* BB 1 BM precedentemente fatto crescere per 24 ore a 37° C in anaerobiosi nello stesso terreno, è stata inoculata nella beuta ad una quantità del 10% v/v. La cultura è stata successivamente lasciata crescere per 40 ore a 37°C in anaerobiosi. A coltura completata si sono ottenute concentrazioni di biomassa comprese fra 1,5 x 10⁸ CFU/ml e 3,2 x 10⁹ CFU/ml. La biomassa è stata raccolta per centrifugazione e trattata e analizzata secondo la metodica descritta. Lo zinco totale accumulato nelle cellule era compreso fra 48,12 e 54,37mg/g p.s.

Esempio 10

2 litri di terreno MRS contenente cisteina 0,05% ed addizionati di Zn-solfato 10 mM, sono stati sterilizzati in un bioreattore con una capacità di 3,6

litri ed inoculati al 10% con una coltura di *Bifidobacterium adolescentis* BB 1 BM fatta sviluppare per 24 ore nello stesso terreno. Il bioreattore è stato sterilizzato *in situ* e pressurizzato con azoto. Le condizioni di processo erano: insufflazione costante di azoto 0,01 vvm, 150 rpm, 37°C, pH mantenuto a 6,2 con NaOH 0,1M. Dopo 48 ore la biomassa aveva una concentrazione di $3,6 \times 10^9$ CFU/ml. La biomassa è stata raccolta ed analizzata per il contenuto di zinco. Lo zinco totale accumulato nelle cellule era 53,81mg/g p.s.

Esempio 11

2 litri di terreno MRS contenente cisteina 0,05% sono stati sterilizzati in un bioreattore con una capacità di 3,6 litri ed inoculati al 10% con una coltura di *Bifidobacterium adolescentis* BB 1 BM fatta sviluppare per 24 ore nello stesso terreno. Il bioreattore è stato sterilizzato *in situ* e pressurizzato con azoto. Le condizioni di processo erano: insufflazione costante di azoto 0,01 vvm, 150 rpm, 37°C, pH mantenuto a 6,2 con NaOH 0,1M. Dopo 24 ore di sviluppo la coltura è stata addizionata di Zn-solfato per ottenere una concentrazione finale di 10 mM. Dopo 24 ore dall'aggiunta del metallo, la biomassa aveva una concentrazione di $3,6 \times 10^9$

CFU/ml. La biomassa è stata raccolta ed analizzata per il contenuto di zinco. Lo zinco totale accumulato nelle cellule era 53,81mg/g p.s.

Esempio 12

10 litri di terreno MRS contenente cisteina 0,05% ed addizionati di Zn-solfato 10 mM, sono stati sterilizzati in un bioreattore avente una capacità di 3,6 litri ed inoculati al 10% con una coltura di *Bifidobacterium adolescentis* BB 1 BM fatta sviluppare per 24 ore nello stesso terreno. Il bioreattore è stato sterilizzato *in situ* e pressurizzato con azoto. Le condizioni di processo erano: insufflazione costante di azoto 0,01 vvm, 150 rpm, 37°C, pH mantenuto a 6,2 con NaOH 0,1M. Dopo che la coltura aveva finito di acidificare, come indicato dall'interruzione del richiamo di NaOH, la coltura era alimentata in modalità *fed-batch* con una soluzione di glucosio al 30 % e Zn-solfato 10 mM. Al raggiungimento del volume di 15 litri, la biomassa aveva una concentrazione di $1,2 \times 10^{10}$ CFU/ml ed è stata raccolta ed analizzata per il contenuto di zinco. Lo zinco totale accumulato nelle cellule era 52,15 mg/g p.s.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la preparazione di biomassa arricchita in zinco, caratterizzato dal fatto che detta biomassa è ottenuta mediante

(i) coltivazione di microrganismi scelti dal gruppo che consiste di *Bifidobacterium adolescentis*, *Streptococcus thermophilus* e loro combinazioni in un mezzo di coltura nutriente comprendente un sale di zinco, in modo tale che detti microrganismi accumulino zinco; e

(ii) separazione dei microrganismi arricchiti in zinco dal mezzo di coltura.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui i microrganismi separati dal mezzo di coltura sono sottoposti a liofilizzazione, essiccamento, microincapsulazione e/o congelamento.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 oppure 2, in cui i microrganismi sono scelti dal gruppo che consiste di *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM depositato ai sensi del Trattato di Budapest presso il DSMZ, Braunschweig, Germania, con il numero di accesso DSM 19526 in data 13.7.2007 e *Bifidobacterium adolescentis* BB 1 BM depositato ai sensi del Trattato di Budapest presso il DSMZ, Braunschweig, Germania, con il numero di accesso DSM 17850 in da-

ta 23.12.2005.

4. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, in cui il sale di zinco è solfato di zinco.

5. Procedimento secondo la rivendicazione 4, in cui il mezzo di coltura nutriente comprende una quantità di solfato di zinco nell'intervallo da 5 a 50 mM, preferibilmente da 10 a 40 mM.

6. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, in cui il mezzo di coltura è un mezzo liquido.

7. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, in cui il mezzo di coltura comprende usuali nutrienti per la crescita di detti microrganismi, scelti dal gruppo che consiste di sali inorganici, fonti di carbonio, di azoto, di vitamine, di micronutrienti e loro miscele.

8. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7, in cui detto mezzo di coltura ha un pH nell'intervallo da 2,5 a 8,0, più preferibilmente nell'intervallo da 3,5 a 7,5.

9. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 8, in cui detti microrganismi sono coltivati in detto mezzo di coltura ad una temperatura nell'intervallo da 25°C a 48°C, più preferi-

bilmente nell'intervallo da 35°C a 45°C.

10. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 9, in cui detti microrganismi sono coltivati in detto mezzo di coltura per 6 a 40 ore, più preferibilmente 8 a 36 ore.

11. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 8, in cui detti microrganismi sono separati dal mezzo di coltura mediante centrifugazione o microfiltrazione.

12. Biomassa arricchita in zinco ottenibile mediante il procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 11.

13. Biomassa secondo la rivendicazione 12, comprendente microrganismi scelti dal gruppo che consiste di *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM depositato ai sensi del Trattato di Budapest presso il DSMZ, Braunschweig, Germania, con il numero di accesso DSM 19526 in data 13.7.2007 e *Bifidobacterium adolescentis* BB 1 BM depositato ai sensi del Trattato di Budapest presso il DSMZ, Braunschweig, Germania, con il numero di accesso DSM 17850 in data 23.12.2005, e loro combinazioni.

14. Biomassa secondo la rivendicazione 12 o 13, comprendente microrganismi vivi.

15. Biomassa secondo la rivendicazione 14, come a-

gente probiotico.

16. Uso di biomassa secondo la rivendicazione 14, per la preparazione di una composizione avente attività probiotica.

17. Uso secondo la rivendicazione 16, in cui detta composizione avente attività probiotica è scelta dal gruppo che consiste di integratori alimentari, prodotti dietetici, alimenti funzionali, prodotti nutraceutici e preparazioni alimentari.

18. Biomassa secondo la rivendicazione 12 o 13, comprendente microrganismi morti.

19. Uso di biomassa secondo la rivendicazione 18, per la preparazione di un prodotto cosmetico o di un prodotto alimentare.

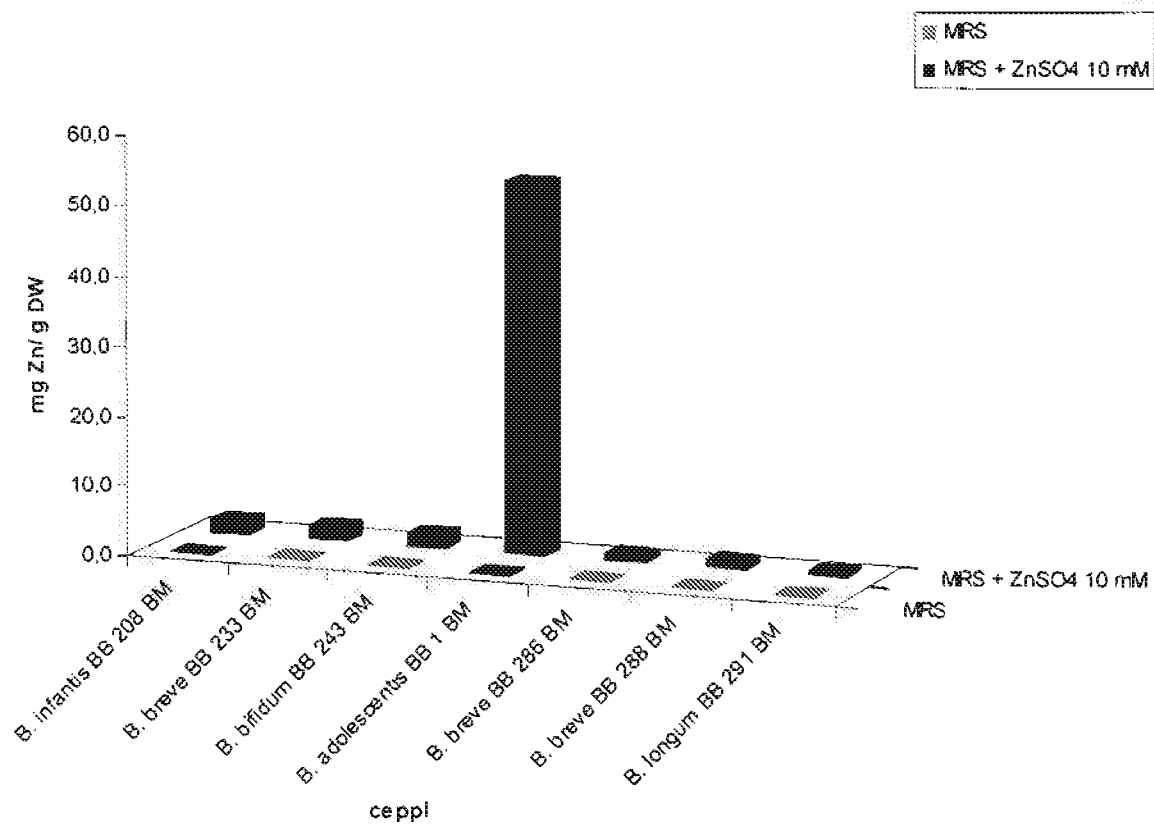
20. Composizione avente attività probiotica comprendente biomassa viva arricchita in zinco secondo la rivendicazione 14, in combinazione con adatti veicoli e/o eccipienti.

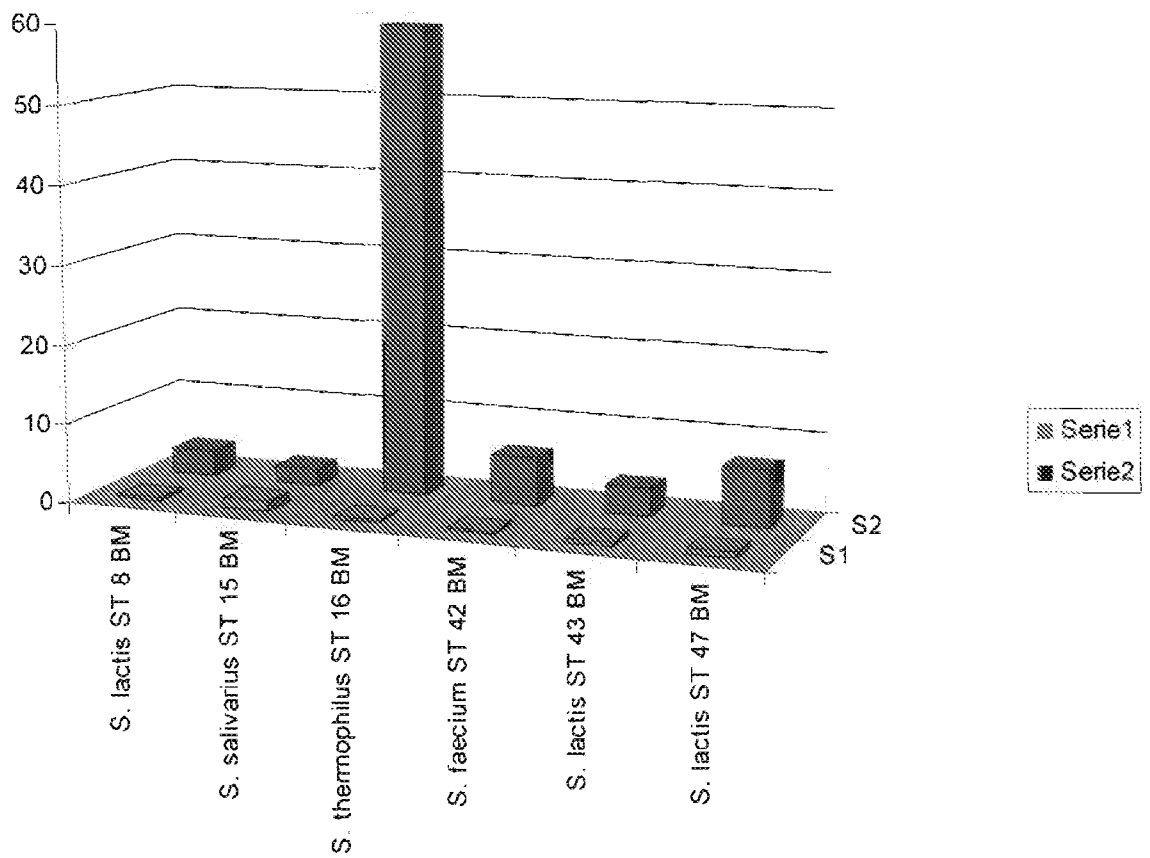
21. Composizione secondo la rivendicazione 20, avente una carica batterica di almeno 10^9 CFU/g.

22. Preparazione alimentare, integratore alimentare, prodotto dietetico, alimento funzionale, prodotto nutraceutico o prodotto cosmeceutico comprendente una composizione secondo la rivendicazione 20 o 21.

23. Prodotto cosmetico o alimentare comprendente una biomassa secondo la rivendicazione 18.

24. Microrganismo scelto fra il ceppo *Streptococcus thermophilus* ST 16 BM depositato ai sensi del Trattato di Budapest presso il DSMZ, Braunschweig, Germania, con il numero di accesso DSM 19526 in data 13.7.2007 e il ceppo *Bifidobacterium adolescentis* BB 1 BM depositato ai sensi del Trattato di Budapest presso il DSMZ, Braunschweig, Germania, con il numero di accesso DSM 17850 in data 23.12.2005.

**Fig. 1**

**Fig. 2**