



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 277 546**

② Número de solicitud: 200502849

⑤ Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2006.01)

**A23C 9/123** (2006.01)

**A21D 13/00** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**C12R 1/645** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **21.11.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2007**

Fecha de la concesión: **16.05.2008**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2008**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2008**

⑰ Titular/es: **NATRACEUTICAL, S.A.**  
**Plaza América, nº 2 - 9ª Planta**  
**46004 Valencia, ES**

⑱ Inventor/es: **Genovés Martínez, Salvador;**  
**Barreras Martínez, David;**  
**Tortajada Serra, Marta y**  
**Ramón Vidal, Daniel**

⑲ Agente: **Arizti Acha, Mónica**

⑳ Título: **Procedimiento microbiano de producción de isómeros específicos de ácidos linoleicos conjugados.**

㉑ Resumen:

Procedimiento microbiano de producción de isómeros específicos de ácidos linoleicos conjugados, en particular el isómero cis-9, trans-11, utilizando microorganismos. El procedimiento implica la incorporación opcional del isómero trans-11 del ácido vaccénico como sustrato a un medio de cultivo donde microorganismos tales como bacterias, levaduras u hongos producen la bioconversión al isómero de interés mediante la generación de un nuevo enlace de configuración Z (cis) en la posición 9 de la cadena. La utilización de dichos ácidos linoleicos conjugados puede aplicarse a la bioalimentación y sector de la biotecnología.

ES 2 277 546 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento microbiano de producción de isómeros específicos de ácidos linoleicos conjugados.

5 **Sector de la técnica**

Esta invención se refiere a un procedimiento de producción de ácidos linoleicos conjugados, particularmente el isómero cis-9, trans-11, utilizando microorganismos. La utilización de dichos ácidos puede aplicarse a la bioalimentación y sector de la biotecnología.

10 **Estado de la técnica**

Con el nombre de ácidos linoleicos conjugados (abreviadamente CLAs por las siglas en inglés de conjugated linoleic acids) se suele hacer referencia a toda una colección de isómeros posicionales y geométricos de ácidos grasos poliinsaturados (abreviadamente PUFAs por las siglas en inglés de polyunsaturated fatty acids) con longitud de cadena de 18 átomos de carbono cuyos dobles enlaces, a diferencia del resto de PUFAs, están conjugados en la molécula al ocupar posiciones consecutivas.

El nombre que tienen los ácidos grasos con 18 átomos de carbono y dos dobles enlaces carbono=carbono es ácido octadecadienoico. De estas moléculas existen numerosos isómeros, tanto de posición de los dobles enlaces, denominados "isómeros de posición", como de la estereoquímica ("isómeros geométricos", cis o trans, Z o E). Entre todos ellos hay dos de importancia relevante. Se trata de los denominados cis-9, trans-11- y trans-10, cis-12-.

Las diferencias químicas entre el ácido linoleico y estos dos isómeros implican cambios drásticos en sus propiedades biológicas. En el caso de los CLAs se les atribuyen actividades funcionales de relevancia que pueden ser de radical interés para la industria agroalimentaria implicada en la producción de aditivos e ingredientes funcionales. Por ejemplo, se ha demostrado que los CLAs son capaces de actuar como agentes preventivos y terapéuticos en muchos modelos tumorales en animales de experimentación (Margot M *et al.* (2003). *J. Mammary Gland Biol. Neoplas.* 8: 103-118). Específicamente se ha demostrado la inhibición por CLAs de la inducción de carcinogénesis mamaria (Ip C *et al.* (1991). *Cancer Res.* 51: 6118-6124; Ip *et al.* (1997). *Carcinogenesis* 18: 755-759; Thompson H *et al.* (1997). *Cancer Res.* 57: 5067-5072; Ip C *et al.* *Cancer Res.* 54: 1212-1215; y Ip C *et al.* *Nutr. Cancer* 24: 149-157) y cáncer de colon en modelos de rata (Ha YL *et al.* (1990). *Cancer Res.* 50: 1097-1101; Park HS *et al.* (2001). *Br. J. Nutr.* 86: 549-555; y Liew C *et al.* (1995). *Carcinogenesis* 16: 3037-3043). Además se ha observado un efecto de CLAs en la reducción de tamaño y metástasis en modelos animales de cáncer de próstata, cáncer de pulmón y cáncer de mama. Utilizando modelos de cultivo *in vitro* de células cancerosas humanas se ha observado la inhibición de la proliferación tumoral usando el isómero cis-9-trans-11. Este isómero añadido en dieta es capaz por sí sólo de reducir la aparición de carcinogénesis mamaria en ratas (Cori BA *et al.* (2003). *J. Nutr.* 133: 2893-2900). Además, durante los últimos meses se han empezado a desentrañar los mecanismos moleculares responsables de todos estos efectos anticancerígenos (Chujo H *et al.* (2003). *Cancer Lett.* 202: 81-87; Kim KH *et al.* (2003). *Nutrition* 19: 772-777; Miller *et al.* (2003). *Br. J. Nutr.* 90: 877-885; Kemp MQ *et al.* (2003). *J. Nutr.* 133: 3670-3677; Chen BQ *et al.* (2003). *World J Gastroenterol.* 9: 1909-1914; Park HS *et al.* (2004). *J. Nutr. Biochem.* 15: 229-235; Tanmahasamut P *et al.* (2004). *J. Nutr.* 134: 674-680; y Nichenametla S *et al.* (2004). *J. Toxicol. Environ. Health A* 67: 469-481).

A todo ello hay que sumar otras actividades biológicas bien conocidas de los CLAs. La más explotada desde el punto de vista comercial hace referencia al hecho de que su ingesta en dieta reduce las reservas de grasa en ratas (Park Y *et al.* (1997). *Lipids* 32: 853-858; Delany JP *et al.* (1999). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 276: R1172-R1179; Tsuboyama N *et al.* (2000). *Diabetes* 49: 1534-1542; y Ohnuki K *et al.* (2001). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2200-2204.), ratones (Stang GI. (2000). *J. Nutr.* 130: 1140-1146; Azain MJ *et al.* (2000). *J. Nutr.* 130: 1548-1554; Sugano M *et al.* (2001). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2535-2541; Poulos SP *et al.* (2001). *J. Nutr.* 131: 2722-2731; Sisk MB *et al.* (2001). *J. Nutr.* 131: 1668-1674; y Ealey KN *et al.* (2002). *Lipids* 37: 853-861), hamsters (de Deckere EA *et al.* (1999). *Br. J. Nutr.* 82: 309-317) y cerdos (Ostrowska E *et al.* (1999). *J. Nutr.* 129: 2037-2042; y Thiel-Cooper RL *et al.* (2001). *J. Anim. Sci.* 79: 1821-1828). Por ello se utiliza en la formulación de algunos preparados nutricionales con la idea de convertir grasa en músculo (dieta para deportistas) o perder peso sin perder músculo (dietas de adelgazamiento).

Otras propiedades de los CLAs hacen referencia a su capacidad para inhibir la aterogénesis en hamsters y conejos (de Deckere EA *et al.* (1999). *Br. J. Nutr.* 82: 309-317; Lee KN *et al.* (1994). *Atherosclerosis* 108: 19-25; Kritchevsky D *et al.* (2000). *J. Am. Coll. Nutr.* 19: 472S-477S; y Wilson TA *et al.* (2000). *Nutr. Res.* 20: 1795-1805, 32-34) y también, en ratas prediabéticas, a su capacidad para incrementar la sensibilidad a la insulina y mejorar la tolerancia a glucosa (Houseknecht KL *et al.* (1998). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244: 678-682; y Ryder JW *et al.* (2001). *Diabetes* 50: 1149-1157). Sin embargo, dicho efecto es atribuible al isómero t-10-c-12 que induce esteatosis hepática, lo que desaconseja el uso del mismo (Clément L *et al.* (2002). *J. Lipid Res.* 43: 1400-1409).

La fuente biológica natural de ácido linoleico son los aceites vegetales. Por el contrario, la fuente biológica natural de los CLAs son los productos lácteos y la carne de rumiantes. En realidad en este último caso es una bacteria del rumen quién produce los CLAs y los fija en el tejido del animal. Se comercializa un combinado de CLAs para la industria alimentaria (una mezcla isomolar de los dos isómeros con un 80% de pureza) y también se venden los isómeros puros aunque su precio es muy elevado, probablemente por la dificultad de purificación de ambos isómeros.

Es posible sintetizar químicamente cada uno de los dos isómeros pero el proceso es complicado, caro y poco efectivo, de forma que tan sólo se obtiene un 50% de rendimiento con contaminaciones de los dos isómeros. Existen descripciones en la literatura que demuestran la posibilidad de utilizar la bacteria del rumen *Butyvirbio fibrisolvens*, o la enzima linoleoato isomerasa purificada desde la misma, para llevar a cabo una conversión enzimática de un ácido graso precursor en CLAs. También existen ejemplos sobre el uso de especies del género *Lactobacillus* o el empleo de lipasas de *Candida cylindracea* o *Mucor miehei* en la obtención selectiva de CLAs (Warvel, S; Borgdorf, R; *Biotechnology Letters*, 2000, 22: 1151-55), pero de nuevo todos estos procesos son poco efectivos.

Se ha descrito una forma de producir específicamente el isómero cis-9-trans-11, basada en crecer la levadura *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente (EUROSCARF) en presencia de ácido vaccénico (Patente española ES2204328-B) para que dicho ácido graso monosaturado se convierta específicamente en el isómero cis-9-trans-11- gracias a la acción de una  $\Delta^9$ -desaturasa codificada en el genoma de este microorganismo. Es más, se ha descrito que en humanos la ingesta del isómero trans-11- del ácido vaccénico da lugar a su bioconversión en el isómero cis-9-trans-11- (Turpeinen *et al.* (2002). *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 504-510).

Por lo tanto, el problema técnico que se plantea es la producción específica del isómero cis-9, trans-11-, de forma eficaz, dada su probada utilidad biológica e inocuidad. En la presente invención se describen los ensayos de cinco cepas de bacterias, siete cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, siete cepas de levaduras distintas de las *Saccharomyces* y dos especies de hongos, para evaluar su capacidad de producción del isómero cis-9, trans-11 del ácido linoleico conjugado, tanto en presencia como en ausencia de ácido vaccénico. Los resultados son un nuevo procedimiento de obtención del ácido cis-9, trans-11 del ácido linoleico conjugado.

### Descripción de la invención

La presente invención describe varios procedimientos para la producción específica del isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado. El primero de ellos describe la incorporación del isómero trans-11 del ácido vaccénico como sustrato a medios de cultivo donde crece una bacteria, una levadura o un hongo filamentoso y la bioconversión microbiana de dicho sustrato en el isómero de interés medida por la generación de un nuevo enlace de configuración Z (cis) en la posición 9 de la cadena. El segundo trata sobre la producción endógena por parte de algunos microorganismos del isómero cis-9-trans-11 sin que existan precursores en el medio de cultivo. Además se describe la producción constitutiva del isómero trans-11 del ácido vaccénico por parte de algunas levaduras.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en varios hechos relativos al metabolismo microbiano de los ácidos grasos. Así, la adición como sustrato del isómero trans-11 del ácido vaccénico a distintos microorganismos permite la producción de un ácido graso poliinsaturado (el isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado) con una insaturación adicional de configuración Z (cis) en la posición 9 de la cadena de dicho sustrato originada por la actuación de la enzima  $\Delta^9$ -desaturasa presente en todos los microorganismos ensayados. Aun más, determinados microorganismos son capaces de producir dicho isómero sin necesidad de sustrato precursor alguno al contener ácidos grasos (ácido vaccénico, ácido oléico u otros) en su citoplasma y/o membranas celulares que pueden actuar como sustratos de las actividades enzimáticas anteriormente mencionadas. En este sentido, se ha comprobado la producción constitutiva del isómero trans-11 del ácido vaccénico por parte de algunos microorganismos.

### Exposición detallada de la realización

Sin que presuponga una limitación al ámbito de la aplicación de la presente invención tal y como se define en las presentes reivindicaciones, se describen a continuación ejemplos concretos de como llevar a cabo la invención.

#### Ejemplo 1

*Procedimiento de producción del isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado con distintos microorganismos por incorporación del isómero trans-11 del ácido vaccénico como sustrato*

#### a) Cultivos de los distintos microorganismos con el isómero trans-11 del ácido vaccénico

En la presente invención se han utilizado los microorganismos que se detallan en la tabla 1.

El precrecimiento para la generación de colonias aisladas de bacterias de las especies *Lactobacillus pentosus* y *Leuconostoc citreum* se realizó en placas de medio sólido MRS-Agar inoculando una estría e incubando a 30°C durante 48 horas. Las colonias de las especies *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* se precrecieron en placas de medio sólido MC-Agar incubando a 30°C y 37°C respectivamente, durante 24 horas. Las colonias de la especie *Zymomonas mobilis* se crecieron en medio sólido YPD-Agar incubando a 30°C durante 48 horas. El precrecimiento de las levaduras del género *Saccharomyces*, así como de los géneros no-*Saccharomyces*, se realizó en placas de medio YPD-agar inoculando una estría de la suspensión microbiana e incubando a 30°C durante 48 horas. De forma similar, el precrecimiento de las colonias de hongos de las especies *Aspergillus niger* y *Penicillium roqueforti* se realizó en placas de medio sólido PDA incubando a 30°C y 19°C respectivamente, durante 6 días.

## ES 2 277 546 B1

Para preparar el medio de inducción, 5  $\mu$ l de una solución etanólica 0,5 M del isómero trans-11 del ácido vaccénico se añadieron a 5 ml de medio líquido, usándose los mismos medios utilizados para la obtención de colonias o micelio pero sin agar y con la adición de tergitol al 1% v/v. De esta forma, el isómero trans-11 del ácido vaccénico se encontraba a una concentración final de 0,5 mM. La mezcla se inoculó con una colonia aislada del microorganismo en cuestión y se incubó durante 48 horas a la temperatura correspondiente en cada caso y con una agitación de 200 rpm, a excepción de la cepa de *Leuconostoc citreum* que se incubó sin agitación.

### b) Procedimiento de extracción del isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado

El cultivo se trasvasó a un tubo de 10 ml y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1.5 ml de agua destilada y la suspensión se transfirió a un vial tipo eppendorf de 2 ml. Se centrifugó el cultivo en las mismas condiciones, repitiéndose otra vez la operación de lavado con el mismo volumen de agua destilada. Finalmente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos para eliminar totalmente el agua. A las células obtenidas se les añadió 1 ml de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (2:1) y la mezcla se dejó en incubación durante 1 hora. Finalmente, se centrifugó a 13200 rpm durante 15 segundos y se pasó el extracto orgánico a un nuevo vial de 2 ml donde se evaporó el disolvente.

El residuo de ácidos grasos se metiló por adición de 500  $\mu$ l de una disolución 0.5 N de KOH en MeOH, seguido de neutralización después de 30 minutos con 500  $\mu$ l de HCl 1 N y extracción con 500  $\mu$ l de hexano. La capa orgánica se separó y se concentró hasta un volumen aproximado de 20  $\mu$ l.

A continuación se analizó el isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado. El éster metílico se analizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) en una columna apolar HP-VOC (0.2 mm\*30 m\*1.12  $\mu$ m) con el siguiente programa de temperaturas: 80°C (0 min.); 2.5°C/min hasta 220°C (0 min.); 2.0°C/min. hasta 260°C (15 min.).

### Resultados

Como se indica en la tabla 2, en todos los microorganismos se produjo en mayor o menor medida el isómero cis-9-trans-11- del ácido linoleico conjugado. En el caso de las bacterias *B. subtilis* y *L. pentosus* se detectaron producciones similares a las obtenidas en algunas levaduras del género *Saccharomyces*, mientras que en el resto de especies bacterianas la producción fue mucho menor. En el caso de los hongos filamentosos, la producción del isómero cis-9-trans-11- fue baja. Por el contrario, en todas las especies levaduriformes no-*Saccharomyces* analizadas, excepto en el caso de *T. delbrueckii*, se detectaron elevados niveles de producción, particularmente en el caso de las especies *P. anomala*, *P. jadinii* y *H. guillermondii*.

### Ejemplo 2

Procedimiento de producción del isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado con distintos microorganismos al crecer en medios de cultivo sin suplementación de ácidos grasos

#### a) Cultivos de los distintos microorganismos sin el isómero trans-11 del ácido vaccénico

Como en el ejemplo anterior, se utilizaron los microorganismos que se detallan en la tabla 1.

El precrecimiento para la generación de colonias aisladas de bacterias de las especies *Lactobacillus pentosus* y *Leuconostoc citreum* se realizó en placas de medio sólido MRS-Agar inoculando una estría e incubando a 30°C durante 48 horas. Las colonias de las especies *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* se precrecieron en placas de medio sólido MC-Agar incubando a 30°C y 37°C respectivamente, durante 24 horas. Las colonias de la especie *Zymomonas mobilis* se crecieron en medio sólido YPD-Agar incubando a 30°C durante 48 horas. El precrecimiento de las levaduras del género *Saccharomyces*, así como de los géneros no-*Saccharomyces*, se realizó en placas de medio YPD-agar inoculando una estría de la suspensión microbiana e incubando a 30°C durante 48 horas. De forma similar, el precrecimiento de las colonias de hongos de las especies *Aspergillus niger* y *Penicillium roqueforti* se realizó en placas de medio sólido PDA incubando a 30°C y 19°C respectivamente, durante 6 días.

Una colonia aislada del microorganismo en cuestión se inoculó en 5 ml de medio líquido con tergitol al 1% (v/v) y la mezcla se incubó durante 48 horas a la temperatura correspondiente para cada microorganismo y con una agitación de 200 rpm, a excepción de la cepa de *Leuconostoc citreum* que se incubó sin agitación.

#### b) Procedimiento de extracción del posible isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado producido

El cultivo se trasvasó a un tubo de 10 ml y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1.5 ml de agua destilada y la suspensión se transfirió a un vial tipo eppendorf de 2 ml. Se centrifugó el cultivo en las mismas condiciones, repitiéndose otra vez la operación de lavado con el mismo volumen de agua destilada. Finalmente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos para eliminar totalmente el agua. A las células obtenidas se les añadió 1 ml de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (2:1) y la mezcla se dejó en incubación durante 1 hora. Finalmente, se centrifugó a 13200 rpm durante 15 segundos y se pasó el extracto orgánico a un nuevo vial de 2 ml donde se evaporó el disolvente.

## ES 2 277 546 B1

El residuo de ácidos grasos se metiló por adición de 500  $\mu$ l de una disolución 0.5 N de KOH en MeOH, seguido de neutralización después de 30 minutos con 500  $\mu$ l de HCl 1 N y extracción con 500  $\mu$ l de hexano. La capa orgánica se separó y se concentró hasta un volumen aproximado de 20  $\mu$ l.

5 A continuación se analizó el isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado. El éster metílico se analizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) en una columna apolar HP-VOC (0.2 mm\*30 m\*1.12  $\mu$ m) con el siguiente programa de temperaturas: 80°C (0 min.); 2.5°C/min hasta 220°C (0 min.); 2.0°C/min. hasta 260°C (15 min.).

### 10 Resultados

Dadas las elevadas producciones del isómero cis-9-trans-11 detectadas en algunos de los microorganismos ensayados en el ejemplo anterior, sobretodo *P. anomala* y *P. jadinii* que producen más isómero (0,9748 mM y 0,6077 mM, respectivamente) que la cantidad de sustrato precursor trans-11 del ácido vaccénico adicionado (0.5 mM), se decidió  
15 ensayar la posible síntesis endógena *de novo* por parte de los microorganismos analizados. Para ello se crecieron en las mismas condiciones que en el ejemplo anterior pero sin el isómero trans-11 del ácido vaccénico en la formulación del medio.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 3 e indican que tan sólo *H. guillermondii* y las especies del género  
20 *Pichia* analizadas en el experimento producen el isómero cis-9-trans-11 a niveles de relevancia, especialmente en el caso de *P. anomala* y *P. jadinii*. El resto de cepas ensayadas tiene unas producciones residuales del isómero en cuestión.

### Ejemplo 3

25 *Procedimiento de producción del isómero trans-11 del ácido vaccénico al crecer especies levaduriformes en medios de cultivo*

#### a) Cultivos de los distintos microorganismos

30 Se utilizaron las cepas *S. cerevisiae* CECT 1176 y *Pichia anomala* CECT 10590 (tabla 1).

El precrecimiento de las levaduras se realizó en placas de medio YPD-agar inoculando una estría de la suspensión microbiana e incubando a 30°C durante 48 horas. Una colonia aislada del microorganismo en cuestión se inoculó en 5 ml de medio líquido YPD con tergitol al 1% (v/v). La mezcla se incubó durante 48 horas a la temperatura  
35 correspondiente para cada microorganismo con una agitación de 200 rpm.

#### b) Procedimiento de extracción del posible isómero trans-11 del ácido vaccénico

El cultivo se trasladó a un tubo de 10 ml y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante  
40 y las células se resuspendieron en 1.5 ml de agua destilada y la suspensión se transfirió a un vial tipo eppendorf de 2 ml. Se centrifugó el cultivo en las mismas condiciones, repitiéndose otra vez la operación de lavado con el mismo volumen de agua destilada. Finalmente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos para eliminar totalmente el agua. A las células obtenidas se les añadió 1 ml de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (2:1) y la mezcla se dejó en incubación durante 1 hora. Finalmente, se centrifugó a 13200 rpm durante 15 segundos y se pasó el extracto orgánico a un nuevo vial de 2 ml  
45 donde se evaporó el disolvente.

El residuo de ácidos grasos se metiló por adición de 500  $\mu$ l de una disolución 0.5 N de KOH en MeOH, seguido de neutralización después de 30 minutos con 500  $\mu$ l de HCl 1 N y extracción con 500  $\mu$ l de hexano. La capa orgánica se separó y se concentró hasta un volumen aproximado de 20  $\mu$ l.

50 A continuación se analizó el isómero trans-11 del ácido vaccénico. El éster metílico se analizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) en una columna apolar HP-VOC (0.2 mm\*30 m\*1.12  $\mu$ m) con el siguiente programa de temperaturas: 80°C (0 min.); 2.5°C/min hasta 220°C (0 min.); 2.0°C/min. hasta 260°C (15 min.).

### 55 Resultados

La tabla 4 muestra los resultados obtenidos. Como se puede observar, la levadura *S. cerevisiae* CECT 1176 produce una cantidad residual del isómero isómero trans-11 del ácido vaccénico. Por el contrario, la levadura *P. anomala* CECT 10590 produce aproximadamente 0,5 mM de dicho compuesto, definiendo unas condiciones de cultivo para la  
60 producción de este compuesto con posible actividad como ingrediente funcional. En cualquier caso, estos resultados sugieren que la producción del isómero 9-cis, 11-trans- de ácidos linoleicos conjugados por los microorganismos de la Tabla 1 se debe a que dichos microorganismos son en mayor o menor medida productores del ácido 11-trans-vaccénico.

65

## ES 2 277 546 B1

TABLA 1

*Microorganismos ensayados en la conversión del isómero trans-11 del ácido vaccénico en el isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado*

ESPECIE	REFERENCIA CECT	USO
<b>Bacterias</b>		
<i>Bacillus subtilis</i>	CECT 371	Detección de antibióticos
<i>Escherichia coli</i>	CECT 405	Cepa de laboratorio
<i>Lactobacillus pentosus</i>	CECT 4023	Fermentación de encurtidos
<i>Leuconostoc citreum</i>	CECT 4018	Producción de dextrano
<i>Zymomonas mobilis</i>	CECT 947	Aislado de cerveza
<b>Levaduras Saccharomyces</b>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1176	Cepa de laboratorio
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1326	Levadura para producción de pan
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1479	Levadura para producción de vino
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1894	Levadura para producción de vino
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1929	Levadura para producción de sidra
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 10094	Levadura de flor
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 12660	Levadura para producción de cava
<b>Levaduras no-Saccharomyces</b>		
<i>Candida stellata</i>	CECT 11046	Aislada de mosto de uva
<i>Hanseniaspora guillemondii</i>	CECT 11102	Aislada de mosto de uva
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CECT 11106	Aislada de mosto de uva
<i>Pichia anomala</i>	CECT 10590	Aislada de mosto de uva
<i>Pichia jadinii</i>	CECT 1060	Suplemento nutricional
<i>Pichia membranaefaciens</i>	CECT 1115	Aislada de exudado de olmo
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	CECT 10558	Aislada de mosto de uva
<b>Hongos</b>		
<i>Aspergillus niger</i>	CECT 2088	Producción de enzimas
<i>Penicillium roqueforti</i>	CECT 2905	Producción de quesos

## ES 2 277 546 B1

TABLA 2

Valores de producción del isómero *cis-9-trans-11* del ácido linoleico conjugado obtenidos por parte de distintos microorganismos al crecer en presencia de 0.5 mM del isómero *trans-11* del ácido vaccénico. Los resultados en mM representan la media de tres experimentos independientes

5

ESPECIE	REFERENCIA CECT	<i>cis-9-trans-11</i> (mM)
<b>Bacterias</b>		
<i>Bacillus subtilis</i>	CECT 371	0,1129
<i>Escherichia coli</i>	CECT 405	0,0413
<i>Lactobacillus pentosus</i>	CECT 4023	0,1001
<i>Leuconostoc citreum</i>	CECT 4018	0,0272
<i>Zymomonas mobilis</i>	CECT 947	0,0304
<b>Levaduras Saccharomyces</b>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1176	0,1799
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1326	0,1493
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1479	0,0401
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1894	0,1962
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1929	0,1582
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 10094	0,0257
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 12660	0,0506
<b>Levaduras no-Saccharomyces</b>		
<i>Candida stellata</i>	CECT 11046	0,1442
<i>Hanseniaspora guillemondii</i>	CECT 11102	0,4280
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CECT 11106	0,2116
<i>Pichia anomala</i>	CECT 10590	0,9748
<i>Pichia jadinii</i>	CECT 1060	0,6077
<i>Pichia membranaefaciens</i>	CECT 1115	0,1154
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	CECT 10558	0,0525
<b>Hongos</b>		
<i>Aspergillus niger</i>	CECT 2088	0,0688
<i>Penicillium roqueforti</i>	CECT 2905	0,0110

55

60

65

## ES 2 277 546 B1

TABLA 3

Valores de producción del isómero *cis-9-trans-11* del ácido linoleico conjugado obtenidos por parte de distintos microorganismos al crecer sin adición del isómero *trans-11* del ácido vaccénico. Los resultados en mM representan la media de tres experimentos independientes

5

ESPECIE	REFERENCIA CECT	<i>cis-9-trans-11</i> (mM)
<b>Bacterias</b>		
<i>Bacillus subtilis</i>	CECT 371	0,0047
<i>Escherichia coli</i>	CECT 405	0,0057
<i>Lactobacillus pentosus</i>	CECT 4023	0,0139
<i>Leuconostoc citreum</i>	CECT 4018	0,0197
<i>Zymomonas mobilis</i>	CECT 947	0,0090
<b>Levaduras Saccharomyces</b>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1176	0,0131
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1326	0,0209
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1479	0,0156
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1894	0,0052
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1929	0,0056
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 10094	0,0036
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 12660	0,0048
<b>Levaduras no-Saccharomyces</b>		
<i>Candida stellata</i>	CECT 11046	0,0130
<i>Hanseniaspora guillermondii</i>	CECT 11102	0,0070
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CECT 11106	0,0216
<i>Pichia anomala</i>	CECT 10590	0,2030
<i>Pichia jadinii</i>	CECT 1060	0,1875
<i>Pichia membranaefaciens</i>	CECT 1115	0,0613
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	CECT 10558	0,0058
<b>Hongos</b>		
<i>Aspergillus niger</i>	CECT 2088	0,0062
<i>Penicillium roqueforti</i>	CECT 2905	0,0074

55

60

65

TABLA 4

Valores de producción del isómero trans-11 del ácido vaccénico obtenidos por parte de *S. cerevisiae* CECT 1176 y *P. anomala* CECT 10590. Los resultados en mM representan la media de tres experimentos independientes

LEVADURA	Isómero trans-11 del ácido vaccénico (mM)
<i>S. cerevisiae</i> CECT 1776	0,004
<i>P. anomala</i> CECT 10590	0,517

Utilización del isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado en la fabricación de biomasa de levadura panadera y de microflora de yogur

En experimentos preliminares se ha llevado a cabo un procedimiento de producción de biomasa de levadura panadera cargada con el isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado. Para ello se ha crecido la levadura *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1326 en un fermentador de 300 litros conteniendo 200 litros de medio rico con melazas como fuente de carbono y el isómero trans-11 del ácido vaccénico a una concentración 0.5 mM. Las condiciones de fermentación fueron una temperatura de 30°C con agitación durante 24 horas. Pasado este tiempo se recogió por centrifugación la biomasa levaduriforme enriquecida en el isómero cis-9-trans-11 que se lavó dos veces por resuspensión en tampón fosfato sódico 50 mM pH 6.8 y posterior centrifugación. La pasta de biomasa resultante se caracterizó en cuanto a su contenido en el isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado, determinándose una concentración de 0,16 mM. Con dichas levaduras se fabricó pan en un horno piloto siguiendo un protocolo industrial establecido. Sobre los panes producidos se evaluó la concentración del isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico que fue de 0,35  $\mu\text{g}/\text{gramo}$  de pan.

Siguiendo una metodología similar se ha llevado a cabo un procedimiento de producción de yogur enriquecido en ácidos linoleicos conjugados, caracterizado porque consiste en añadir al medio de crecimiento de las bacterias ácido lácticas correspondientes el isómero trans-11 del ácido vaccénico. También se han llevado a cabo producciones industriales de embutidos curados utilizando iniciadores de fermentación (bacterias ácido lácticas) cargadas con el isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado mediante precrecimiento en medios con el isómero trans-11 del ácido vaccénico.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de ácidos linoleicos conjugados **caracterizado** por las siguientes etapas:

- 5
- a) incubación de un microorganismo productor de ácidos linoleicos conjugados, a elegir del grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos, preferiblemente levaduras no *Saccharomyces*, en medio líquido; y
  - b) extracción de los ácidos linoleicos conjugados resultantes de la incubación de la etapa a); purificación y
- 10
- caracterización de dichos ácidos.

2. Procedimiento de producción de ácidos linoleicos conjugados de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque los microorganismos utilizados son las levaduras *Hanseniospora guillermondii*, *Pichia anomala* y *Pichia jadinii*.

3. Procedimiento de producción de ácidos linoleicos conjugados **caracterizado** por las siguientes etapas:

- 15
- a) incubación de un microorganismo productor de ácidos linoleicos conjugados, a elegir del grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos, preferiblemente levaduras no *Saccharomyces*, en medio líquido, en presencia de ácido vaccénico; y
  - b) extracción de los ácidos linoleicos conjugados resultantes de la incubación de la etapa a); purificación y
- 20
- caracterización de dichos ácidos.

4. Procedimiento de producción de ácidos linoleicos conjugados de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado** porque los microorganismos utilizados son las levaduras *Hanseniaspora guillermondii*, *Pichia anomala*, y *Pichia jadinii*.

5. Procedimiento de producción de ácidos linoleicos conjugados de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque el ácido linoleico conjugado que se obtiene es el ácido cis-9-trans-11-octadecadienoico.

6. Procedimiento de producción de biomasa de levadura panadera y pan enriquecido en ácidos linoleicos conjugados, **caracterizado** porque consiste en añadir a la masa panaria levadura panadera cargada con el isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado a una concentración del 1% al 3% en peso a continuación de la etapa a) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

7. Procedimiento de producción de yogur enriquecido en ácidos linoleicos conjugados, **caracterizado** porque consiste en añadir al medio de fermentación para la obtención del yogur una mezcla de bacterias lácticas cargadas con el isómero cis-9-trans-11 del ácido linoleico conjugado a una concentración del 0,2% al 2% en peso a continuación de la etapa a) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 277 546

② N° de solicitud: 200502849

③ Fecha de presentación de la solicitud: 21.11.2005

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2204328 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 16.04.2004, todo el documento.	1,3,5
X	WO 03080850 A1 (VALIO LTD.) 02.10.2003, todo el documento.	1,5,6,7
X	WO 0136653 A1 (VALIO LTD.) 25.05.2001, todo el documento.	1,5,6,7
X	WO 9929886 A1 (BJÖRCK, L. et al.) 17.06.1999, todo el documento.	1,5
X	EP 1500706 A1 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA MINATO-KU) 26.01.2005, todo el documento.	1,5
A	WO 9737546 A1 (LODERS CROKLAAN B.V.) 16.10.1997, todo el documento.	6

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

31.05.2007

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12P 7/64** (2006.01)  
**A23C 9/123** (2006.01)  
**A21D 13/00** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)  
C12R 1/645 (2006.01)