

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
16 de diciembre de 2010 (16.12.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2010/142828 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12N 1/20 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)  
C12P 23/00 (2006.01) C12R 1/25 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2010/070375

(22) Fecha de presentación internacional:

7 de junio de 2010 (07.06.2010)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 200930276 8 de junio de 2009 (08.06.2009) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES];  
C/ Alfonso XII, 16, E-41002 Sevilla (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **RUIZ BARBA, José Luis** [ES/ES]; Instituto de la Grasa (IG), Avda. Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **GARRIDO FERNÁNDEZ, Juan** [ES/ES]; Instituto de la Grasa (IG), Avda. Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **HORNERO MÉNDEZ, Dámaso** [ES/ES]; Instituto de la Grasa (IG), Avda. Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **MALDONADO BARRAGÁN, Antonio** [ES/ES]; Instituto de la Grasa (IG), Avda. Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **CABALLERO GUERRERO, Belén** [ES/ES]; Instituto de la Grasa (IG), Avda. Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Dario, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: NOVEL STRAIN OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* FOR THE PRODUCTION OF CAROTENOIDS

(54) Título : NUEVA CEPA DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* PARA LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES

(57) Abstract: The present invention relates to a novel bacterial strain (CECT 7531), which belongs to the *Lactobacillus plantarum* species, or any mutant strain thereof. The present invention likewise relates to the use of said strain for the production of carotenoids, for the manufacture of a probiotic food, or of a nutritional, vitamin or mineral supplement, and also a method for the production of carotenoids using said strain.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a una nueva cepa bacteriana, CECT 7531, que pertenece a la especie *Lactobacillus plantarum*, o cualquier cepa mutante que proceda de la misma. La presente invención se refiere también al uso de dicha cepa para la producción de carotenoides, para la fabricación de un alimento probiótico, de un complemento nutricional, vitamínico o mineral, así como un método para la producción de carotenoides mediante dicha cepa.



WO 2010/142828 A1

## **NUEVA CEPA DE LACTOBACILLUS PLANTARUM PARA LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES.**

La presente invención se refiere a una nueva cepa bacteriana, CECT 7531, que pertenece a la especie *Lactobacillus plantarum*, o cualquier cepa mutante que proceda de la misma. La presente invención se refiere también al uso de dicha cepa para la producción de carotenoides, para la fabricación de un alimento probiótico, de un complemento nutricional, vitamínico o mineral, así como un método para la producción de carotenoides mediante dicha cepa.

### **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

Los carotenoides son un grupo de compuestos terpenoides coloreados y con propiedades antioxidantes que están muy extendidos en los reinos vegetal y animal, así como en hongos y en microorganismos fotosintéticos y no fotosintéticos. En estos últimos, aunque no son esenciales para su crecimiento como organismos heterótrofos, desempeñan importantes funciones biológicas. Así, en bacterias Gram positivas, los carotenoides juegan un papel importante protegiendo del estrés oxidativo al capturar radicales libres con sus dobles enlaces conjugados (Clauditz *et al.*, 2006, Infection and Immunity, 74: 4950–4953). También ha sido demostrada una correlación entre la producción de carotenoides y una disminución de la fluidez de la membrana plasmática, lo que proporciona, por ejemplo, resistencia al ácido oléico en *Staphylococcus aureus*. Además, los carotenoides son usados comercialmente como colorantes alimentarios, suplementos de comida de animales y, más recientemente, como parte de nutracéuticos, alimentos funcionales, cosméticos y productos farmacéuticos (Lee y Schmidt-Dannert, 2002. Applied Microbiology and Biotechnology, 60: 1-11).

En la actualidad, la ingeniería metabólica de diversos microorganismos, incluyendo los no carotenogénicos, está siendo explotada para la producción

biotecnológica de grandes cantidades de carotenoides razonablemente puros así como para sintetizar estructuras carotenoides novedosas usando estrategias combinatorias y de evolución *in vitro* (Lee y Schmidt-Dannert, 2002. Applied Microbiology and Biotechnology, 60: 1-11; Umeno *et al.*, 2005. Journal of Bacteriology 184: 6690-6699).

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son bacilos o cocos Gram positivos, de bajo contenido GC, microaerófilos, no esporulados, que fermentan azúcares para producir principalmente ácido láctico, y que están asociados por características fisiológicas comunes. Estas bacterias han sido históricamente asociadas con las fermentaciones de alimentos, y su importancia industrial está además evidenciada por su consideración de microorganismos generalmente seguros (*Generally Regarded As Safe*, GRAS, en inglés) (Holzapfel *et al.*, 1995. International Journal of Food Microbiology, 24: 343-362). Entre las BAL, las especies seleccionadas del género *Lactobacillus* son ampliamente usadas como probióticos, especialmente en productos lácteos y suplementos dietéticos (Klaenhammer *et al.*, 2005. FEMS Microbiology Reviews, 29: 393-409). Una de estas especies, *Lactobacillus plantarum*, es importante industrialmente, estando implicada en muchas fermentaciones de vegetales, al tiempo que es habitante natural del tracto intestinal humano (Johansson *et al.*, 1993. Applied and Environmental Microbiology, 59: 15-20).

El uso de una cepa bacteriana que tenga la capacidad de producir cantidades de carotenoides superiores a las que son obtenidas por cepas silvestres conocidas es de especial interés para su aplicación biotecnológica.

## EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una nueva cepa bacteriana, la cepa CECT 7531, que pertenece a la especie *Lactobacillus plantarum*, o cualquier cepa mutante que proceda de la misma. La presente invención se refiere también al

uso de dicha cepa para la producción de carotenoides, para la fabricación de un alimento probiótico, de un complemento nutricional, vitamínico o mineral, así como un método para la producción de carotenoides mediante dicha cepa.

5 En la presente invención se demuestra la presencia de biosíntesis de carotenoides C<sub>30</sub> en varias de las cepas de *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) estudiadas, especialmente en aquellas aisladas de fermentaciones de aceitunas. Una de estas cepas, la cepa CECT 7531, aislada de una fermentación de aceitunas de mesa, produjo una cantidad de carotenoides muy superior a la media (46,03 mg/kg peso seco), siendo esta producción unas dos veces y media superior a la segunda cepa mayor productora encontrada (LPT49/6, 19,18 mg/kg peso seco), lo cual supone un efecto inesperado. Además, los genes *crtM* y *crtN*, implicados en la biosíntesis del carotenoide C<sub>30</sub> 4,4'-diaponeurosporeno, están presentes en todas las cepas ensayadas.

15 La cepa CECT 7531 de *L. plantarum* de la presente invención puede ser usada para fermentar alimentos o piensos para animales. El uso de cepas seleccionadas super-productoras de carotenoides, como es el caso de la cepa de la presente invención, mejora su rendimiento en estas fermentaciones a través de un incremento de su resistencia a diferentes condiciones de estrés. Además, todo ello contribuye a incrementar la cantidad total de antioxidantes aportados en la dieta, tanto humana como animal. Debido a que *L. plantarum* es un reconocido habitante del tracto gastrointestinal, su uso en la dieta es de extraordinario interés ya que el microorganismo aporta una cantidad continua de moléculas antioxidantes en un lugar donde su acción protectora es muy bien recibida.

En este sentido, un aspecto de la presente invención es una cepa bacteriana, la cepa CECT 7531, que pertenece a la especie *Lactobacillus plantarum*, de acuerdo con los criterios moleculares definidos por Torriani *et al.*, (2001). Applied and Environmental Microbiology, 67: 3450-3454. La cepa CECT 7531 puede ser cultivada, pero sin limitarse, en medio MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, (1960).

Appl. Bact., 23: 130-135), a una temperatura de 30 °C en condiciones aerobias. Las condiciones de mantenimiento de dicha cepa son, pero sin limitarse, mediante cultivos saturados añadiendo 20 % glicerol y congelando a -80 °C, o mediante liofilización.

5

La cepa CECT 7531 de *Lactobacillus plantarum* procede de fermentaciones de aceitunas de mesa. Dicha cepa es capaz de producir una pigmentación amarilla de sus colonias aisladas cuando son crecidas en un medio sólido, semisólido o líquido. La pigmentación amarilla en medio líquido se demuestra al centrifugar estos cultivos y recoger los pellets de células correspondientes. Además, dicha cepa contiene los genes *crtM* y *crtN*, genes que codifican para las enzimas dehidroescualeno sintasa y dehidroescualeno desaturasa respectivamente, dos enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de carotenoides triperpenoides (con 30 átomos de carbono).

15

La cepa CECT 7531 puede ser utilizada para generar una cepa mutante (cepa mutante derivada). Dicha mutación puede ser espontánea o inducida. La mutación puede llevarse a cabo por medio de la aplicación de uno o varios métodos de mutagénesis. El método se selecciona, pero sin limitarse, de la lista que comprende mutagénesis química, mutagénesis por radiaciones o mutagénesis por elementos transponibles.

Las mutaciones espontáneas pueden ocurrir debido a la acción de las radiaciones naturales e incluso durante la replicación del ADN debido a errores en la lectura de las bases. La frecuencia de mutación (la proporción de mutantes en la población) puede aumentarse significativamente con el uso de métodos de mutación inducida.

Tanto las mutaciones espontáneas como las inducidas se producen como resultado de cambios estructurales en el genoma como por ejemplo, pero sin limitarse, cambio en el número de cromosomas, cambio en el orden de uno o varios genes dentro del cromosoma o cambio en la secuencia de bases dentro de un gen (mutación puntual). La mutación puntual puede provocar la sustitución de

30

un nucleótido por otro nucleótido o el desplazamiento de la pauta abierta de lectura (inserción o delección de uno o más nucleótidos).

El agente que provoca mutagénesis química se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, agentes que reaccionan con el ADN, agentes intercalantes o análogos de bases. El agente que reacciona con el ADN es capaz de reaccionar directamente con éste, aunque no se esté replicando, ocasionando cambios químicos en las bases que provocan un apareamiento incorrecto. El agente que reacciona con el ADN se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, ácido nitroso, hidroxilamina, agente alquilante (etil metano sulfonato [EMS], metil metano sulfonato [MMS], dietil sulfato [DES], diepoxi butano [DEB], N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina [NTG], N-metil-N-nitroso urea (gas mostaza), agente intercalante (acridina, bromuro de etidio o dihidroetidio).

La mutagénesis por radiaciones puede ser producida, pero sin limitarse, a radiaciones ultravioleta o radiaciones ionizantes como los rayos X o los rayos gamma.

La mutagénesis por elementos transponibles puede ser producida, pero sin limitarse, a la inserción de una secuencia de inserción o de un transposón en una secuencia de uno o varios genes de la cepa bacteriana de la presente invención.

La cepa CECT 7531 puede ser utilizada para generar una cepa recombinante (cepa recombinante derivada) mediante la introducción de genes que codifican para enzimas que puedan alterar y/o ampliar el rango de producción de compuestos carotenoides de la cepa parental, o bien de secuencias de ADN específicas que puedan ejercer esta función. Estos genes o secuencias de ADN pueden ser introducidos en la cepa parental mediante diversas técnicas como por ejemplo, pero sin limitarse, vectores de expresión basados en plásmidos adecuados, vectores suicidas, plásmidos conjugativos, transposones o fagos.

En adelante se podrá hacer referencia a la cepa CECT 7531 o a cualquier cepa mutante o recombinante derivada con el término “cepa/s de la presente invención” o “cepa/s de la invención”.

- 5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una población celular que comprende células de la cepa de la invención. La población celular es un conjunto de células que proceden de una o más células que pertenecen a la cepa de la presente invención. La población celular puede constituir una colonia. Una colonia es una población celular que procede de una sola célula.

10

En adelante se podrá hacer referencia a la población celular descrita en el párrafo anterior con el término “población celular de la presente invención” o “población celular de la invención”.

- 15 Un aspecto más de la invención se refiere al uso de la cepa de la presente invención o de la población celular para la producción de carotenoides. Una realización preferida se refiere al uso de dicha cepa o de dicha población celular donde el carotenoide es un triterpenoide.

- 20 Un triterpenoide es un terpenoide de 30 átomos de carbono (C<sub>30</sub>). El término isoprenoide se puede utilizar como sinónimo de terpenoide. Un terpenoide es una molécula lipídica formada por unidades de isopreno.

- Otra realización preferida se refiere al uso de la cepa de la invención o de la población celular, donde el triterpenoide es un diapocaroteno. El diapocaroteno se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, 4,4'-diapofitoeno, 4,4'-diapofitoflueno, 4,4'-diapo-zeta-caroteno, diapo-7,8,11,12-tetrahidrolicopeno, 4,4'-diaponeurosporeno, 4,4'-diapo-7,8,11,12-tetrahidrolicopeno, 4,4'-diaponeurosporeno o 4-hidroxi-4,4'-diapo-neurosporeno. En una realización más preferida,
- 25 el diapocaroteno es 4,4'-diaponeurosporeno.
- 30

Otro aspecto de la presente invención es el uso de la cepa o de la población celular de la invención para la fabricación de un alimento probiótico.

5 El término “probiótico” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios en la salud del organismo huésped. El organismo huésped puede ser un animal o un humano.

10 El término “alimento probiótico” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a un alimento al que se adicionan células de la cepa de la presente invención. El alimento probiótico de la presente invención contribuye al equilibrio de la flora bacteriana intestinal del huésped y, al constituir una fuente importante de carotenoides, aumenta las defensas antioxidantes del organismo huésped. El alimento probiótico de la presente invención es, pero sin limitarse, un producto  
15 lácteo como leche, batido, yogur o kéfir. El alimento probiótico puede ser un producto vegetal fermentado, como por ejemplo, pero sin limitarse, aceitunas, col, pepinillos, alcaparras, alcaparrones, zanahorias o jugos vegetales fermentados. Por otra parte, la cepa de la presente invención también puede ser utilizada para producir los citados alimentos fermentados al ser inoculada como cultivo activo en  
20 el material fermentable de partida.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de la cepa o de la población celular de la invención para la fabricación de un complemento nutricional. Una realización más preferida se refiere al uso de la cepa o la población  
25 celular de la invención para la fabricación de un complemento vitamínico y/o mineral.

Un “complemento nutricional (o nutritivo)” o un “complemento vitamínico y/o mineral” es una fuente concentrada de dichos nutrientes, solos o combinados, o  
30 más concretamente, de vitaminas y/o minerales, solos o combinados, que son ingeridos por un animal o un humano para completar su alimentación o incluso para aumentar el aporte de nutrientes, vitaminas y/o minerales. En la presente

invención, el complemento nutricional o el complemento vitamínico y/o mineral se fabrica combinando la cepa de la presente invención con los componentes de dichos complementos, obteniendo de esta manera un complemento rico en carotenoides.

5

Según otra realización preferida, el alimento probiótico o el complemento nutricional, preferiblemente cualquiera de los complementos vitamínico y/o mineral, se presenta en una forma adaptada a la administración oral. La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado. El alimento probiótico o cualquiera de los complementos descritos puede ser un pienso para animales.

10

15

En cada caso el alimento probiótico o cualquiera de los complementos descritos se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, se pueden presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración.

20 Otro aspecto de la presente invención es un método para la producción de carotenoides que comprende:

- a. Inocular la cepa o la población celular de la invención en un medio de cultivo,
- 25 b. cultivar dicha cepa o población en el medio de cultivo del apartado (a) durante un periodo de entre 15 y 35 horas, y
- c. extraer los carotenoides de las células obtenidas en el paso (b).

Una realización preferida se refiere al método, donde el medio de cultivo comprende al menos una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una solución tampón y componentes traza esenciales. El medio de cultivo del apartado (a) puede comprender además, peptona, triptona, extracto de levadura, extracto de

30

carne (*Beef extract*), polisorbato (como por ejemplo, pero sin limitarse, Tween 80). La fuente de carbono puede ser, pero sin limitarse, glucosa, galactosa, maltosa, lactosa, fructosa, sacarosa, manosa, almidón, melaza, o cualquiera de sus combinaciones. La fuente de nitrógeno puede ser, pero sin limitarse, citrato amónico, fosfato amónico, sulfato amónico, casaminoácidos, peptona de carne, peptona de caseína, peptona de soja, o cualquiera de sus combinaciones. La solución tampón puede ser, pero sin limitarse, acetato sódico, fosfato monoácido de potasio, citrato sódico, o cualquiera de sus combinaciones. Los componentes traza esenciales pueden ser, pero sin limitarse, magnesio, manganeso, zinc, cobre, molibdeno, hierro o níquel.

Según una realización preferida del método, la fuente de nitrógeno es citrato amónico, la solución que ayuda a controlar el pH es acetato sódico y/o fosfato monoácido de potasio y los componentes traza esenciales son magnesio y/o manganeso.

Según otra realización preferida del método, el periodo de cultivo de la cepa o población según el apartado (b) es de entre 20 y 30 horas. Más preferiblemente el periodo de cultivo es de entre 23 y 25 horas.

Otra realización más preferida se refiere al método, donde el pH del medio de cultivo, durante cualquier duración del periodo de cultivo, se mantiene entre 6 y 7. Para mantener el pH del medio de cultivo se lleva a cabo una medida del mismo mediante una toma de muestras serial o mediante una medida continua y la rectificación del mismo mediante la adición de un ácido o una base como por ejemplo, pero sin limitarse, ácido clorhídrico o hidróxido sódico, respectivamente.

Otro aspecto de la presente invención es una composición probiótica que comprende la cepa o el cultivo celular de la presente invención. Dicha composición probiótica puede contener, además, una o más cepas de una bacteria de la misma especie o de una especie diferente o de cualquier otro microorganismo como por ejemplo un hongo o una levadura. La bacteria se selecciona de la lista que

comprende, pero sin limitarse, *Lactobacillus acidophilus* (en adelante el término “*Lactobacillus*” se abreviará como “L.”), *L. casei*, *L. casei* var. *Shirota*, *L. fermentum*, *L. crispatus*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. gasseri*, *L. cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium longum*,  
5 *Bifidobacterium adolescentis*, *Streptococcus salivaris*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus diacetylactis* o *Streptococcus intermedius*.

La composición probiótica puede presentarse en una forma adaptada a la administración oral, como por ejemplo, pero sin limitarse, en forma de gotas,  
10 jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a una composición probiótica, que además comprende un vehículo. El vehículo se selecciona de la  
15 lista que comprende, pero sin limitarse, nutraceutico, alimento funcional, composición farmacéutica, alimento lácteo o alimento vegetal. Según una realización más preferida, el vehículo es un alimento lácteo. Preferiblemente el alimento lácteo es leche fermentada. La leche fermentada se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, queso, crema de leche, crema agria, yogurt,  
20 kéfir o koumiss. Según otra realización preferida, el vehículo también puede ser un alimento vegetal. Preferiblemente el alimento vegetal es fermentado. El alimento vegetal fermentado se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, aceitunas, col, pepinillos, alcaparra, alcaparrón, zanahoria o jugo vegetal fermentado.

25 Un compuesto nutraceutico tal como se entiende en la presente invención es un suplemento dietético, presentado en una matriz no alimenticia como por ejemplo, pero sin limitarse, píldoras, cápsulas o polvo, de una sustancia natural bioactiva concentrada presente en los alimentos y que, tomada en dosis superior a la  
30 existente en esos alimentos, tiene un efecto beneficioso sobre la salud, mayor que el que podría tener el alimento normal.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 10 DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

**FIG. 1. Muestra el análisis cromatográfico típico de los pigmentos carotenoides extraídos de los pellets de células de cepas de *L. plantarum*.**

15 En los paneles de la derecha se muestran los espectros de absorción de los picos cromatográficos correspondientes a 4,4'-diaponeurosporeno (1), 4,4'-diapo-zeta-caroteno (2) y 4,4'-diapofitoflueno (3), con indicación de sus máximos expresados en nanómetros (nm).

20 **FIG. 2. Muestra la ruta biosintética de compuestos carotenoides triterpenoides (C<sub>30</sub>) y tetraterpenoides (C<sub>40</sub>).**

## EJEMPLOS

25

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores. Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos no pretenden limitar el campo de aplicación de la misma.

**EJEMPLO 1. Producción del triterpenoide 4,4'-diaponeurosporeno por varias cepas de *L. plantarum*.**

Se realizó un cultivo de las cepas de *L. plantarum* (Tabla 1) en las condiciones  
5 propuestas en la presente invención. Alícuotas del cultivo se centrifugaron, y se  
obtuvieron pellets que fueron sometidos a extracción y análisis cromatográfico. En  
todos los casos en los que hubo producción de carotenoides, se observó un pico  
cromatográfico principal a 14.8 minutos (FIG. 1). El espectro de absorción mostró  
10 máximos a 416, 438 y 468 nm (%III/II=95), lo cual es consistente con la presencia  
de un cromóforo conteniendo nueve dobles enlaces conjugados. En un principio,  
estas propiedades sugirieron la presencia de neurosporeno en las muestras  
analizadas, sin embargo la movilidad cromatográfica para este pico fue diferente,  
fluyendo a tiempos de retención menores (cerca de 1 minuto) que para  
neurosporeno (menor polaridad). El espectro de masas mostró un ión  
15 quasimolecular  $[M+H]^+$  a  $m/z$  403, lo cual está en consonancia con la fórmula  
molecular  $C_{30}H_{42}$  correspondiente a 4,4'-diaponeurosporeno (FIG 2, pico 1). Estos  
datos corroboran los descritos por Breithaupt *et al.*, (2001). European Food  
Research and Technology, 213: 231-233) para *L. plantarum* LTH4936. Otros dos  
picos minoritarios se encontraron a 15.3 y 15.6 minutos (FIG. 2, picos 2 y 3),  
20 mostrando espectro de absorción UV-visible con máximos a 380, 402, 426nm  
(%III/II=93) y 333, 349, 368 nm (%III/II=81), respectivamente. El espectro de masas  
de estos picos mostró fragmentos  $[M+H]^+$  a  $m/z$  405 y 407 respectivamente, los  
cuales están en concordancia con las fórmulas moleculares  $C_{30}H_{44}$  y  $C_{30}H_{46}$ ,  
correspondientes a 4,4'-diapo-zeta-caroteno y 4,4'-diapofitoflueno (también  
25 denominado como 4,4'-diapo-7,8,11,12-tetrahidrolicopeno) respectivamente, y  
correspondientes a los intermediarios biosintéticos de la ruta de formación de 4,4'-  
diaponeurosporeno (FIG. 1) (Wieland *et al.*, (1994). Journal of Bacteriology, 176:  
7719-7726). Aunque la mayoría de los pigmentos carotenoides encontrados en  
bacterias son tetraterpenoides ( $C_{40}$ ), algunos triperpenoides ( $C_{30}$ ) han sido  
30 descritos en tres especies de bacterias no-fotosintéticas, tales como *S. aureus*,  
*Streptococcus faecium* y *Methylobacterium rhodinum*, así como en las especies  
fotosintéticas analizadas de heliobacterias. Tanto en el caso de los carotenoides

C<sub>30</sub> como los C<sub>40</sub>, la ruta biosintética comienza con la síntesis del isoprenoide isopentenil pirofosfato (IPP), el cual, después de la elongación de la cadena, catalizado por prenyl transferasas, es convertido en farnesyl pirofosfato (FPP) o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). FPP (C<sub>15</sub>) y GGPP (C<sub>20</sub>) son los precursores inmediatos de los carotenoides C<sub>30</sub> y C<sub>40</sub>, respectivamente (Lee y Schmidt-Dannert, 2002. Applied Microbiology and Biotechnology, 60: 1-11). La condensación cola-con-cola de dos moléculas de GGPP, catalizado por la enzima fitoeno sintetasa, da lugar al primer carotenoide, fitoeno. Del mismo modo, la condensación de dos moléculas de FPP, catalizada por la enzima dehidrosqualeno sintetasa, da lugar a dehidrosqualeno (también denominado diapofitoeno), el primer carotenoide C<sub>30</sub>. Seguidamente, varias reacciones sucesivas de desnaturalización incrementan el número de dobles enlaces conjugados inicialmente presentes en fitoeno o dehidroesqualeno para producir carotenoides coloreados (Lee y Schmidt-Dannert, 2002. Applied Microbiology and Biotechnology, 60: 1-11). Aunque las desaturasas son específicas de las rutas C<sub>30</sub> o C<sub>40</sub>, alguna intercambiabilidad, natural o inducida a través de ingeniería molecular, ha sido descrita en diversos estudios (Raisig y Sandmann, 2001. Biochimica and Biophysica Acta, 1533: 164-170; Umeno *et al.* 2005. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 69: 51-78). En los pocos microorganismos productores de carotenoides C<sub>30</sub>, el producto final acumulado es 4,4'-diaponeurosporeno o un compuesto derivado de éste por oxidación o incluso glicosilación, como es el caso de staphyloxanthin en *S. aureus* (Pelz *et al.*, 2005. Journal of Biological Chemistry, 280: 32493-32498). La naturaleza triterpenoide de estos compuestos evita la ciclación de los extremos terminales como en el caso de los carotenoides C<sub>40</sub>, y por lo tanto la diversidad estructural de los derivados de esta ruta es menor (Lee y Schmidt-Dannert, 2002. Applied Microbiology and Biotechnology, 60: 1-11; Umeno *et al.* 2005. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 69: 51-78).

**EJEMPLO 2. Estimación cualitativa y cuantitativa de la producción de 4,4'-diaponeurosporeno por cepas de *L. plantarum*.**

Como se muestra en la Tabla 1, la mitad de los pellets celulares de las cepas de *L.*  
5 *plantarum* descritas en el Ejemplo 1, aparecieron amarillos a simple vista (debido a la producción de carotenoides). Cultivos líquidos de cepas seleccionadas que se incubaron durante 24, 48, 72 y 96 horas mostraron que después de las primeras 24 horas de incubación, el contenido de carotenoides disminuía progresivamente. Por otra parte, en ensayos preliminares con algunas cepas seleccionadas se comprobó  
10 que el medio de cultivo donde más carotenoides se producían era el denominado DM1. Por lo tanto, las condiciones estándar para el estudio comparativo de producción de carotenoides en cepas de *L. plantarum* se establecieron como cultivos líquidos de 500 ml de medio DM1, inoculados con una colonia aislada e incubados estáticamente a 30 °C durante 24 h.

**Tabla 1.** Cepas de *Lactobacillus plantarum* estudiadas y producción de 4,4'-diaponeurosporeno.

| Cepa                  | Origen                  | Color <sup>1</sup> | 4,4'-diaponeurosporeno<br>(mg/kg peso seco) | PCR <sup>2</sup> | Fuente <sup>3</sup> |
|-----------------------|-------------------------|--------------------|---------------------------------------------|------------------|---------------------|
| CECT 7531             | Fermentac. de aceitunas | A                  | 46,03                                       | 1                | IG                  |
| LPT49/6               | Fermentac. de aceitunas | A                  | 19,18                                       | 1                | IG                  |
| LPT44/1               | Fermentac. de aceitunas | A                  | 18,97                                       | 1                | IG                  |
| LPJ10                 | Fermentac. de aceitunas | A                  | 14,78                                       | 1                | IG                  |
| LPT57/2               | Fermentac. de aceitunas | A                  | 9,19                                        | 1                | IG                  |
| NC8                   | ensilado de hierba      | A                  | 8,83                                        | 1                | Matforsk            |
| ATCC10241             | col fermentada          | A                  | 6,33                                        | 1                | ATCC                |
| RP1                   | inóculo comercial       | A                  | 4,95                                        | 1                | RP                  |
| ATCC14431             | ensilado de hierba      | B                  | 2,30                                        | 1                | ATCC                |
| CECT 748 <sup>T</sup> | col fermentada          | B                  | 1,78                                        | 1                | CECT                |
| ATCC8014              | ensilado de maíz        | B                  | trazas                                      | 1                | ATCC                |
| BE5                   | queso                   | B                  | trazas                                      | 2                | IPLA                |
| CA2A3                 | queso                   | B                  | trazas                                      | 1                | IPLA                |
| CECT 220              | ensilado de maíz        | B                  | trazas                                      | 1                | CECT                |
| LL441                 | queso                   | B                  | trazas                                      | 1                | IPLA                |
| VI1                   | queso                   | B                  | trazas                                      | 2                | IPLA                |

5 <sup>1</sup> Color a simple vista de los pellets de células obtenidos tras centrifugación de los cultivos: A = amarillo; B = blanco.

<sup>2</sup> Pareja de cebadores que amplificó el operón crtN-crtM en esa cepa en particular: 1 = SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2; 2= SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 2;.

10 <sup>3</sup>Fuentes: IG: José Luis Ruiz Barba, Instituto de la Grasa-CSIC, Sevilla; Matforsk: Lars Axelsson, Norwegian Food Research Institute, Osloveien, Noruega; ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA; RP: Rhône-Poulenc Industries SA, Courbevoie, Francia; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot, Valencia; IPLA: Baltasar Mayo, Instituto de Productos Lácteos de Asturias-CSIC, Asturias.

<sup>T</sup>Cepa tipo.

En todas las cepas estudiadas, la producción de diaponeurosporeno estuvo comprendida entre niveles de trazas, apenas distinguibles como picos

cromatográficos en los análisis por HPLC, y los 46,03 mg/kg de peso seco producidos por la cepa CECT 7531 de *L. plantarum* (Tabla 1). El color amarillo de los pellets fue evidente a simple vista para aquellas cepas que producían al menos 4,95 mg de diaponeurosporeno por kg de peso seco (Tabla 1). Se encontró una

5 cierta correlación entre la producción de pigmentos carotenoides y el origen de las diferentes cepas estudiadas. Así, las cepas aisladas de fermentaciones de aceitunas de mesa fueron las más productoras, mientras que en las aisladas de queso o ensilados de maíz sólo se encontraron trazas de compuestos carotenoides. La producción de carotenoides por microorganismos es muy diversa

10 en lo que respecta a niveles de producción, lo cual unido a los diferentes métodos de cuantificación empleados, hace difícil la comparación entre especies y cepas distintas. A todo ello hay que añadir que diversos autores han descrito diversos modos de estimular la síntesis de carotenoides en microorganismos a través de las condiciones y medios de cultivo (Bhosale, 2004. Applied Microbiology and

15 Biotechnology, 63: 351-361). De este modo, aumentos de dos a mil veces en la producción de carotenoides han sido conseguidos mediante cambios en irradiación lumínica, temperatura de cultivo, y la adición de diversos compuestos químicos. Resultados preliminares obtenidos por los inventores han mostrado diferencias amplias en la producción y contenido final de diaponeurosporeno en función de la

20 marca y composición del medio de cultivo empleado, a pesar de que en todos los casos la densidad celular a las 24 horas de incubación a 30 °C, antes de la extracción de carotenoides, fuera virtualmente la misma. Este resultado ilustra la importancia e influencia de la composición del medio de cultivo en relación a la biosíntesis de carotenoides. En la presente invención se selecciona el medio

25 definido DM1, tal como se ha mencionado anteriormente, como el más rentable a este respecto.

### **EJEMPLO 3. Análisis de la presencia del operón *crtN-crtM* en las cepas de *L. plantarum* estudiadas.**

30

Los análisis genéticos a través de PCR mostraron que todas las cepas de *L. plantarum* estudiadas contenían los genes *crtN* y *crtM* dispuestos como un operón,

tal y como había sido descrito en la secuencia anotada del genoma completo de *L. plantarum* WCFS1 (Kleerebezem *et al.*, 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100: 1990-1995). Un fragmento de ADN amplificado de 2.379 pb pudo ser obtenido de casi todas las cepas cuando se usaron los  
5 cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 (Ver notas al pie de Tabla 1), con 58 ó 60 °C como la temperatura de anillamiento. Sin embargo, con dos cepas con las que no se obtuvo amplificación de esta forma, pudo obtenerse un fragmento de ADN amplificado de 2.396 pb cuando los cebadores SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 2 fueron  
10 usados (Ver notas al pie de Tabla 1), con 58 °C como la temperatura de anillamiento. Estos resultados sugieren que pueden aparecer pequeñas variaciones en la secuencia de ADN de los genes estudiados en todas las cepas. Las dos cepas de las que sólo se pudo amplificar ADN específico con la segunda pareja de cebadores fueron aisladas de quesos, no produciendo cantidades apreciables de carotenoides ninguna de ellas. La funcionalidad del operón *crtN-crtM*,  
15 *crtM*, por tanto, aunque retenida en la mitad de las cepas estudiadas, puede perderse debido a ligeras variaciones en la secuencia de ADN tal y como denotan los resultados obtenidos con los ensayos de PCR específicos. Además, estas variaciones podrían ser la causa de las grandes diferencias en producción de carotenoides observadas entre las distintas cepas ensayadas. Por otra parte, el  
20 hecho de que incluso en aquellas cepas donde sólo se encontraron trazas de producción de diaponeurosporeno contenían el operón *crtN-crtM*, en cualquiera de sus "variantes PCR" encontradas, sugiere que estos genes están bastante conservados entre las distintas cepas de *L. plantarum*, muy probablemente debido a que, debido a su función, merecen ser preservados. Experimentos de  
25 optimización con estas cepas que sólo producen trazas de carotenoides serían necesarios para saber si su baja producción es debida a albergar genes *crtN* o *crtM* defectuosos o bien a que otras características metabólicas específicas están involucradas.

## **Materiales y métodos**

### **Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo.**

- 5 Las cepas de *L. plantarum* usadas en este estudio, y que se describen en la Tabla 1, fueron propagadas en agar MRS (Oxoid) a 30 °C. Para los experimentos de optimización preliminares, fueron usados caldos MRS de distintas procedencias, incluyendo los fabricados por Oxoid, Difco, Biokar y Merck. También para este propósito, se usaron dos caldos de cultivo definidos distintos: DM1, conteniendo, por litro, glucosa (Panreac, 20 g), peptona (Difco, 10 g), extracto de carne (Oxoid, 8 g), extracto de levadura (Oxoid, 4 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fluka, 2 g), acetato sódico·3H<sub>2</sub>O (Fluka, 5 g), citrato triamónico (Merck, 2 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Merck, 0.2 g), MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O (Merck, 0.05 g), y Tween 80 (Sigma, 1 ml); y DM2, conteniendo, por litro, glucosa (Panreac, 22 g), extracto de levadura (Oxoid, 10 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fluka, 2.5 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Merck, 0.05 g), MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (Merck, 0.005 g), y Tween 80 (Sigma, 0.2 ml). En todos los casos, el pH se ajustó a 6,5 con HCl (10N) y los caldos de cultivo se esterilizaron a 121 °C, 1 atm, durante 15 min.

### **Cultivos de *L. plantarum* para la producción de carotenoides.**

- 20 Para la producción de carotenoides en condiciones estándar, alícuotas de 500 ml de caldo DM1 se inocularon con una colonia aislada de la cepa de *L. plantarum* a testar. Los cultivos se incubaron a 30 °C, sin aireación, durante 24, 48, 72 ó 96 h. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 12.000 x g, a 4 °C durante 15 min, se lavaron con agua destilada estéril y se centrifugaron de nuevo para obtener un pellet que fue posteriormente liofilizado. Estas muestras se conservaron a -20°C hasta la extracción de los carotenoides y el análisis cromatográfico de los mismos. Los datos obtenidos fueron expresados en términos de peso seco.

### **Extracción de carotenoides y su análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).**

El precipitado resultante de centrifugar el cultivo bacteriano (1 gramo) se introdujo en un tubo de ensayo de 15 ml, con tapón de rosca, y se extrajo con 10 ml de N,N-dimetilformamida durante 15 min a 65°C. Las células se separaron y retiraron mediante centrifugación a 5.000 rpm, y la fase superior, conteniendo los pigmentos carotenoides, se transfirió a un embudo de decantación. La operación se repitió hasta la extracción completa del color (normalmente 4 extracciones fueron suficientes). Todos los extractos se reunieron y se mezclaron con 100 ml de éter dietílico, añadiendo seguidamente unos 50 a 100 ml de solución de NaCl al 10% (p/v) para ayudar a la separación de las fases. Seguidamente la fase orgánica se secó haciéndola pasar por un lecho de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó con la ayuda de un evaporador rotatorio a vacío. La muestra se disolvió en 1 ml de acetona, se centrifugó a 12.000 rpm, y se almacenó a -30 °C hasta su análisis.

El seguimiento y cuantificación de los pigmentos carotenoides bacterianos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, usando un método cromatográfico previamente desarrollado en nuestro laboratorio (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, (1993). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 41: 1616-1620). En este método se emplea una columna de fase reversa C18 (Waters Spherisorb ODS2 column; 250×4.6 mm I.D., tamaño de partícula 5 µm) (Waters Ltd., Hertsfordshire, United Kingdom) y un gradiente de elución binario acetona-agua a un flujo de 1.5 ml/min. El volumen de inyección fue de 5 µl y la detección de los pigmentos se realiza espectrofotométricamente a 440 nm. La cuantificación se realizó mediante una recta de calibrado preparada con β-caroteno (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO). El sistema de análisis mediante HPLC consistió en una bomba cuaternaria Waters 600E equipada con un detector de fotodiodos (PDA 996, Waters), controlados con el software Empower2 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA).

**Aislamiento e identificación de pigmentos.**

Se utilizaron procedimientos rutinarios para el aislamiento e identificación de pigmentos carotenoides, descritos en detalle en publicaciones previas de nuestro grupo de investigación (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, (1993). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 41: 1616-1620), y que brevemente consisten en: separación y aislamiento de los pigmentos mediante cromatografía en capa fina (TLC) sobre placas de silicagel 60GF, y co-cromatografía con patrones de pigmentos; adquisición de los espectros UV-visible en diferentes disolventes y comparación con los valores descritos en la literatura (Britton, (1995). UV/Visible Spectroscopy. En: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, editores. Carotenoids. Volume 1B: Spectroscopy. Basel, Switzerland: Birkhäuser), así como la realización de pruebas químicas para determinar la presencia de grupos 5,6-epoxido (adición de 2% HCl en etanol), de grupos hidroxilo mediante acetilación con Ac<sub>2</sub>O/Py, y de grupos carbonilos mediante la reducción con NaBH<sub>4</sub> en etanol.

**Análisis genético.**

La presencia del operón *crtN-crtM* en las diferentes cepas de *L. plantarum* fue detectada mediante PCR, usando cebadores oligonucleotídicos diseñados a partir de las secuencias de nucleótidos publicadas para estos genes en *L. plantarum* WCFS1 (Nº de acceso GeneBank AL935261; Kleerebezem *et al.*, 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100: 1990-1995). El par de cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 se utilizó para la amplificación de un fragmento (2.379 pares de bases [pb]) de ADN que incluía secuencias codificantes para ambos genes. Alternativamente, en aquellos casos en los que el primer par de cebadores no funcionó, se utilizó el par de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 2 para amplificar un fragmento de ADN de 2.396 pb que incluía parte del promotor del operón *crtN-crtM*. Se introdujeron sitios de restricción para *EcoRI* en el extremo 5' terminal de los cebadores SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 2, y un sitio de restricción para *KpnI* en el extremo 5' del cebador SEQ ID NO: 3 a fin de facilitar futuras estrategias de clonación (letras en negrilla en la secuencia anteriormente descrita).

Además, se introdujeron secuencias de anclaje ("clamps") en el extremo 5' para asegurar una digestión correcta por las enzimas de restricción (letras en itálica en la secuencia del cebador anteriormente descrita). El ADN total de colonias de *L. plantarum* fue extraído según el protocolo descrito por Ruiz-Barba et al. (Ruiz-Barba et al., 2005. Analytical Biochemistry 347, 333-335). La amplificación de los fragmentos de ADN fue realizada en mezclas de reacción de 100 µl, conteniendo 2.5 mM MgCl, 1x buffer de reacción, 100 µM de cada deoxynucleoside triphosphates, 100 pmol de cada cebador, 5 U de *Taq* ADN polimerasa (Promega), y 5 µl de ADN total de colonias como sustrato. Para la amplificación se utilizó un sistema termociclador GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer) usando las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 15 seg, anillamiento a 60 °C durante 30 seg, y polimerización a 72 °C durante 2 min, más una etapa final de polimerización a 72 °C durante 4 min. Alternativamente, cuando no se obtuvo amplificación en las condiciones anteriores, se utilizó 58 °C como temperatura de anillamiento. Los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR fueron finalmente analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Búsquedas de homología de secuencias de ADN y proteínas fueron realizadas usando el programa WU-Blast2 desarrollado por EMBL-EBI ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)).

**REIVINDICACIONES**

1. Cepa bacteriana CECT 7531 de *Lactobacillus plantarum*.
- 5      2. Población celular que comprende células de la cepa según la reivindicación 1.
3. Uso de la cepa o de la población celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la producción de carotenoides.
- 10      4. Uso de la cepa o de la población celular según la reivindicación 3 donde el carotenoide es un triterpenoide.
- 15      5. Uso de la cepa o de la población celular según la reivindicación 4 donde el triterpenoide es un diapocaroteno.
6. Uso de la cepa o de la población celular según la reivindicación 5 donde el diapocaroteno es 4,4'-diaponeusporeno.
- 20      7. Uso de la cepa o de la población celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la fabricación de un alimento probiótico.
8. Uso de la cepa o de la población según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la fabricación de un complemento nutricional.
- 25      9. Uso de la cepa o de la población según la reivindicación 8, donde el complemento nutricional es un complemento vitamínico y/o mineral.
- 30      10. Uso de la cepa o de la población celular según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el alimento probiótico o el complemento nutricional se presenta en una forma adaptada a la administración oral.

11. Método para la producción de carotenoides que comprende:

- a. Inocular la cepa o la población celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en un medio de cultivo,
- 5 b. cultivar dicha cepa o población celular en el medio de cultivo del apartado (a) durante un periodo de entre 15 y 35 horas, y
- c. extraer los carotenoides de las células obtenidas en el paso (b).

12. Método según la reivindicación 11, donde el medio de cultivo comprende al  
10 menos una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una solución tampón y componentes traza esenciales.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, donde la fuente  
15 de nitrógeno es citrato amónico, la solución tampón es acetato sódico y/o fosfato monoácido de potasio y los componentes traza esenciales son magnesio y/o manganeso.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde el periodo  
20 de cultivo de la cepa o población celular según el apartado (b) es de entre 20 y 30 horas.

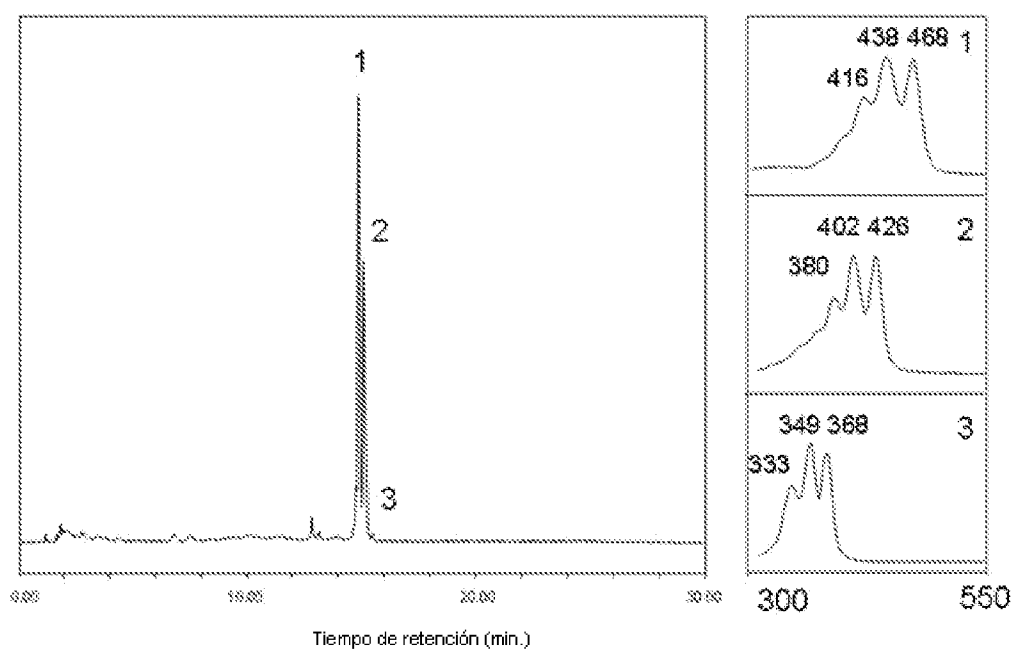
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde el pH del  
25 medio de cultivo durante el periodo de cultivo del apartado (b) se mantiene entre 6 y 7.

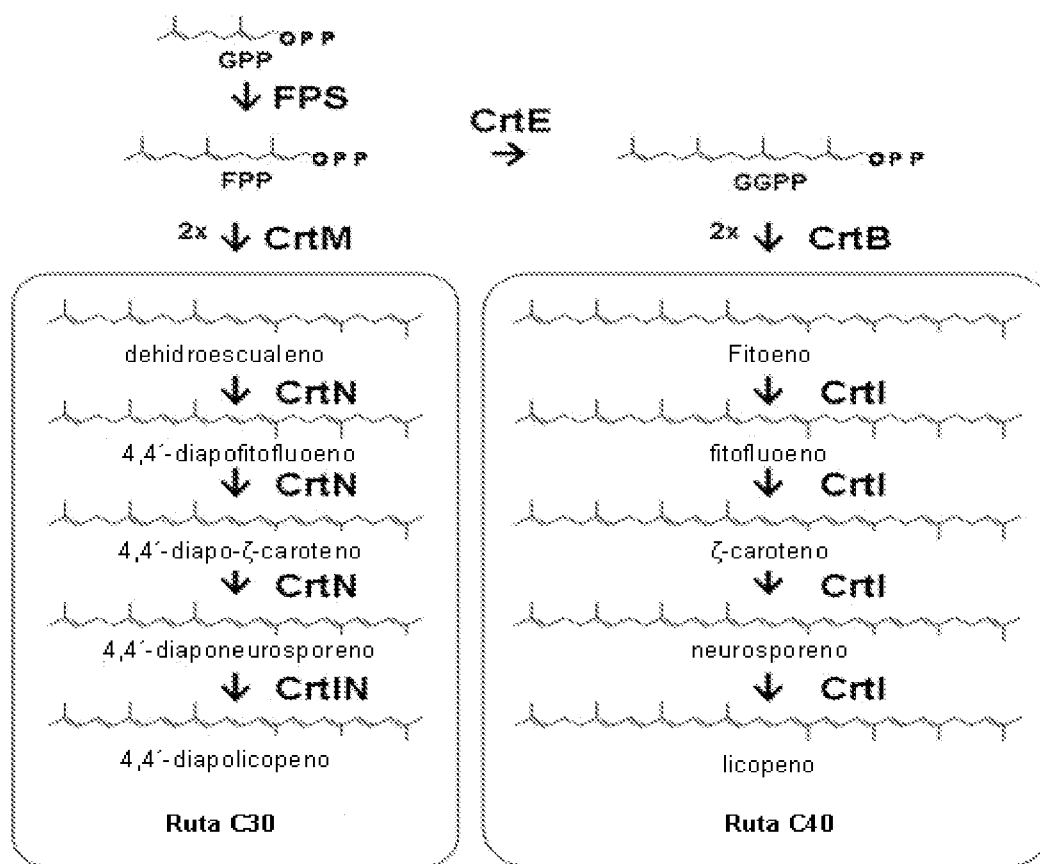
16. Composición probiótica que comprende la cepa o el cultivo celular según  
cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

17. Composición probiótica según la reivindicación 16, que además comprende  
30 un vehículo.

18. Composición probiótica según la reivindicación 17 donde el vehículo es un alimento lácteo.

5 19. Composición probiótica según la reivindicación 17 donde el vehículo es un alimento vegetal.

**FIG. 1**



**FIG. 2**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ ES 2010/070375

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC,WPI, BIOSIS,MEDLINE,EMBASE,CAPLUS,FSTA

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                       | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| P,X       | GARRIDO-FERNANDEZ J. ET AL., "Carotenoid production in Lactobacillus plantarum". International Journal of Food Microbiology (2010), 140(1), pág.34-39, the whole document.                                               | 1-19                  |
| A         | BREITHAUP D.E. ET AL., "Characterization of the triterpenoid 4,4'-diaponeurosporene and its isomers in food-associated bacteria". European Food Research and Technology (2001), 213(3), pág. 231-233,the whole document. | 1-19                  |
| A         | KROECKEL L. "Bacterial carotenoid stains cooked sausage (Weisswurst) yellow" Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach, (2007), 46(178) pág. 223-230.                                                               | 1-19                  |
| A         | SACHINDRA N. M. ET AL., "Recovery of carotenoids from insilaged shrimp waste" Bioresource Technology (2007), 98, pág. 1642-1646.                                                                                         | 1-19<br>1-19          |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                         |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.                                                               |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                |
| "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means                                                                                            | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                         | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                               |

Date of the actual completion of the international search

24.September.2010 (24.09.2010)

Date of mailing of the international search report

(06/10/2010)

Name and mailing address of the ISA/  
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M. Hernández Cuéllar

Telephone No. +34 91 349 84 09

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2010/070375

C (continuation).

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | WO 0070972 A1 (PROBI AB ) 30.11.2000, the whole document                            | 1-19                  |
| A         | US 2004268436 A1 (CHENG Q et al.) 30.12.2004, the whole document                    | 1-19                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2010/070375

| Patent document cited<br>in the search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-----------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 0070972 A                                  | 30.11.2000          | SE 9901856 A               | 24.11.2000          |
|                                               |                     | SE 9901856 L               | 24.11.2000          |
|                                               |                     | CA 2374044 AC              | 30.11.2000          |
|                                               |                     | AU 4969100 A               | 12.12.2000          |
|                                               |                     | NO 20015405 A              | 05.11.2001          |
|                                               |                     | NO 323353 B                | 02.04.2007          |
|                                               |                     | EP 1178740 AB              | 13.02.2002          |
|                                               |                     | EP 20000931878             | 22.05.2000          |
|                                               |                     | CN 1351473 A               | 29.05.2002          |
|                                               |                     | CN 1188055 C               | 09.02.2005          |
|                                               |                     | JP 2003500036 T            | 07.01.2003          |
|                                               |                     | NZ 515799 A                | 30.05.2003          |
|                                               |                     | MXPA 01011967 A            | 04.09.2003          |
|                                               |                     | BR 0011277 A               | 18.11.2003          |
|                                               |                     | PL 354359 A                | 12.01.2004          |
|                                               |                     | PL 197791 B                | 30.04.2008          |
|                                               |                     | AU 772809 B                | 06.05.2004          |
|                                               |                     | SE 523771 C                | 18.05.2004          |
|                                               |                     | AT 311122 T                | 15.12.2005          |
|                                               |                     | DK 1178740 T               | 27.12.2005          |
|                                               |                     | ES 2249269 T               | 01.04.2006          |
|                                               |                     | DE 60024438 T              | 29.06.2006          |
|                                               |                     | US 7311932 B               | 25.12.2007          |
| US 2004268436 A                               | 30.12.2004          | US 7098000 B               | 29.08.2006          |
|                                               |                     | WO 2005079183 A            | 01.09.2005          |
|                                               |                     | EP 1633862 A               | 15.03.2006          |
|                                               |                     | EP 20040809435             | 04.06.2004          |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2010/070375

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

***C12N 1/20*** (2006.01)

***C12P 23/00*** (2006.01)

***A23L 1/30*** (2006.01)

***C12R 1/25*** (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°  
PCT/ ES 2010/070375

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
C12N, C12P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC,WPI, BIOSIS,MEDLINE,EMBASE,CAPLUS,FSTA

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                | Relevante para las reivindicaciones N° |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| P,X        | GARRIDO-FERNANDEZ J. ET AL., "Carotenoid production in Lactobacillus plantarum". International Journal of Food Microbiology (2010), 140(1), pág.34-39, todo el documento.                                               | 1-19                                   |
| A          | BREITHAUP D.E. ET AL., "Characterization of the triterpenoid 4,4'-diaponeurosporene and its isomers in food-associated bacteria". European Food Research and Technology (2001), 213(3), pág. 231-233,todo el documento. | 1-19                                   |
| A          | KROECKEL L. "Bacterial carotenoid stains cooked sausage (Weisswurst) yellow" Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach, (2007), 46(178) pág. 223-230.                                                              | 1-19                                   |
| A          | SACHINDRA N. M. ET AL., "Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste" Bioresource Technology (2007), 98, pág. 1642-1646.                                                                                        | 1-19<br>1-19                           |

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

|                                                                                                                                                                                              |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Categorías especiales de documentos citados:                                                                                                                                               | "T" | documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.     |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.                                                                                      | "X" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.                                                                                    |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.                                                                   | "Y" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" | documento que forma parte de la misma familia de patentes.                                                                                                                                                                                                                 |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.                                                                           |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.                                                         |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

24.Septiembre.2010 (24.09.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

06-OCTUBRE-2010 (06/10/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. Hernández Cuéllar

N° de teléfono +34 91 349 84 09

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2010/070375

C (continuación).

## DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones N° |
|------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| A          | WO 0070972 A1 (PROBI AB ) 30.11.2000, todo el documento                  | 1-19                                   |
| A          | US 2004268436 A1 (CHENG Q et al.) 30.12.2004, todo el documento          | 1-19                                   |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2010/070375

| Documento de patente citado<br>en el informe de búsqueda | Fecha de<br>Publicación | Miembro(s) de la<br>familia de patentes | Fecha de<br>Publicación |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|
| WO 0070972 A                                             | 30.11.2000              | SE 9901856 A                            | 24.11.2000              |
|                                                          |                         | SE 9901856 L                            | 24.11.2000              |
|                                                          |                         | CA 2374044 AC                           | 30.11.2000              |
|                                                          |                         | AU 4969100 A                            | 12.12.2000              |
|                                                          |                         | NO 20015405 A                           | 05.11.2001              |
|                                                          |                         | NO 323353 B                             | 02.04.2007              |
|                                                          |                         | EP 1178740 AB                           | 13.02.2002              |
|                                                          |                         | EP 20000931878                          | 22.05.2000              |
|                                                          |                         | CN 1351473 A                            | 29.05.2002              |
|                                                          |                         | CN 1188055 C                            | 09.02.2005              |
|                                                          |                         | JP 2003500036 T                         | 07.01.2003              |
|                                                          |                         | NZ 515799 A                             | 30.05.2003              |
|                                                          |                         | MXPA 01011967 A                         | 04.09.2003              |
|                                                          |                         | BR 0011277 A                            | 18.11.2003              |
|                                                          |                         | PL 354359 A                             | 12.01.2004              |
|                                                          |                         | PL 197791 B                             | 30.04.2008              |
|                                                          |                         | AU 772809 B                             | 06.05.2004              |
|                                                          |                         | SE 523771 C                             | 18.05.2004              |
|                                                          |                         | AT 311122 T                             | 15.12.2005              |
|                                                          |                         | DK 1178740 T                            | 27.12.2005              |
|                                                          |                         | ES 2249269 T                            | 01.04.2006              |
|                                                          |                         | DE 60024438 T                           | 29.06.2006              |
|                                                          |                         | US 7311932 B                            | 25.12.2007              |
| US 2004268436 A                                          | 30.12.2004              | US 7098000 B                            | 29.08.2006              |
|                                                          |                         | WO 2005079183 A                         | 01.09.2005              |
|                                                          |                         | EP 1633862 A                            | 15.03.2006              |
|                                                          |                         | EP 20040809435                          | 04.06.2004              |

## CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

***C12N 1/20*** (2006.01)

***C12P 23/00*** (2006.01)

***A23L 1/30*** (2006.01)

***C12R 1/25*** (2006.01)