

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 324 077**

21 Número de solicitud: 200700272

51 Int. Cl.:

A23L 1/275 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **01.02.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **29.07.2009**

Fecha de la concesión: **14.05.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **31.05.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
31.05.2010

73 Titular/es: **Universidad de Alicante**
Ctra. San Vicente, s/n
Edif. Germán Bernácer
03690 San Vicente del Raspeig, Alicante, ES

72 Inventor/es: **Martínez Espinosa, Rosa María;**
Bonete Pérez, María José y
Martínez Martínez, Paula

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Compuesto a base de membranas celulares liofilizadas.**

57 Resumen:

Compuesto a base de membranas celulares liofilizadas.
En la presente invención se describe un compuesto que comprende al menos una membrana celular liofilizada extraída de microorganismos halófilos, con al menos un 0.1% en peso seco de pigmentos carotenoides en membrana, su proceso de obtención y sus aplicaciones.

ES 2 324 077 B1

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

DESCRIPCIÓN

Compuesto a base de membranas celulares liofilizadas.

5 La presente invención se refiere a un compuesto pigmentante obtenido a partir de membranas celulares liofilizadas. Estas membranas se extraen de bacterias o arqueas halófilas que presentan al menos un 0.1% (en peso seco) de pigmentos carotenoides en membrana.

Estado de la técnica anterior

10 Los carotenoides son pigmentos orgánicos que están presentes de forma natural en organismos fotosintéticos (plantas y algas) así como en algunas clases de hongos, levaduras y bacterias. Se estima que existen más de 700 compuestos pertenecientes a este grupo y su color varía desde el amarillo pálido hasta el rojo oscuro pasando por el anaranjado, dependiendo de su estructura y del número de enlaces dobles conjugados que presentan.

15 Los animales son incapaces de sintetizar carotenoides y deben obtenerlos a través de su dieta, siendo estos compuestos importantes por su función biológica. Entre las aplicaciones más importantes de los carotenoides podemos mencionar su uso como pigmentos naturales así como complementos alimenticios.

20 Los pigmentos carotenoides que actualmente se utilizan en la industria, en especial en la industria alimentaria y cosmética, se obtienen mayoritariamente de fuentes vegetales mediante el empleo de disolventes orgánicos. Entre las técnicas de extracción y purificación de estos compuestos cabe destacar las cromatografías en las que se utilizan distintos tipos de disolventes orgánicos. Son múltiples las referencias en la literatura a estas técnicas de extracción, y se han realizado numerosos ensayos con el fin de describir la naturaleza y estructura de los compuestos carotenoides. (Hirschberg J (2001) Current Opinion in Plant Biology, 4, 210-218; (Darko *et al.* (2000) J. Chromatography, 876, 111-116; Cunningham and Grantt (1998) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 557-583.; Young *et al.* (1997) Methods for Carotenoid Analysis. En Pessaraki M (Ed) Handbook of Photosynthesis. Macel Dekker, New York, pp 579-622.; Lacker *et al.* (1999) J. Chromatography, 854, 37-44.).

30 En busca de fuentes alternativas de carotenoides se han llevado a cabo estudios similares con fitoplancton (Van Heukelem *et al.*, 2001, J. Chromatography, 910, 31-49), ciertas cepas de las algas *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina* y *Dunaliella bardawil*, (Salguero *et al.*, 2003, Biomolecular Engineering, 20, 249-253, León *et al.*, 2003, Biomolecular Engineering, 20, 177-182), hongos filamentosos (Garbayo *et al.*, 2003, Enzyme and Microbial Technology, 33, 629-634) o la levadura *Phaffia rhodozyma*.

35 Entre los estudios realizados cabe destacar el interés de *Phaffia* y *Dunaliella* como productores de carotenoides a gran escala para su aplicación en industrias cosméticas, farmacéuticas o agroalimentarias que se pone de manifiesto en diversas publicaciones. En concreto, es ampliamente conocido el uso de *Phaffia rhodozyma* como fuente de astaxantina, un pigmento carotenoides de interés por su uso en la industria piscícola y para su administración a aves de corral.

40 Así mismo se han realizado estudios con este tipo de microorganismos utilizando técnicas de manipulación genética a fin de obtener cepas superproductoras de carotenoides.

45 La obtención de carotenoides en los organismos citados anteriormente se realiza mediante el uso de disolventes orgánicos, como la acetona o el hexano, para aislar los pigmentos. Es necesario por tanto, en caso de querer utilizar estos pigmentos en la industria alimentaria o administrarlos a animales, realizar un procesamiento posterior a la extracción de los pigmentos que permita eliminar dichos disolventes orgánicos.

50 Como consecuencia directa, el proceso de obtención de los pigmentos se complica sustancialmente. Aún después del proceso de purificación, existe el riesgo de que persistan concentraciones traza de estos disolventes que puedan generar reacciones tóxicas en los seres vivos.

55 Por otro lado, diversos aspectos del cultivo y de la tisis de los tipos celulares actualmente utilizados como fuente de pigmentos, son extremadamente tediosos y dificultan el proceso industrial de obtención de los pigmentos y la preparación para su administración.

Explicación de la invención

60 En la presente invención se describe un compuesto que comprende al menos una membrana celular liofilizada extraída de microorganismos halófilos, con al menos un 0.1% en peso seco de pigmentos carotenoides en membrana, su proceso de obtención y sus aplicaciones.

El compuesto de la presente invención presenta varias ventajas en su uso como pigmento, entre las que cabe destacar, pero sin limitarse a:

- 65 • El proceso de tisis celular se simplifica; las células a partir de las cuales se aíslan las membranas celulares son susceptibles de ser lisadas por choque osmótico, ya que al tratarse de microorganismos halófilos, presentan altas concentraciones intracelulares de sales.

ES 2 324 077 B1

- Al no utilizarse ningún tipo de disolvente para la extracción de los pigmentos, no es necesario un procesado posterior para su eliminación.
- Tiene un carácter pigmentante y nutritivo ya que además de contener pigmentos carotenoides, presenta los componentes habituales de las membranas celulares bacterianas (proteínas, hidratos de carbono y lípidos).
- El compuesto puede ser utilizado directamente en su forma liofilizada lo que facilita su manejo y administración si se desea utilizarlo para modificar la coloración de organismos vivos. Al encontrarse liofilizado, puede administrarse en forma de polvos, junto con el pienso, rehidratado, etc.

Un primer aspecto de la presente invención es por tanto un compuesto que comprende al menos una membrana celular liofilizada con al menos un 0,1% en peso seco de pigmentos carotenoides, obtenidas a partir de microorganismos halófilos, donde los microorganismos halófilos pueden ser tanto arqueas halófilas como bacterias halófilas.

Dentro de los microorganismos halófilos se hace referencia a dos grupos diferenciados desde el punto de vista filogenético, las arqueas halófilas y las bacterias halófilas. Se toman ambos grupos bajo una sola denominación por su común carácter halófilo, es decir, por su capacidad para vivir en ambientes con altas concentraciones de sales gracias a adaptaciones fisiológicas que les permiten retener el agua y evitar la desecación. Dentro de estas adaptaciones fisiológicas cabe destacar la capacidad de almacenar en el interior celular sales para contrarrestar procesos osmóticos desfavorables.

En la presente invención se utilizan membranas celulares liofilizadas con al menos un 0,1% en peso seco de pigmentos carotenoides ya que esta es la concentración mínima de pigmentos a partir de la cual se obtienen los efectos técnicos esperados, generando resultados óptimos de pigmentación, sin que sea necesario utilizar dosis muy elevadas del compuesto. En el caso de su administración a animales con el fin de modificar su coloración, a mayor concentración de pigmentos carotenoides en las membranas celulares liofilizadas, menor será menor la cantidad de compuesto que deba ser utilizado para conseguir el efecto técnico deseado; porcentajes de concentración de pigmentos carotenoides muy por encima del mínimo establecido del 0,1% (peso seco) no tendrán en ningún caso efectos negativos en el individuo.

En una realización preferida de la invención, las arqueas halófilas que se utilizan pertenecen a cualquiera de las especies *Haloferax mediterranei*, *Haloferax volcani* o *Halobacterium salinarum*.

Otro aspecto de la invención es el método para la elaboración del compuesto de la presente invención que comprende al menos los siguientes pasos:

- Selección de las células con al menos un 0,1% en peso seco de pigmentos carotenoides en la membrana celular
- Lisis de las células seleccionadas en el paso a)
- Separación de las membranas celulares obtenidas en b)
- Liofilización de las membranas del paso anterior.

Otro aspecto de la invención es el uso del compuesto de la presente invención como suplemento alimenticio pigmentante, preferiblemente para modificar la coloración de animales entre los que cabe destacar peces, crustáceos, aves... Más preferiblemente se utiliza el compuesto de la presente invención para modificar la coloración de aves y aún más preferiblemente para modificar la coloración de canarios con factor rojo.

Los ejemplos aquí expuestos relativos a los usos del compuesto de la presente invención no son limitantes. Este compuesto puede ser utilizado como pigmentante en otro tipo de industrias, como la alimentaria, cosmética... Así mismo dicho compuesto puede ser utilizado para la obtención de pigmentos puros, siguiendo protocolos ampliamente descritos en el estado de la técnica para su purificación.

En la presente invención, se entiende como suplemento alimenticio pigmentante, un compuesto o composición que, además de poseer carácter pigmentante (lo cual faculta su uso como pigmento), al ser administrado vía oral a un animal, tiene un carácter nutritivo.

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.

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores.

5 Ejemplo 1

Obtención del compuesto pigmentante

10 El proceso por el cual se obtuvieron las membranas aisladas liofilizadas de la invención que constituyen el suplemento alimenticio pigmentante, queda resumido en el siguiente esquema:

1. Cultivo de arqueas halófilas
- 15 2. Cosechado de las células
3. Lisis celular
4. Centrifugación
- 20 5. Recuperación de membranas
6. Liofilizado de membranas
- 25 7. Envasado del liofilizado.

Las células de las arqueas halófilas *Halobacterium salinarum*, *Haloferax volcanii* y *Haloferax mediterranei* se
30 crecieron en medios de cultivo máximos que permiten un óptimo crecimiento en el menor tiempo posible. La composición del medio de cultivo así como los parámetros de la incubación (temperatura, agitación, pH...) están ampliamente descritos en la bibliografía y forman parte del conocimiento general que se le atribuye a un experto medio en la materia.

Tras el crecimiento de los cultivos de *Haloferax mediterranei*, *Haloferax volcanii* y *Halobacterium salinarum*, se
35 procedió al cosechado de las células por centrifugación a 14.000 rpm durante 30 minutos. Este proceso podría haberse desarrollado igualmente mediante filtración del medio de cultivo.

Una vez cosechadas se resuspendieron en agua destilada provocando la tisis de las células por ósmosis (ya que
40 estos tipos celulares acumulan elevadas concentraciones de sal en su interior).

Tras la lisis celular, se centrifugó la mezcla resultante a 30.000 rpm durante 1 hora. Así se obtuvo un precipitado
que contenía el conjunto de las membranas de todas las células lisadas.

Las membranas se recuperaron del fondo del tubo de centrífuga y se procedió a su liofilizado para conseguir un
45 compuesto en polvo, libre de agua y rico en lípidos, proteínas y carotenos.

Este liofilizado, se pasó por un mortero para obtener un polvo mucho más fino.

50 Ejemplo 2

Aplicación del compuesto pigmentante

Un ejemplo de aplicación de las membranas liofilizadas obtenidas a partir de *Haloferax mediterranei*, *Haloferax
55 volcanii* y *Halobacterium salinarum* se obtuvo al añadir a la pasta de cría de crías de canario con factor rojo, medio gramo de membranas liofilizadas por cada tres gramos de pasta de cría, desde su nacimiento hasta la aparición completa de su plumaje.

Durante la época de la muda se mantuvo la adición de las membranas liofilizadas en el pienso que tomaban los
60 canarios con factor rojo en la misma proporción mencionada anteriormente.

Estas aplicaciones se realizaron por primera vez en la pasta de cría destinada a alimentar a 4 crías obtenidas de dos
parejas de canarios distintas en enero de 2001, en el criadero de José María Martínez (Villena, Alicante).

65 Como término medio se aplicó una dosis de entre 0.2-0.3 gramos de pigmento (alrededor de 250 gramos de compuesto) por kilo de pasta suministrada a los canarios.

ES 2 324 077 B1

Dicho ensayo se repitió durante dos años de cría posteriores (2002-2003) con diferentes parejas de canarios con factor rojo que habían tenido entre dos y cuatro crías, obteniendo resultados positivos.

5 Estos resultados se traducen en la aparición de color naranja intenso en el plumaje de los canarios con factor rojo que de no ser alimentados con carotenoides, manifestarían un plumaje beig.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 324 077 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Compuesto que comprende al menos una membrana celular liofilizada, obtenida a partir de microorganismos halófilos, con al menos un 0,1% en peso seco de pigmentos carotenoides.
2. Compuesto según la reivindicación anterior donde los microorganismos halófilos son arqueas halófilas.
- 10 3. Compuesto según la reivindicación 2 donde las arqueas halófilas se seleccionan de una lista que comprende *Haloferax mediterranei*, *Haloferax volcani* y *Halobacterium salinarum*.
4. Compuesto según la reivindicación 1 donde los microorganismos halófilos son bacterias halófilas.
- 15 5. Método para la elaboración de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende al menos los siguientes pasos:
- a. Selección de las células con al menos un 0,1% en peso seco de pigmentos carotenoides en la membrana celular
 - 20 b. Lisis de las células seleccionadas en el paso a)
 - c. Separación de las membranas celulares obtenidas en b)
 - d. Liofilización de las membranas del paso anterior.
- 25 6. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como suplemento alimenticio pigmentante.
7. Uso del compuesto según la reivindicación 6 para modificar la coloración de animales.
- 30 8. Uso del compuesto según la reivindicación anterior donde los animales sean aves.
9. Uso del compuesto según la reivindicación anterior donde las aves sean canarios con factor rojo.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 324 077

② Nº de solicitud: 200700272

③ Fecha de presentación de la solicitud: **01.02.2007**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	JP 7132096 A (MICRO ARUJIE CORP KK) 23.05.1995, (resumen) [en línea] [Recuperado el 10.07.2009] Recuperado de: EPO EPODOC Database.	1-7
Y	CA 2609160 A1 (PHARES PHARM RES NV) 30.11.2006, página 1, líneas 1-15; página 7, línea 26 - página 9, línea 5.	1-7
A	RONNEKLEIV, M. et al. Bacterial carotenoids 53, C-50-carotenoids 23; Carotenoids of Haloferax volcanii versus other halophilic bacteria. Biochemical Systematics and Ecology. 1995. Vol. 23, nº6, páginas 627-634. ISSN 0305-1978.	1-9
A	LAZRAK, T. et al. Bacterioruberins reinforce reconstituted Halobacterium lipid membranes. Biochimica et Biophysica Acta. 1988. Vol. 939, nº 1, páginas 160-162. ISSN 0006-3002.	1-9
A	RONNEKLEIV, M. et al. Three dodecaene C-50-carotenoids from halophilic bacteria. Phytochemistry. 1995. Vol. 39, nº 3, páginas 631-634. ISSN 0031-9422.	1-9
A	US 2005003474 A1 (DESOUZA et al.) 06.01.2005, párrafos 0005,0016,0055,0065-0067,0081-0085.	1-9

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

14.06.2009

Examinador

E. Ulloa Calvo

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A23L 1/275 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23L, A23K

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

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, EMBASE, BIOSIS, NPL, MEDLINE, XPTK, XPOAC

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 200700272

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.06.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-9	SÍ
	Reivindicaciones	_____	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	_____	SÍ
	Reivindicaciones	1-9	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JP 7132096 A (resumen)	23.05.1995
D02	CA 2609160 A1	30.11.2006
D03	RONNEKLEIV, M. et al. Biochemical Systematics and Ecology. 1995. Vol.23, nº6, páginas 627-634. ISSN 0305-1978.	1995
D04	LAZRAC, T. et al. Biochimica et Biophysica Acta. 1988. Vol.939, nº1, páginas 160-162. ISSN 0006-3002.	1988
D05	RONNEKLEIV, M. et al. Phytochemistry. 1995. Vol.39, nº3, páginas 631-634. ISSN 0031-9422.	1995
D06	EP 0694610 A1	31.01.1996
D07	US 2005003474 A1	06.01.2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud describe, en su reivindicación independiente 1, un compuesto que comprende una membrana celular liofilizada procedente de microorganismos halófilos que tienen al menos el 0.1% en peso seco de pigmentos carotenoides. En sus reivindicaciones dependientes 2-4 especifica los microorganismos halófilos. Puede ser arqueas halófilas (*Haloferax volcanii*; *H. mediterranei*; *Halobacterium salinarum*) o bacterias halófilas. La reivindicación independiente 5 determina el método de obtención de la membrana liofilizada, y las reivindicaciones 6-9 distintos usos del compuesto como suplemento alimenticio pigmentante o para modificar la coloración en animales, en especial aves, y más específicamente el canario con factor rojo.

El documento D01 se refiere a un método de producción de carotenoides a partir de *Halobacterium* para su uso como aditivo alimenticio.

El documento D02 realiza un tratamiento sobre carotenoides para mejorar su aplicación como aditivo. Los carotenoides tratados pueden proceder de una fuente natural, como fragmentos de células de microorganismos liofilizados.

El documento D03 indica la existencia de ciertos carotenoides en la membrana celular de *H.volcanii* y *H.salinarum*.

El documento D04 demuestra la presencia de carotenoides en la membrana de arqueas halófilas, que actúan de refuerzo de la misma.

El documento D05 analiza tres tipos de carotenoides en *H.volcanii* y *H. salinarum*.

El documento D06 anticipa el uso de células de *P.rhodozyma* com fuente de carotenoides en canarios con factor rojo.

El documento D07 describe un proceso de biosíntesis de carotenoides mediante la modificación genética de microorganismos para su uso como suplemento alimentario de humanos o animales.

Hoja adicional

NOVEDAD (Art. 6.1. L.P. 11/1986)

Las reivindicaciones 1-9 poseen el requisito de novedad.

ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1.L.P. 11/1986)

El documento D01 es el más cercano del estado de la técnica. Se refiere a un método de producción de carotenoides a partir de Halobacterium para su uso como aditivo alimenticio. Realiza un cultivo previo del microorganismo, centrifuga y obtiene fragmentos de membrana. Posteriormente trata estos fragmentos de membrana rotos para obtener de ellos bacterioruberina.

La diferencia de la reivindicación 1 respecto al documento D01 es que el compuesto D01 va más allá de la invención reivindicada, y una vez obtenidos los fragmentos de membrana intenta extraer de ellos el carotenoide en vez de emplear los fragmentos sin procesar. Sin embargo, es conocido en el estado de la técnica el empleo de células liofilizadas o fragmentos de las mismas procedentes de microorganismos, y que llevan carotenoides, como colorante para alimentación humana o animal. Un ejemplo de ello viene indicado en el documento D02 (página 8, línea33- página 9, línea 5). No se considera, por tanto, que requiera actividad inventiva el emplear membrana liofilizada con carotenoides procedente de arqueas halófilas si ya se emplean carotenoides procedentes de la misma fuente, ya que la forma de suministrarlos, a base de membrana liofilizada, no es algo novedoso.

Por tanto, la combinación de los documentos D01 y D02 afecta a la actividad inventiva de la reivindicación 1.

Las reivindicaciones dependientes 2-4 también se ven afectadas por esta combinación. D01 no especifica la especie, si bien dentro de las arqueas halófilas, H.salinarum y H.volcanii son bien conocidas como portadoras de carotenoides en membrana (ver documentos D03 y D05).

En lo referente al método, D01 selecciona células de arqueas halófilas con alto porcentaje de carotenoides (implícitamente viene indicado), realiza la lisis, separa la membrana celular y sobre ésta hace una serie de pasos encaminados a extraer el carotenoide. D01 difiere de la solicitud en que no realiza una liofilización de las membranas. Sin embargo, y como se puede ver en D02, esta técnica ya es conocida. Por ello, la combinación de ambos documentos anula la actividad inventiva de la reivindicación 5.

Las reivindicaciones 6-9, específicas del uso como suplemento alimenticio pigmentante y para modificar la coloración de animales, son obvias cuando se trata del uso de un aditivo a base de carotenoides. Ejemplos que reflejan alguno de estos usos están en los documentos D02, D06 y D07.

Así, el documento D01 en combinación con D02 anula la actividad inventiva de las reivindicaciones 1-9.