



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 341**

51 Int. Cl.:  
**C12N 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98904350 .0**

96 Fecha de presentación : **11.02.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1002051**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.05.2000**

54 Título: **Cepas probióticas de *Lactobacillus salivarius* y agentes antimicrobianos obtenidos a partir de las mismas.**

30 Prioridad: **11.02.1997 PCT/IE97/00007**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.06.2011**

73 Titular/es: **Enterprise Ireland (Trading As  
Bioresarch Ireland)  
Glasnevin  
Dublin 9, IE  
University College Cork-National University of  
Ireland, Cork**

72 Inventor/es: **Collins, John, Kevin;  
O'Sullivan, Gerald, Christopher;  
Thornton, Gerardine, Mary y  
O'Sullivan, Marian, Mary, Geraldine**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 360 341 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Campo del invento

5 Este invento se refiere a cepas bacterianas probióticas capaces de producir agentes antimicrobianos que tienen diversas aplicaciones en productos alimenticios y en medicina. Más particularmente, el invento se refiere a cepas probióticas de *Lactobacillus salivarius* y a un agente antibacteriano peptídico derivado de ellas, con propiedades de tipo bacteriocina.

Técnica fundamental

10 En la última década se ha llevado a cabo mucha investigación en el campo de los probióticos humanos [véase la revisión de Huis in't Veld et al. (1994), *Tibtech* 12, 6-8]. Esta investigación ha sido impulsada por el creciente interés del público por su salud y bienestar. Muchos productos probióticos están ahora disponibles en el mercado y algunos de los efectos beneficiosos derivados de estos productos van desde el alivio de la intolerancia a la lactosa [S. E. Gilliland (1990), *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 175-188] hasta la prevención de enfermedades diarreicas [P. Marteau et al. (1993), *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 207-220] y la posible prevención de la carcinogénesis [S. Adachi (1992) en "The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease" (redactado por Wood), 233-262, Elsevier, Barking]. Existe una controversia  
15 acerca de muchos de estos efectos beneficiosos ya que no se dispone de procedimientos normalizados y se han publicado resultados contradictorios en relación con los posibles efectos beneficiosos de productos cultivados que contienen bacterias "probióticas".

20 Se ha citado una mala elección de cepa como uno de los factores que contribuyen a la inconsistencia y la variabilidad de los resultados [P. Marteau et al. (1993), *supra*; H. S. Kim (1988), *Cult. Dairy Prod. J.* 23, 6-9], y R. Fuller (1989, *J. Appl. Bact.* 66, 365-378) esbozó unos criterios relativos al aislamiento exitoso de cepas probióticas. Las cepas debían ser nativas para la supuesta especie huésped y tener además la capacidad de (i) sobrevivir y crecer dentro de ese huésped, (ii) ejercer un efecto beneficioso en el sitio diana y (iii) poderse mantener en sistema o alimento vehicular a lo largo de la fabricación y almacenamiento del producto.

25 Hay un mercado para productos que promueven la salud, incluyendo probióticos, que crece rápidamente. Muchos de dichos productos son ahora asequibles [S. C. Jong y J. M. Birmingham (1993), *ATCC Quart. Newslett.* 13 (1): 1-11]. Uno de los componentes más importantes de estos productos son los microorganismos usados. Las especies más frecuentemente utilizadas incluyen *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. y *Propionibacterium* sp. [M. G. O'Sullivan et al (1992), *Trends in Food Sci. and Tech.* 3 (12), 309-314]. Hay una falta de evidencia sustanciada, procedente de pruebas controladas, de que los organismos actualmente usados en dichos productos sean aquellos que ejercen efectos beneficiosos sobre la flora intestinal [G. W. Tannock (1983) en "Human Intestinal Microflora in Health and Disease", 517-539, redactado por D. J. Hentges, New York, Academic Press]. La fuente del microorganismo es crítica para su supervivencia y, por lo tanto, su función en el tracto intestinal humano. Y.-K. Lee y S. Salminen (1995, *Trends Food Sci. Technol.* 6, 241-245) afirmaron que, como requisito general, una cepa probiótica debería ser de origen humano ya que algunos efectos promotores de la salud pueden ser dependientes de la especie. Es bien sabido que la microflora nativa es uno de los mecanismos de defensa principales que protegen al ser humano de la colonización por bacterias invasoras alóctonas [C. Tancrede (1992), *Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.* 11 (11), 1012-1015] y es además el mejor aliado del ser humano cuando apoya al sistema inmune. Las poblaciones bacterianas de los diferentes niveles del tracto gastrointestinal constituyen ecosistemas complejos que dependen de la fisiología del huésped y de las interacciones entre bacterias.

40 Ten Brink et al. (1994, *Journal of Applied Bacteriology* 77, 140-148) aislaron y exploraron un gran número (~1000) de cepas de *Lactobacillus* en cuanto a la producción de actividad antimicrobiana. Se aislaron lactobacilos de diversos forrajes y alimentos (col fermentada, queso, salchicha y ensilaje) fermentados, placa dental humana, y heces procedentes de diferentes animales de laboratorio (rata, ratón, cobayo y codorniz) y seres humanos voluntarios. Sólo se hallaron ocho cepas positivas, y se estudiaron dos de éstas, a saber, *Lactobacillus salivarius* M7 y *Lactobacillus acidophilus* M46. La primera cepa produce salivaricina B, una bacteriocina de amplio espectro que inhibe el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Brochothryx thermosphacta*, *Enterococcus faecalis* y muchos lactobacilos. El *L. acidophilus* M46 produce acidocina B, una bacteriocina que combina la inhibición de *Clostridium sporogenes* con un espectro de actividad muy estrecho dentro del género *Lactobacillus*. Sin embargo, estas cepas no son nativas con respecto a la especie huésped infectada, que es uno de los criterios que son necesarios para una cepa probiótica exitosa para uso humano.

45 K. Arihara et al. (1996, *Letters in Applied Microbiology* 22, 420-424) han aislado salivacina 140, una bacteriocina de *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinii* T140. La cepa T140 se aisló de la superficie de hojas de carrizo de la Pampa procedente de Japón, desarrolladas cerca de un establo, y, por consiguiente, era probable que la cepa hubiera procedido de heces animales.

55 Existe la necesidad de cepas probióticas que satisfagan los criterios anteriormente mencionados. Se cree que la producción de bacteriocinas por lactobacilos desempeña un papel importante en la exclusión competitiva de patógenos y otros microorganismos indeseables del tracto intestinal de los seres humanos. Las bacteriocinas son definidas en términos generales como compuestos proteicos que ejercen un efecto bactericida sobre una gran variedad de

microorganismos.

Debido a su diversidad de especies y hábitats, los lactobacilos son las más bacteriocinogénicas de las bacterias ácido-lácticas (LAB; del inglés, *lactic acid bacteria*). Se han aislado ahora tantas como 40 bacteriocinas producidas por lactobacilos [T. R. Klaenhammer (1993), FEMS Microbiol. Rev. 12, 39-86].

5 Se han aislado bacteriocinas de heces de niños. Sin embargo, se halló que las bacteriocinas presentaban estrechas variedades de huéspedes y sólo eran activas sobre otras especies de lactobacilo [T. Toba et al. (1991), Lett. Appl. Microbiol. 12, 228-231].

Existe la necesidad de bacteriocinas con un amplio espectro de actividad.

#### Descripción del invento

10 El invento proporciona un cultivo biológicamente puro de una cepa de *Lactobacillus salivarius* aislada de tracto gastrointestinal humano ressecado y lavado y que es adherente para el mismo, que inhibe una amplia variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos y que secreta un producto que tiene actividad antimicrobiana a un sobrenadante exento de células, actividad que es producida sólo por células en crecimiento y que es destruida por proteínasa K y pronasa E, cepa cuyas propiedades inhibitorias y productos secretores se mantienen en presencia de concentraciones fisiológicas de bilis humana y jugo gástrico humano, cepa que presenta un amplio espectro de actividad sobre bacterias, incluyendo *Listeria*, *Staphylococcus* y *Bacillus*, pero que no inhibe a muchos lactobacilos íntimamente relacionados.

20 Son dos cepas especialmente preferidas: la cepa UCC 1 de *Lactobacillus salivarius* [depositada en The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB) el 27 de noviembre de 1996 y a la que se le otorgó el número de acceso NCIMB 40830] y la cepa UCC 118 de *Lactobacillus salivarius* [depositada el NCIMB el 27 de noviembre de 1996 y a la que se le otorgó el número de acceso NCIMB 40829], y mutantes o variantes de las mismas que tienen las mismas propiedades.

25 El producto antimicrobiano secretado por las cepas de *Lactobacillus salivarius* de acuerdo con el invento puede ser el producto de expresión de un plásmido u otro elemento extracromosómico asociado con dichas cepas.

El invento también proporciona un producto promotor de la salud, que contiene como probiótico una cepa de *Lactobacillus salivarius* como la anteriormente definida.

Las cepas de *Lactobacillus salivarius* de acuerdo con el invento se aislaron de apéndices y secciones de los intestinos grueso y delgado del tracto gastrointestinal (TGI) humano obtenido durante una cirugía reconstructiva.

30 Un sitio preferido para el aislamiento de las cepas de acuerdo con el invento es el intestino delgado. Todas las bacterias cuyo mantenimiento en cultivo resultó difícil fueron desechadas ya que no sería adecuado trabajar con ellas bajo las condiciones de procesamiento o fabricación.

35 De este modo, se identificaron ciertas cepas de *Lactobacillus salivarius* que tienen una mayor posibilidad de supervivencia en el TGI humano cuando se comparan con muchas de las cepas probióticas que se utilizan actualmente.

Se halló que las cepas de acuerdo con el invento, cuando son sometidas a ensayos de adhesión, son muy adherentes en relación con las líneas celulares Caco-2 y HT-29.

40 Las cepas de lactobacilo de acuerdo con el invento son capaces de sobrevivir en un pH tan pequeño como 2,0. Antes de la colonización y el crecimiento de un probiótico en el tracto gastrointestinal, debe atravesar el duro ambiente ácido del estómago. Hay cuatro factores principales que determinan la supervivencia de bacterias tras el paso por el estómago para alcanzar el intestino; es decir, el pH del jugo gástrico, la capacidad de tamponamiento del alimento, la velocidad del vaciamiento gástrico, y la cantidad y el estado fisiológico de la propia bacteria.

45 El ácido gástrico ha sido considerado un mecanismo de defensa principal del huésped, implicado en mantener la escasa población bacteriana del intestino delgado superior y ayudar a la resistencia contra una infección por microorganismos patógenos (actividad germicida). Un factor clave que influye en la supervivencia de las bacterias en el jugo gástrico es el pH.

50 El mecanismo de tolerancia de una cepa probiótica a un pH bajo es importante para su capacidad para sobrevivir al paso a través del estómago. Una incubación prolongada de las células de las cepas de lactobacilo de acuerdo con el invento en medios tamponados antes de la estimulación en valores de pH bajos muestra que son sensibles a un pH de 2,0. Esta observación indica que estas cepas, para su resistencia, poseen un mecanismo de tolerancia inducible al ácido, como se ejemplifica más adelante.

Las cepas de lactobacilo de acuerdo con el invento también presentan una elevada resistencia a la

bilis. Se considera que la resistencia a los ácidos biliares es una importante característica biológica de las cepas, necesaria para la supervivencia en el ambiente hostil del TGI. Para que los microorganismos tengan una capacidad promotora de salud en el intestino humano, no sólo deben ser capaces de resistir los efectos potencialmente letales de los ácidos biliares presentes, sino que no deben incidir en la salud del huésped al producir compuestos tóxicos tales como el ácido desoxicólico (DCA; del inglés, deoxycholic acid) y el ácido litocólico (LCA; del inglés, lithocholic acid), que han sido implicados en diversos fenómenos citotóxicos.

De una cepa de *Lactobacillus salivarius* de acuerdo con el invento como la anteriormente definida se puede obtener un agente antimicrobiano que tenga propiedades de tipo bacteriocina.

Preferiblemente, dicho agente antimicrobiano tiene las propiedades siguientes:

- 10 (i) un peso molecular aparente de entre 30 y 100 kDa;
- (ii) estabilidad térmica;
- (iii) resistencia a lo largo de un amplio intervalo de pHs;
- (iv) resistencia al tratamiento con detergentes;
- (v) resistencia a disolventes orgánicos;
- 15 (vi) sensibilidad a enzimas proteolíticas, incluyendo proteinasa K, pronasa E, tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, ficina y papaína; y
- (vii) resistencia a la lipasa, catalasa, fosfatasa alcalina, fosfolipasa C y lipoproteína lipasa.

Se exploraron dos de las cepas de *Lactobacillus salivarius* de acuerdo con el invento, es decir, las cepas UCC1 y UCC 118 de *L. salivarius*, en cuanto a actividad antimicrobiana sobre un conjunto de cuatro cepas indicadoras: *Listeria innocua*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* y *Lactobacillus fermentum* KLD. Se halló que estas cepas, cuando eran examinadas en un medio tamponado, resultaban inhibitorias para las cepas indicadoras *Listeria innocua* y *L. fermentum* KLD. Los estudios de inhibición demostraron que las dos cepas inhibían una gran variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Ambas cepas secretaban actividad antimicrobiana al sobrenadante exento de células, y esta actividad era destruida por proteinasa K y pronasa E. Por lo tanto, se consideró que estos compuestos eran bacteriocinas.

Las cepas UCC 1 y UCC 118 de *L. salivarius* producen compuestos proteicos secretores que han recibido los nombres codificados ABP1 y ABP118, respectivamente.

ABP1 y ABP118 presentan un espectro de actividad bastante amplio sobre bacterias, incluyendo *Listeria*, *Staphylococcus* y *Bacillus*, pero no inhiben lactobacilos íntimamente relacionados, con la excepción de *L. fermentum* KLD, ni otras LAB tales como *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*. Éste es un rasgo poco habitual de una bacteriocina [T. R. Klaenhammer (1993), *supra*] y es probable que sea ventajoso para el uso de estas cepas como probióticos ya que competirían con microorganismos indeseables pero no con cepas íntimamente relacionadas. Otra característica poco habitual de las cepas es su actividad antagónica hacia *Pseudomonas* sp. Éste es un rasgo poco habitual para bacterias Gram positivas.

Las cepas UCC 1 y 118 tienen un espectro de actividad mucho más amplio que sus respectivos compuestos proteicos, ABP1 y ABP118. Esto sugiere que las células viables producen un producto que potencia o actúa en sinergia con ABP1/ABP118 para inhibir la célula diana.

ABP1 y ABP118 no son bacteriocinas idénticas (poseen diferentes espectros de inhibición) pero son muy similares, ya que ninguna de las dos es activa sobre LAB y cada productor es inmune a la actividad de la bacteriocina del otro. La inmunidad cruzada puede indicar que estas bacteriocinas actúan de la misma manera. ABP118 es activa sobre ciertas cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA; del inglés, methicillin resistant S. aureus), *H. pylori* y *P. fluorescens*. Hasta la fecha, no existen en la bibliografía comunicaciones sobre la inhibición de MRSA por una bacteriocina.

El invento también proporciona una fracción purificada de un agente antimicrobiano obtenible de una cepa de *Lactobacillus salivarius*, anteriormente identificado como ABP 118 y que tiene las propiedades siguientes:

- 45 (i) un peso molecular de 5,0 – 5,3 kDa;
- (ii) una composición relativa de aminoácidos que tiene más de 45% de aminoácidos hidrófobos, 19-21% de glicocola, 13-14% de alanina y 11-12% de leucina, nada de triptófano ni tirosina, una metionina y cuatro restos de prolina;
- 50 (iii) una secuencia de aminoácidos - Lys - Arg - Gly - Pro - Asn - C (ID. SEC. nº 1) en, o adyacente a, el extremo N; y

(iv) comprende una secuencia de aminoácidos Asn Met Lys Arg Gly Pro Asn Cys Val Gly Asn Phe Leu Gly Gly Leu Phe Ala Gly Ala Ala Ala Gly Val Pro Gln Gly Pro Cys (ID. SEC. nº 2).

El agente antimicrobiano ABP 118 tiene un espectro de actividad inusualmente amplio, como se describe y ejemplifica más adelante.

5 Una fracción purificada de un agente antimicrobiano anteriormente aquí identificado como ABP 1 tiene las propiedades siguientes:

(i) un peso molecular de 5,3 – 6,1 kDa; y

(ii) una composición relativa de aminoácidos que tiene más de 28-30% de aminoácidos hidrófobos, 17% de glicocola y 12-13% de alanina, nada de triptófano y dos restos de prolina.

10 Como se indicó anteriormente, la cepa UCC 118 de *Lactobacillus salivarius*, aislada de intestino humano, produce la proteína antibacteriana ABP118, que presenta un amplia variedad de inhibición sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se ha mostrado que ABP118 es térmicamente estable, resistente a lo largo de un amplio intervalo de pHs y resistente al tratamiento con diversos detergentes y disolventes orgánicos. Es sensible a enzimas proteolíticas e insensible a la actividad lipasa. La ultrafiltración sugiere un peso molecular aparente de entre 30 y 100 kDa para un extracto crudo de ABP 118. Estudios de crecimiento demuestran que la máxima producción de ABP118 tiene lugar en caldo MRS, pH de 5,5. La eliminación de Tween 80 (marca comercial) o peptonas de este medio da lugar a una pérdida de producción de ABP 118 del 50%. *L. salivarius* UCC 118 produce ABP 118 en medios basados en leche y en presencia de bilis humana en concentraciones fisiológicas [0,3% (volumen/volumen)]. Experimentos de cocultivo demuestran la capacidad de *L. salivarius* UCC 118 para inhibir el crecimiento de *Salmonella* en un medio de caldo. Se considera que esto es debido a la producción de compuestos antimicrobianos, incluyendo ABP 118.

La bacteriocina ABP 118 puede ser detectada en forma activa y asequible en presencia de proteínas lácteas. De este modo, se puede utilizar leche como un medio de soporte para la producción de bacteriocinas de acuerdo con el invento. Además, las cepas de *Lactobacillus salivarius* de acuerdo con el invento pueden ser utilizadas para fermentar productos lácteos.

25 Las propiedades de ABP118 anteriormente mencionadas, es decir, la estabilidad frente al pH, la temperatura y el almacenamiento, indican que es probable que esta bacteriocina sea valiosa en las industrias alimentaria y farmacéutica.

De este modo, la fracción purificada de acuerdo con el invento puede ser utilizada en productos alimenticios. También puede ser utilizada como un medicamento.

30 La fracción purificada de acuerdo con el invento es particularmente útil contra *S. aureus* resistente a metilina (MRSA).

Como se demuestra más adelante en los Ejemplos 7 y 8, la anterior secuencia de aminoácidos (ID. SEC. nº 2), que fue determinada a partir de una fracción purificada de la bacteriocina, es un péptido parcial. Este péptido parcial se utilizó para diseñar sondas que permitieran identificar una secuencia génica interna y, a partir de esta secuencia, se aisló y secuenció un fragmento de 80 pares de bases (bp; del inglés, base pairs). Esta secuencia de DNA fue deducida para obtener una secuencia proteica que confirmara la identidad de la ID. SEC. nº 2. De este modo, el invento proporciona una secuencia de DNA que codifica la bacteriocina ABP118, es decir, la secuencia de DNA 5'ATGAAACGCGGACCC AACTGTGTAGGTAAGTCTTAGGTGGT-CTATTTGCTGGAGCA GCTGCAGGTGTCCCC-CAGGGCCCC3' (ID. SEC. nº 6).

#### 40 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación gráfica de la supervivencia de células lavadas de cepas de *Lactobacillus* [unidades formadoras de colonias (cfu; del inglés, colony forming units)/ml] en caldo MRS, pH de 2,0, frente al tiempo (min);

45 La Figura 2 es una representación gráfica de la supervivencia de células lavadas de cepas de *Lactobacillus* (cfu/ml) en caldo MRS, pH de 2,0, frente al tiempo (min);

La Figura 3 es una representación gráfica de la supervivencia de la cepa UCC 118 de *Lactobacillus* (cfu/ml) frente al tiempo (min) en medios no tamponados y medios tamponados;

La Figura 4 es una representación gráfica que indica el crecimiento de *L. salivarius* UCC 118 (log DO<sub>600</sub>) y la producción de ABP118 [unidades de absorbancia (UA)/ml] frente al tiempo (h);

50 Las Figuras 5A – 5D son una representación gráfica del efecto bactericida de ABP118 (5000 UA/ml) sobre células de *Bacillus coagulans* 1761 lavadas (y resuspendidas en tampón) y no lavadas en fases logarítmica y estacionaria.

La Figura 6 es una representación gráfica del crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en caldo TSAYE con

(♦) y sin (□) adición de ABP 118 (5000 UA/ml);

La Figura 7 es una representación gráfica del crecimiento de *Staphylococcus aureus* 148 resistente a metilina (MRSA), en caldo TSAYE con (♦) y sin (□) adición de ABP 118 (5000 UA/ml);

5 La Figura 8A es una representación gráfica del efecto inhibitorio de ABP 118 sobre la síntesis de DNA por *Bacillus coagulans* 1761; y

La Figura 8B es una representación gráfica del efecto inhibitorio de ABP118 sobre la síntesis de RNA por *Bacillus coagulans* 1761.

El invento será adicionalmente ilustrado mediante los ejemplos siguientes.

Modos de llevar el invento a cabo

10 Ejemplo 1

Aislamiento de bacterias probióticas

Se exploraron apéndices y secciones de los intestinos grueso y delgado del TGI humano, obtenidos durante una cirugía reconstructiva, en cuanto a cepas bacterianas probióticas, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

15 Muestras de tejido del tracto gastrointestinal exploradas en cuanto a la presencia de bacterias probióticas

Muestra	Situación
A	Íleon
B	Colon
C	Región ilíaca-cecal
D	Apéndice
E	Apéndice
F	Íleon
G	Región ilíaca-cecal

Todas las muestras se guardaron a -80 °C en recipientes estériles inmediatamente después de la cirugía.

20 Los tejidos congelados fueron descongelados, pesados e introducidos en disolución de Ringer de concentración un cuarto y cisteinada (0,05%). Cada muestra fue sacudida suavemente para separar los microorganismos de adherencia poco firme [operación denominada: lavado "W" (del inglés, wash)]. Después de la transferencia a un segundo volumen de disolución de Ringer, la muestra fue agitada con formación de remolinos durante 7 minutos para separar las bacterias de adherencia firme [operación denominada: muestra "S" (del inglés, sample)]. Con objeto de aislar las bacterias embebidas en tejido, las muestras A, B y C fueron también homogeneizadas en una mezcladora Braun (operación denominada: producto de homogeneización "H"). Las disoluciones fueron sucesivamente diluidas (la dilución 10<sup>-1</sup> de una muestra de lavado fue etiquetada W1, la dilución 10<sup>-2</sup> fue etiquetada W2, y se usó el mismo sistema de etiquetado para las muestras "S" y "H") y sembradas por extensión (100 µl) sobre los siguientes medios de agar: RCM [medios reforzados para *Clostridium* (del inglés, reinforced clostridial media)] y RCM con el pH ajustado a 5,5 utilizando ácido acético; TPY [tripticasa, peptona y extracto de levadura (del inglés, yeast)] [P. Chevalier et al. (1990), J. Appl. Bacteriol. 68, 619-624]; MRS (deMann, Rogosa y Sharpe); ROG [medio de acetato (SL) de Rogosa]; LLA [agar hígado-lactosa (del inglés, liver-lactose agar) de Lapiere]; BHI [agar infusión de cerebro y corazón (del inglés, brain heart infusion)]; LBS [agar selectivo para *Lactobacillus* (del inglés, Lactobacillus selective); y TSAYE [agar triptonsoja complementado con extracto de levadura al 0,6% (del inglés, tryptone soya agar-yeast extract)]. Todos los medios de agar fueron suministrados por Oxoid Chemicals con la excepción del agar TPY. Las placas se incubaron en recipientes anaeróbicos (BBL, Oxoid) usando sistemas generadores de CO<sub>2</sub> (Anaerocult A, Merck), durante 2-5 días a 37 °C.

35 Productos de aislamiento de bacterias bifurcadas/pleomórficas o con forma de bastón, Gram positivas y catalasa negativas, fueron sembrados por estrías, para pureza, sobre medios complejos no selectivos (MRS y TPY).

Los productos de aislamiento fueron rutinariamente cultivados en medio MRS o TPY, a menos que se afirme otra cosa, a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas. Los supuestos *Lactobacillus* sp. fueron guardados en glicerol al 40% y almacenados a -20 °C y -80 °C.

#### Análisis del producto final de la fermentación

5 Se examinaron el metabolismo del hidrato de carbono glucosa y los subsiguientes productos finales de ácido orgánico usando una columna LKB Bromma, Aminex HPX-87H, para cromatografía de alta eficacia en fase líquida (HPLC; del inglés, high performance liquid chromatography). La columna se mantuvo a 60 °C con un caudal de 0,6 ml/min (presión constante). El tampón utilizado para la HPLC fue H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N. Antes del análisis, la columna fue calibrada usando citrato 10 mM, glucosa 10 mM, lactato 20 mM y acetato 10 mM como patrones. Los cultivos se propagaron anaeróbicamente en caldo MRS modificado durante 1-2 días a 37 °C. Después de una centrifugación a 14.000 g durante 10 minutos, se diluyó 1:5 el sobrenadante con tampón para HPLC y se analizaron 200 µl por HPLC. Todos los sobrenadantes se analizaron por duplicado.

#### Caracterización bioquímica y fisiológica

15 Se determinaron los rasgos bioquímicos y fisiológicos de los productos de aislamiento bacterianos para facilitar la identificación. Se examinaron la reducción de nitrato, la formación de indol y la expresión de actividad β-galactosidasa. Se determinaron el crecimiento tanto a 15 °C como a 45 °C, el crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de NaCl hasta un 5,0%, y la actividad proteasa sobre gelatina. También se evaluaron las características de crecimiento de las cepas en leche tornasolada.

#### Identificación de especies

20 Se usó el sistema API 50CHL (BioMerieux SA, Francia) para identificar provisionalmente las especies de *Lactobacillus* por sus perfiles de fermentación de hidratos de carbono. Se recolectaron cultivos nocturnos en MRS por centrifugación y se resuspendieron en el medio de suspensión proporcionado con el kit. Se inocularon tiras API y se analizaron (después de 24 y 48 horas) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La identidad del *Lactobacillus* sp. fue confirmada mediante el análisis de la proteína celular total por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE, del inglés, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis).

#### Perfiles de actividad enzimática

30 Se utilizó el sistema API ZYM (BioMerieux, Francia) para la medición semicuantitativa de enzimas constitutivas producidas por los productos de aislamiento de *Lactobacillus*. Se recolectaron células bacterianas de la fase de crecimiento logarítmico tardía por centrifugación a 14.000 g durante 10 minutos. Las células sedimentadas fueron lavadas y resuspendidas en tampón de fosfato 50 mM, pH de 6,8, hasta la misma densidad óptica. Se inocularon las tiras de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se incubó a 37 °C durante 4 horas y se registró el desarrollo de color.

#### Perfiles de sensibilidad a antibióticos

35 Se determinaron los perfiles de sensibilidad de los productos de aislamiento a antibióticos usando el ensayo de "susceptibilidad con disco". Se desarrollaron cultivos en el medio de caldo apropiado durante 24-48 horas y se sembraron por extensión (100 µl) sobre medios de agar, y se pusieron discos que contenían concentraciones conocidas de los antibióticos sobre el agar. Se examinaron las cepas en cuanto a su sensibilidad a antibióticos después de 1-2 días de incubación a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas. Las cepas se consideraron sensibles si se veían zonas de inhibición de 1 mm o más.

#### Análisis de perfiles plasmídicos

45 Se llevó a cabo un análisis de perfiles plasmídicos de diez *Lactobacillus* sp. utilizando el procedimiento de lisis [D. L. Anderson y L. L. McKay (1983), Appl. Env. Microbiol. 46, 549-552] con las modificaciones siguientes. Se inocularon células bacterianas (4%) a 100 ml de caldo MRS complementado con DL-treonina 40 mM y se incubaron durante 4-5 horas (fase logarítmica media). Las células, recolectadas por centrifugación, se utilizaron inmediatamente para la preparación de DNA plasmídico. Antes de la operación de lisis, se añadieron lisozima (10 mg/ml) y mutanolisina (10 µg/ml) a las suspensiones celulares y se incubaron las mezclas a 37 °C durante 1 hora y posteriormente a 4 °C durante 30 minutos. Después de la adición de NaCl 5 M, los productos de lisis se pusieron sobre hielo durante 30 minutos. El DNA fue sometido a electroforesis en geles verticales de agarosa al 0,7% en tampón de Tris-acetato durante 4-5 horas a 100 V.

#### Aislamiento de *Lactobacillus* sp.

50 Se exploraron siete cortes tisulares tomados del TGI humano en cuanto a la presencia de cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*. Hubo cierta variación entre las muestras tisulares, como se indica a continuación. Las muestras A (íleon) y E (apéndice) tenían las menores cuentas, con aproximadamente 10<sup>2</sup> células aisladas por gramo de tejido. En comparación, de las otras muestras se recuperaron más de 10<sup>3</sup> cfu/g de tejido. Se aislaron números

similares de bacterias durante las operaciones "lavado" y "muestra", con cuentas ligeramente mayores en las disoluciones "muestra" de F (íleon) y G (íliaco-cecal). De los cortes explorados en cuanto a bacterias de adherencia firme (homogeneizados), C (íliaco-cecal) fue el único corte tisular que proporcionó cuentas significativas.

5 Durante la exploración de ciertos cortes tisulares, por ejemplo, C y B, no hubo una correlación directa entre las cuentas obtenidas durante una serie de diluciones. Esto indicaría que se estarían proporcionando ciertos factores de crecimiento, de procedencia sanguínea o tisular, para el crecimiento de las exigentes bacterias en la suspensión inicial que fue posteriormente diluida.

Selección y caracterización de cepas

10 Se escogieron aproximadamente 1500 productos de aislamiento bacterianos catalasa negativos de diferentes muestras y se caracterizaron en términos de su reacción Gram, tamaño y morfología celulares, crecimiento a 15 °C y 45 °C, y productos terminales de fermentación a partir de glucosa. Más del sesenta por ciento de los productos de aislamiento examinados eran cocos homofermentativos Gram positivos, dispuestos en tétradas, cadenas o haces. El dieciocho por ciento de los productos de aislamiento eran bastones Gram negativos y cocobacilos heterofermentativos. 15 Los productos de aislamiento restantes (veintidós por ciento) eran cocobacilos predominantemente homofermentativos. Se caracterizaron treinta y ocho cepas con más detalle: 13 productos de aislamiento de G, 4 de F, 8 de D, 9 de C, 3 de B y 1 de E. Los treinta y ocho productos de aislamiento examinados eran negativos tanto para la reducción de nitrato como para la producción de indol a partir de triptófano.

Identificación de especies

20 El sistema API 50CHL permitió la rápida identificación de los productos de aislamiento de *Lactobacillus*.

25 Siete de los productos de aislamiento eran muy típicos de la especie *salivarius* de acuerdo con sus perfiles de fermentación de hidratos de carbono. Los siete fermentaron eficazmente fructosa, glucosa, manosa, sorbosa y rafinosa. Ninguno fermentó amigdalina. Hubo cierta variabilidad: cuatro de las cepas fermentaron ribosa, dos eran negativas en cuanto a la utilización de lactosa, y tres productos de aislamiento fermentaron parcialmente ramnosa. Sin embargo, estos no son rasgos poco comunes de la especie *salivarius* (Bergey's Manual). Tres de los productos de aislamiento poseían perfiles de fermentación similares a los de *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. Fermentaron ribosa, galactosa, glucosa, fructosa, arbutina, celobiosa, lactosa, sacarosa, tagatosa y gluconato. Sin embargo, ninguno fermentó gentiobiosa ni turanosa, y una cepa era negativa en cuanto al crecimiento en sorbitol y amigdalina. Los tres productos de aislamiento fermentaron glicerol, lo que es un rasgo común al veinte por ciento de las cepas *casei* subsp. *casei*. 30 Cinco productos de aislamiento fueron provisionalmente clasificados en el grupo *plantarum/pentosus*. Eran positivos en cuanto a la fermentación de ribosa, galactosa, glucosa, fructosa, sorbitol, lactosa, celobiosa y esculina. Todos salvo dos fermentaron melecitosa, cuatro fueron positivos para trehalosa, dos fueron positivos para tagatosa y uno para gluconato. Todos fermentaron L-arabinosa pero sólo uno fermentó D-arabinosa. Ninguno fue capaz de crecer en rafinosa. El análisis de la proteína celular total del *Lactobacillus* sp. por SDS-PAGE reveló dos especies principales: *salivarius* y *paracasei*. 35

En la Tabla 2 se incluye un resumen de la identificación de las cepas. En la Tabla 2 y en las Tablas 3-6 y la descripción relacionada siguientes se ha omitido el prefijo UCC para las cepas de *Lactobacillus*.

Tabla 2

Identificación de cepas seleccionadas de *Lactobacillus* por dos diferentes técnicas

Cepa	Perfiles de fermentación de azúcares	Proteína celular total (SDS-PAGE)*
<i>Lactobacillus</i> sp.		
1	<i>L. salivarius</i>	<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
4333	<i>L. salivarius</i>	<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
43310	<i>L. salivarius</i>	<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
43321	<i>L. salivarius</i>	<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
43324	<i>L. salivarius</i>	<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
43332	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>

43336	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	ND
43338	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
43348	<i>L. pentosus</i>	<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
43361	ND	<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
43362	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
43364	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
118	<i>L. salivarius</i>	<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
4231	<i>L. salivarius</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
42319	<i>L. casei rhamnosus/pentosus</i>	ND
42354	<i>L. casei rhamnosus/pentosus</i>	ND
42361	<i>L. pentosus</i>	ND

---

ND = no determinado

\*La SDS-PAGE de proteínas de la pared celular fue cortesía de Bruno Pot (Universidad de Gante, Bélgica)

---

#### Perfiles de actividad enzimática

Se obtuvieron los perfiles de actividad enzimática de los diecisiete *Lactobacillus* sp. examinados, y los resultados fueron los siguientes:

- 5 Ninguna de las cepas presentaba actividad lipasa, tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\alpha$ -manosidasa ni  $\alpha$ -fucosidasa, y sólo débil actividad  $\beta$ -glucosidasa. En tres de las cepas (43332, 43338 y 43364) se observó actividad N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa. Todas las cepas examinadas se caracterizaron por una elevada actividad fosfatasa ácida (media de 5,0), siendo las actividades fosfohidrolasa y fosfatasa alcalina menores y más variables de la cepa. Nueve de las diecisiete cepas expresaban una actividad  $\beta$ -galactosidasa significativa, pero era evidente poca actividad  $\alpha$ -galactosidasa. Se observaron unos niveles de actividad leucina, valina y cistina arilamidasa de moderados a altos.

#### Perfiles de sensibilidad a antibióticos

- 15 Se utilizaron antibióticos de importancia clínica humana para determinar los perfiles de sensibilidad de lactobacilos seleccionados. Los lactobacilos examinados eran sensibles a ampicilina, amoxicilina, ceftaxima, ceftriaxona, ciprofloxacino, cefradina, rifampicina y cloranfenicol. También eran resistentes a netilmicina, trimetoprima, ácido nalidíxico, amikacina, vancomicina y gentamicina. También se observó una sensibilidad variable de los lactobacilos a teicoplanina y ceftizoxima.

#### Ejemplo 2

##### Fuente y mantenimiento de cepas

- 20 Las cepas de *Lactobacillus* usadas se aislaron de la manera descrita en el Ejemplo 1.

##### Jugo gástrico humano

- 25 Se obtuvo jugo gástrico humano de sujetos sanos por aspiración a través de un tubo nasogástrico (Mercy Hospital, Cork, Irlanda). Fue inmediatamente centrifugado a 13.000 g durante 30 minutos para separar todas las partículas sólidas, esterilizado a través de filtros de 0,45  $\mu$ m y 0,2  $\mu$ m y dividido en partes alícuotas de 40 ml que fueron almacenadas a 4 °C y -20 °C.

- 30 Antes del uso experimental, se midieron el pH y la actividad pepsina de las muestras. La actividad pepsina se midió utilizando el ensayo cuantitativo de hemoglobina [S, Gautam y R. S. de La Motte (1989), "Proteolytic enzymes, a practical approach", Capítulo 3, redactado por R. J. Beynon y J. S. Bond, IRL Press, Oxford University Press; R. M. Dawson (1969) en "Data for Biochemical Research 138", redactado por R. M. Dawson, D. C. Elliot y K. M. Jones, Clarendon Press, Oxford]. En resumen, se añadieron partes alícuotas de jugo gástrico (1 ml) a 5 ml de sustrato

5 [urea 0,7 M, hemoglobina bovina al 0,4% (peso/volumen; Sigma Chemical Co.), tampón de KCl-HCl 0,25 M, pH de 2,0] y se incubaron las mezclas a 25 °C. Se tomaron muestras a intervalos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20 y 30 minutos. Se terminaron las reacciones mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA) al 5% y se dejaron reposar las mezclas de reacción durante 30 minutos sin agitación. Luego se filtraron (Whatman, número 113) las mezclas de ensayo y se centrifugaron a 14.000 g durante 15 minutos, y se midió la absorbancia a 280 nm. Se definió una unidad de actividad enzimática pepsina como la cantidad de enzima requerida para causar un aumento de 0,001 unidades de  $A_{280\text{ nm}}$  por minuto en un pH de 2,0, medida como productos solubles en TCA usando hemoglobina como sustrato.

#### Crecimiento de lactobacilos en un pH bajo

10 Para determinar si el crecimiento de las cepas de *Lactobacillus* tenía lugar en valores de pH bajos, equivalentes a los hallados en el estómago, se inocularon cultivos nocturnos (1%) a caldo MRS fresco con el pH ajustado a 4,0, 3,0, 2,0 y 1,0 utilizando HCl 1 N. Se tomaron partes alícuotas (1,5 ml) a intervalos regulares, se midió la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) y se calcularon las unidades formadoras de colonias por ml (cfu/ml) utilizando el método del recuento en placa. Se controló el crecimiento a lo largo de un periodo de 24-48 horas.

#### Supervivencia de cepas en un ambiente de bajo pH

15 Se investigó la supervivencia *in vitro* de las cepas en un pH bajo usando dos ensayos:

(a) células de cultivos nocturnos frescos fueron recolectadas, lavadas dos veces en tampón de fosfato (pH de 6,5) y resuspendidas en caldo MRS, con el pH ajustado a 3,5, 3,0, 2,5 y 2,0 (con HCl 1 N), hasta una concentración final de aproximadamente  $10^8$  cfu/ml para los lactobacilos. Se incubaron las células a 37 °C y se midió la supervivencia a intervalos de 5, 30, 60 y 120 minutos utilizando el método del recuento en placa.

20 (b) se propagaron diariamente las cepas de *Lactobacillus* en caldo MRS tamponado (pH de 6,0), durante un periodo de 5 días. Las células fueron recolectadas, lavadas y resuspendidas en caldo MRS con pH ajustado, y se midió la supervivencia a lo largo de un periodo de 2 horas utilizando el método del recuento en placa.

#### Supervivencia de microorganismos en jugo gástrico humano

25 Para determinar la capacidad de los lactobacilos para sobrevivir al paso a través del estómago, se llevó a cabo un estudio *ex-vivo* utilizando jugo gástrico humano. Células de cultivos nocturnos frescos fueron recolectadas, lavadas dos veces en tampón (pH de 6,5) y resuspendidas en jugo gástrico humano hasta una concentración final de  $10^6$ - $10^8$  cfu/ml, dependiendo de la cepa. Se controló la supervivencia a lo largo de un periodo de incubación de 30-60 minutos a 37 °C. El experimento se llevó a cabo utilizando jugo gástrico en un pH de 1,2 (no ajustado) y unos pHs de 2,0 y 2,5 (ajustados usando NaOH 1 N).

#### Crecimiento de *Lactobacillus* sp. en un pH bajo

Las cepas de *Lactobacillus* (de origen humano) crecieron normalmente en un pH de 6,8 y un pH de 4,5 alcanzando la fase estacionaria después de 8 horas, con un tiempo de duplicación de 80-100 minutos. En un pH de 3,5, el crecimiento quedó restringido, aumentando los tiempos de duplicación a 6-8 horas. No se observó crecimiento en un pH de 2,5 o menor; por lo tanto se examinó la supervivencia de las cepas en un pH bajo.

#### Supervivencia de *Lactobacillus* sp. en un pH bajo

Medio ajustado con HCl

40 Las cepas de *Lactobacillus* eran generalmente resistentes a valores de pH de 3,5, 3,0 y 2,5. En un pH de 2,0, se hizo evidente una variación debida a la cepa (véase la Figura 1). Las cepas de *Lactobacillus* de origen humano sobrevivían con poca reducción logarítmica durante 1 hora; sin embargo, el *Lactobacillus* 118 había disminuido en 2-4 log después de 2 horas de incubación (véase la Figura 2).

Jugo gástrico humano

45 Para determinar la capacidad de las cepas de *Lactobacillus* para sobrevivir en las condiciones a que se enfrentan en el estómago humano, se examinó la viabilidad de las cepas en jugo gástrico humano en un pH de 1,2 y un pH de 2,5. Se utilizó jugo gástrico con pH ajustado a 2,5 para determinar si factores distintos del pH eran importantes en la inhibición de estas cepas por el jugo gástrico. Las cepas de acuerdo con el invento fueron recuperadas después de 30 minutos de incubación en jugo gástrico, pH de 1,2, aunque en un nivel reducido. En jugo gástrico, pH de 2,5, la viabilidad era aproximadamente 100% en la mayoría de los casos, lo que indica que el pH es el principal factor inhibitorio del jugo gástrico.

#### Tolerancia inducible al ácido en *Lactobacillus* sp.

50 Para determinar la supervivencia de las cepas en un pH bajo después del crecimiento en un medio vehicular tamponado, las cepas fueron cultivadas continuamente durante una semana en un pH de 7,0 y fueron luego exigidas en MRS con el pH ajustado a 2,0-3,5 utilizando HCl 1 N. Las cepas de *Lactobacillus* eran resistentes a los

valores de pH 3,5 y 3,0. En un pH menor, se observó una acusada disminución de la viabilidad celular. En un pH de 2,0, se registró una rápida disminución del número de células después de, por ejemplo, 1 hora de incubación, lo que dio como resultado que no se recuperaran el *Lactobacillus* sp. 118 ni otras ocho cepas (véase la Figura 3). Después de otra incubación de 1 hora, se recuperaron cinco cepas y éstas en niveles de aproximadamente  $10^5$  cfu/ml.

5 Se observó en este estudio que el crecimiento previo de las cepas de *Lactobacillus* en medio tamponado las volvía mucho más sensibles *in vitro* al pH bajo. No se recuperaron células viables después de 30-60 minutos de incubación en un pH de 2,0. Cuando se compara con la supervivencia de células cultivadas en medio no tamponado, resulta evidente que estas cepas poseen la capacidad para adaptarse a un ambiente de bajo pH después de un crecimiento previo en ambientes con pH de 4,0-4,5.

### 10 Ejemplo 3

Las cepas de *Lactobacillus* utilizadas se aislaron de la manera descrita en el Ejemplo 1.

#### Crecimiento de cultivos en presencia de bilis bovina y porcina

15 Se sembraron por estrías cultivos frescos en placas de agar MRS/TPY complementadas con bilis bovina (B-8381, Sigma Chemical Co., Ltd., Poole) en concentraciones de 0,3, 1,0, 1,5, 5,0 y 7,5% (peso/volumen) y bilis porcina (B-8631, Sigma Chemical Co., Ltd., Poole) en concentraciones de 0,3, 0,5, 1,0, 1,5, 5,0 y 7,5% (peso/volumen). Se incubaron las placas a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas y se registró el crecimiento después de 24-48 horas.

#### Crecimiento de cultivos en presencia de bilis humana

20 Antes de su uso, se guardaron a -80 °C muestras de bilis aisladas de diversas vesículas biliares humanas. Para el trabajo experimental, las muestras de bilis fueron descongeladas, reunidas y esterilizadas a 80 °C durante 10 minutos. La composición de ácidos biliares de la bilis humana fue determinada utilizando HPLC de fase inversa en combinación con un detector amperométrico pulsado, de acuerdo con el método de R. R. Dekker et al. (1991), *Chromatographia* 31 (11/12), 255-256. Se añadió la bilis humana al medio de agar MRS/TPY en una concentración de 0,3% (volumen/volumen). Después de 24 y 48 horas, se examinó el crecimiento de cultivos recién sembrados por estrías.

#### 25 Crecimiento en presencia de ácidos biliares conjugados y desconjugados individuales

30 La bilis de vesícula biliar humana posee una concentración de ácidos biliares de 50-100 mM, y la dilución en el intestino delgado reduce esta concentración a 5-10 mM [A. F. Hofmann et al. (1983), *J. Clin. Invest.* 71, 1003-1022). Además, bajo condiciones fisiológicas, los ácidos biliares se encuentran como sales sódicas. Por lo tanto, se exploraron los cultivos en cuanto al crecimiento en placas de agar MRS/TPY que contenían la sal sódica de cada uno de los ácidos biliares siguientes (Sigma Chemical Co., Ltd., Poole): (a) *forma conjugada*: ácido taurocólico (TCA), ácido glicocólico (GCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA) y ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA); (b) *forma desconjugada*: ácido litocólico (LCA), ácido quenodesoxicólico (CDCA), ácido desoxicólico (DCA) y ácido cólico (CA). Se usaron concentraciones de 1, 3 y 5 mM para cada ácido biliar. Se registró el crecimiento después de 24 y 48 horas de incubación anaeróbica.

#### 35 Detección de la actividad de desconjugación de ácidos biliares

Se utilizaron un ensayo cualitativo (placa de agar) y uno cuantitativo (HPLC) para determinar la actividad de desconjugación.

##### *Ensayo en placa*

40 Todos los cultivos se sembraron por estrías en placas de agar MRS/TPY complementadas con (a) bilis porcina al 0,3% (peso/volumen), (b) TDCA 3 mM o (c) GDCA 3 mM. La desconjugación se observó como un precipitado opaco que rodea las colonias [M. P. Dashkevich et al. (1989), *Appl. Env. Microbiol.* 55 (1), 11-16].

##### *Cromatografía de alta eficacia en fase líquida:*

45 El análisis de la desconjugación *in vitro* de bilis humana se llevó a cabo utilizando HPLC [R. R. Dekker et al., (1991), *supra*]. En resumen, se inocularon cultivos nocturnos (5%) a caldo MRS/TPY complementado con bilis humana al 0,3% (volumen/volumen) y se incubaron anaeróticamente a 37 °C. A diversos intervalos de tiempo a lo largo de un periodo de 24 horas, se tomaron muestras (1 ml) y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante exento de células, sin diluir (30 µl), fue luego analizado por HPLC.

#### Aislamiento de variantes de *Lactobacillus* con resistencia a ácidos biliares aumentada

50 Se inóculo una sola colonia de *Lactobacillus* a caldo MRS que contenía bilis porcina al 0,3% y se incubó durante la noche. El cultivo fue centrifugado a 14.000 rpm durante 7 minutos, lavado y resuspendido en disolución de Ringer de concentración un cuarto. Se sembraron por extensión 100 microlitros de una dilución  $10^{-3}$  en placas de agar MRS que consistían en un gradiente de 0,3 a 0,5% de bilis porcina. Se incubaron las placas durante 2 días a 37

5 °C. Se recogieron colonias aisladas del sector de agar que contenía bilis porcina al 0,5%, se resembraron por estrías sobre MRS complementado con bilis porcina al 0,5% y se incubaron durante la noche. Luego se resuspendieron varias colonias en disolución de Ringer de concentración un cuarto, se diluyeron hasta  $10^{-3}$  y se sembraron sobre placas de gradiente con concentraciones crecientes de bilis porcina (0,5/1,0%, 1,0/1,5%, 1,5/2,0%, 2,0/2,5% y 2,5/3,0%). Se llevaron a cabo ensayos de morfología de colonias, tinciones Gram, montajes en estado húmedo y catalasa sobre las colonias con resistencia aumentada.

Resistencia a la bilis (bovina, porcina y humana)

10 Las diecisiete cepas de *Lactobacillus* examinadas eran capaces de crecer (resistencia a ácidos biliares) en tres fuentes de bilis utilizadas. Se observó que la resistencia a la bilis bovina era mucho mayor que a la bilis porcina. Las cepas de *Lactobacillus* eran resistentes a concentraciones de bilis bovina de hasta 5,0% inclusive, y catorce de las diecisiete cepas crecieron en una concentración de 7,5%.

Como se muestra en la Tabla 3, la bilis porcina era más inhibitoria para todas las cepas.

Tabla 3

Crecimiento de un producto de aislamiento bacteriano en presencia de bilis porcina

Cepa	% de BILIS PORCINA (peso/volumen)						
	0,0	0,3	0,5	1,0	1,5	5,0	7,5
<i>Lactobacillus</i> sp.							
1	+	+	-	-	-	-	-
4333	+	+	-	-	-	-	-
43310	+	+	-	-	-	-	-
43321	+	+	-	-	-	-	-
43324	+	+	-	-	-	-	-
43332	+	+	+	+	+	-	-
43336	+	+	-	-	-	-	-
43338	+	+	-	-	-	-	-
43348	+	+	+	-	-	-	-
43361	+	+	+	+	+	+	-
43362	+	+	-	-	-	-	-
43364	+	+	-	-	-	-	-
118	+	+	+	+	-	-	-
4231	+	+	-	-	-	-	-
42319	+	+	+	+	+	+	+
42354	+	+	+	+	+	+	+
42361	+	+	+	+	+	+	+

- = sin crecimiento

+ = crecimiento confluyente

Concentraciones de 0,5% y superiores inhibían el crecimiento de diez de las diecisiete cepas de *Lactobacillus*, mientras que *Lactobacillus* sp. 42319, 42354 y 42361 crecían hasta confluencia en una concentración de 7,5%.

5 Independientemente de sus perfiles de resistencia a la bilis en presencia de bilis tanto bovina como porcina, las cepas de *Lactobacillus* crecieron hasta confluencia en la concentración fisiológica de la bilis humana, 0,3% (volumen/volumen).

Resistencia a ácidos biliares conjugados y desconjugados individuales

10 Las cepas de *Lactobacillus*, cuando fueron específicamente analizadas en cuanto a su resistencia a ácidos biliares individuales, crecieron bien en presencia de ácidos biliares conjugados con taurina, pero el crecimiento en presencia de ácidos biliares conjugados con glicocola fue variable. Los productos de aislamiento de *Lactobacillus* crecieron hasta confluencia en medio de agar que contenía los productos de conjugación de taurina TCA, TDCA y TCDCa en una concentración de hasta 5 mM inclusive. De los productos de conjugación de glicocola examinados, GCDCA fue el más inhibitorio, siendo capaces sólo cuatro de los *Lactobacillus* sp. de crecer en concentraciones de 3 mM y 5 mM. GDCA fue menos inhibitorio y GCA fue el menos inhibitorio de los tres productos de conjugación de glicocola, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Crecimiento de productos de aislamiento bacterianos en presencia de ácidos biliares conjugados con glicocola

Cepa	ÁCIDOS BILIARES (mM)											
	GCDCA				GDCA				GCA			
	0	1	3	5	0	1	3	5	0	1	3	5
<i>Lactobacillus</i> sp.												
1	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
4333	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
43310	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
43321	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
43324	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
43332	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
43336	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
43338	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
43348	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
43361	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43362	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
43364	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
118	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
4231	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
42319	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42354	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42361	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

---

En la Tabla 4:

– = sin crecimiento; + = crecimiento confluyente

GCDCA = ácido glicoquenodesoxicólico

GDCA = ácido glicodesoxicólico

GCA = ácido glicocólico

---

Todas las cepas crecieron en medio de agar complementado con GCA 5 mM; sin embargo, el crecimiento en GDCA fue variable.

5 También se examinó el crecimiento en presencia de ácidos biliares desconjugados. Todas las cepas eran resistentes a LCA en una concentración 5 mM. Quince de las diecisiete cepas de *Lactobacillus* examinadas crecieron en DCA en concentraciones de hasta 5 mM inclusive. Dos cepas, *Lactobacillus* sp. 1 y 43348, eran sensibles a DCA en baja concentración (1 mM). Como se muestra en la Tabla 5, el crecimiento en presencia de CA era variable.

Tabla 5

Crecimiento de productos de aislamiento bacterianos en presencia de ácido cólico (CA) no conjugado

CEPA	ÁCIDO CÓLICO (mM)			
	0	1	3	5
<i>Lactobacillus</i> sp.				
1	+	–	–	–
4333	+	–	–	–
43310	+	+	–	–
43321	+	–	–	–
43324	+	+	–	–
43332	+	+	–	–
43336	+	+	–	–
43338	+	+	+	+
43348	+	–	–	–
43361	+	+	+	+
43362	+	+	+	–
43364	+	+	+	+
118	+	+	+	–
4231	+	+	–	–
42319	+	+	+	+
42354	+	+	+	+
42361	+	+	+	+

– = sin crecimiento; + = crecimiento confluyente

10

Sólo ocho cepas de *Lactobacillus* eran capaces de crecer en CA en una concentración 3 mM. No se observó crecimiento de las diecisiete cepas en presencia de CDCA 1 mM.

Actividad de desconjugación de *Lactobacillus* sp.

En los estudios de crecimiento se observó que algunas de las cepas poseían actividad de desconjugación de sales biliares, y una investigación ulterior permitió identificar tres cepas de *Lactobacillus* (43361, 42319 y 42361), de las diecisiete, que eran capaces de desconjugar ácidos biliares. Esto se demostró en medio de agar complementado con bilis porcina al 0,3%, TDCA (3 mM) y GDCA (3 mM). En todos los casos, la desconjugación se manifestó como una zona opaca de ácido biliar desconjugado precipitado que rodeaba colonias activas [M. P. Dashkevich y S. D. Feighner (1989), Appl. Env. Microbiol. 55 (1), 11-16].

Se confirmó la actividad de desconjugación de ácidos biliares, observada en placas de agar, al usar bilis humana y un análisis de los productos de descomposición por HPLC. Sólo se detectaron ácidos biliares conjugados en la muestra de bilis.

Inducción de resistencia a ácidos biliares

Se ideó un método para el aislamiento de cepas de *Lactobacillus* con resistencia aumentada a ácidos biliares. Se escogieron dos cepas de *Lactobacillus* (4333 y 43310) que eran inicialmente incapaces de crecer en presencia de bilis porcina al 0,5% pero que podían crecer en una concentración de 0,3% (véase la Tabla 3 anterior). Después de un subcultivo continuo en presencia de bilis porcina en concentraciones crecientes (0,3% a 3,0%), la resistencia de las cepas 4333 y 43310 aumentó. Las cepas regularmente subcultivadas en agar MRS mantenían su resistencia inducida a la bilis cuando eran resembradas por estrías en agar MRS que contenía bilis porcina al 3,0%. Además, las cepas con resistencia inducida a la bilis eran posteriormente capaces de desconjugar bilis porcina.

Con bilis porcina en concentraciones crecientes, se observaron cambios en la morfología de las colonias con ambas cepas examinadas. Las colonias eran irregulares, de planas a prominentes, y aparecían grises y opacas en presencia de bilis. Sin embargo, cuando se resembraban por estrías sobre agar MRS, las colonias recuperaban su aspecto liso, cremoso, convexo y reluciente original (cuando se observaban bajo el microscopio, ambas variantes de colonia aparecían como bastones cortos, individualmente o en parejas). Después de un subcultivo prolongado en ausencia de bilis, ambas cepas aún desconjugaban y mantenían su resistencia a altos niveles de bilis porcina.

Ejemplo 4Crecimiento y mantenimiento de cultivos

Los microorganismos explorados en cuanto a producción antimicrobiana fueron las diecisiete cepas enumeradas en la Tabla 3 y se aislaron del tracto intestinal humano del modo descrito en el Ejemplo 1. Todas las cepas pertenecían a la colección de cultivos UCC.

Los cultivos se mantuvieron como reservas congeladas a -20 °C en el medio de crecimiento apropiado y glicerol al 40%. Los lactobacilos se cultivaron rutinariamente en medio de Mann Rogosa Sharpe (MRS) a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas rigurosas (BBL Gas Jars usando el sistema Merck Anaerocult A Gas Pak).

Los microorganismos indicadores usados en este Ejemplo, muchos de los cuales son cepas de tipo silvestre aisladas en el Mercy Hospital, Cork, Irlanda, se propagaron en el medio siguiente bajo las condiciones de crecimiento siguientes: especies de *Staphylococcus* (37°C, aeróbico), *Bacillus* (37°C, aeróbico), *Pseudomonas* (30°C, aeróbico), *Escherichia coli* (37°C, anaeróbico), *Salmonella* (37°C, anaeróbico) y *Listeria* (30°C, aeróbico) en agar/caldo triptona soja complementado con extracto de levadura al 0,6% (TSAYE, Oxoid), *Campylobacter* (37°C, anaeróbico), *Bacteroides* (37°C, anaeróbico), *Helicobacter* (37°C, anaeróbico), *Proteus* (37°C, anaeróbico), *Haemophilus* (37°C, anaeróbico) y *Pneumococcus* (37°C, anaeróbico) en medio de agar sangre, *Candida* (37°C, aeróbico) en medio YPD [levadura (1%), peptona (2%) y dextrosa (2%)], *Clostridium* (37°C, anaeróbico) en medio reforzado para *Clostridium* (RCM, Oxoid), *Lactococcus* (30°C, aeróbico) en medio M17 (Oxoid), *Streptococcus* (37°C, anaeróbico) en medio Todd Hewitt (Oxoid) y *Enterococcus* (37°C, anaeróbico) en medio infusión de cerebro y corazón (BHI, Merck). Todas las cepas se inocularon a medio de crecimiento fresco y se cultivaron durante la noche antes de ser usadas en los experimentos. Se prepararon agares agitados (cubrimientos) y placas de agar añadiendo agar al 0,7% (peso/volumen) y 1,5% (peso/volumen), respectivamente, al medio de caldo.

Detección de actividad antimicrobiana

Se detectó la actividad antimicrobiana de las cepas anteriores usando el método diferido [J. R. Tagg et al. (1976), Bacteriol. Rev. 40, 722-756]. Los indicadores utilizados en la exploración inicial fueron *L. innocua*, *L. fermentum* KLD, *P. fluorescens* y *E. coli* V517. En resumen, se incubaron los lactobacilos (MRS) durante 12-16 horas. Se sembraron por extensión diluciones sucesivas de diez órdenes de magnitud (100 µl) sobre medio de agar MRS. Después de una incubación nocturna, las placas con colonias evidentes fueron cubiertas con la bacteria indicadora. El césped indicador se preparó inoculando un 2% (volumen/volumen) de un cultivo indicador nocturno a una cubierta fundida, que fue vertida sobre la superficie de las placas MRS con inóculo. Las placas fueron reincubadas durante la noche bajo unas condiciones adecuadas para el crecimiento de la bacteria indicadora. Los cultivos indicadores con zonas de inhibición con un radio superior a 1 mm fueron considerados sensibles a la bacteria de ensayo.

Se repitió este procedimiento con la complementación de todos los medios de agar con tampón de  $\beta$ -glicerofosfato al 2% (Sigma Chemicals, Poole) y catalasa (100 unidades/ml; Sigma Chemicals, Poole), para eliminar la actividad antagonista debida a la producción de ácido y peróxido de hidrógeno, respectivamente. La inhibición debida a una actividad de bacteriófago fue excluida volteando las placas de agar MRS con inóculo y cubriendo con el indicador. El bacteriófago no se puede difundir a través del agar.

#### Detección de actividad antimicrobiana en el sobrenadante exento de células

Para determinar si la actividad antimicrobiana es de naturaleza secretora, se cultivaron lactobacilos (MRS) en caldo durante 12-16 horas, se esterilizaron por filtración (0,45  $\mu$ m) partes alícuotas del cultivo (500  $\mu$ l) y se examinó el sobrenadante exento de células en cuanto a actividad antimicrobiana contra las mismas cuatro cepas indicadoras. La actividad del sobrenadante exento de células fue determinada mediante una modificación del método de dilución crítica generalmente usado para el ensayo de bacteriocinas [A. Mayr-Harting et al. (1972), "Methods in Microbiology", Volumen 7A, 315-422]. Se salpicaron diluciones sucesivas (5  $\mu$ l) de dos órdenes de magnitud sobre céspedes recién sembrados de *L. innocua* y *L. fermentum* KLD y se incubaron apropiadamente las placas. El título fue definido como el valor recíproco de la mayor dilución de inductor que demostraba la inhibición completa del césped indicador, y se expresó como unidades de actividad (UA) por mililitro (ml).

#### Precipitación de la actividad antimicrobiana con sulfato amónico

Se incubaron las cepas 1 y 118 de *L. salivarius*, productoras de actividad antimicrobiana, en caldo MRS (800 ml) bajo condiciones anaeróbicas a 37 °C y se recolectaron las células en el momento de la máxima producción de actividad antimicrobiana (normalmente 6-8 horas con un inóculo del 3%). El sobrenadante fue tratado con sulfato amónico al 40% durante 1 hora a 4 °C con agitación constante, mantenido a 4 °C durante la noche y luego centrifugado a 13.000 g durante 30 minutos. Se combinaron el sedimento de centrifugación y la película (la capa de la parte superior del sobrenadante) y se disolvieron en 20 ml de tampón de fosfato, pH de 6,5. Las disoluciones fueron dializadas frente a 5 l de tampón de fosfato, pH de 6,5, durante 24 horas a 4 °C con 2-3 cambios de tampón. Las disoluciones fueron luego esterilizadas por filtración, examinadas en cuanto a actividad antimicrobiana y almacenadas a 4 °C. También se llevó a cabo la precipitación del sobrenadante exento de células a 70% y 100% con sulfato amónico para aumentar la actividad específica.

#### Espectros inhibitorios de huéspedes

Se determinaron los espectros inhibitorios de lactobacilos mediante el método de J. R. Tagg et al. (1976) del modo anteriormente descrito. También se examinaron el sobrenadante exento de células (CFS; del inglés, cell-free supernatant) y la disolución sometida a precipitación con sulfato amónico (APS; del inglés, ammonium sulphate precipitated solution) en cuanto a su actividad inhibitoria frente a una gran variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Se prepararon cubrimientos de cada indicador sobre placas de agar y se dejaron secar. Se pusieron gotas (5  $\mu$ l) de CFS y APS sobre las placas sembradas y se dejaron secar, y se incubaron las placas durante la noche. También se empleó el método de difusión en pocillos en agar para la inhibición de *Helicobacter*, *Proteus*, *Bacteroides* y *Campylobacter* sp. Las placas de agar fueron cubiertas o frotadas con el organismo indicador y dejadas secar. Se hicieron pocillos (4 mm) en las placas de agar, y se puso CFS (30-40  $\mu$ l) en los pocillos y se dejó que difundiera a través del agar durante 20-40 minutos a temperatura ambiental antes de una incubación durante 24-48 horas, después de las cuales se midieron las zonas inhibitorias.

#### Sensibilidad de agentes antimicrobianos a enzimas proteolíticas

Se examinaron partes alícuotas de CFS que contenía actividad antimicrobiana, procedente de cepas productoras individuales, en cuanto a su sensibilidad a enzimas proteolíticas. Se incubaron individualmente proteinasa K (50 mg/ml,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH de 7,5) y pronasa E (50 mg/ml,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH de 7,5) durante 1 hora a 37 °C con CFS en una relación 3:1. Se salpicaron (5  $\mu$ l) ambos CFS, el enzimáticamente tratado y el no tratado, sobre agar con cubiertas indicadoras recién sembradas y se incubó apropiadamente.

#### Producción de actividad antimicrobiana en bilis humana

Se salpicaron los cultivos 1 y 118 sobre placas de agar MRS tamponado que contenían bilis humana al 0,3% y se incubaron anaeróbicamente a 37 °C durante la noche. Se cubrieron con cepas indicadoras y se incubaron durante otras 12-18 horas. Las zonas de inhibición superiores a 1 mm fueron consideradas positivas.

#### Detección de actividad antimicrobiana

Se exploraron los diecisiete lactobacilos en cuanto a actividad inhibitoria usando *Ls. innocua*, *L. fermentum* KLD, *P. fluorescens* y *E. coli* como microorganismos indicadores. Cuando se inocularon las cepas de ensayo a MRS no tamponado, se observó la inhibición de los cuatro indicadores. Se midieron zonas cuyo tamaño variaba de 1 mm a 5 mm. La inhibición de *Ls. innocua* por los lactobacilos produjo las zonas más grandes.

La inhibición no fue debida al peróxido de hidrógeno ya que la incorporación de catalasa a las placas de MRS durante la exploración no afectó a la actividad antimicrobiana. Similarmente, se excluyó la actividad de bacterió-

fagos del modo anteriormente descrito. Cuando se inocularon los lactobacilos a MRS tamponado, se observó muy poca inhibición hacia los indicadores. Hubo dos excepciones, *L. salivarius* 1 y 118, que produjeron zonas de inhibición contra los indicadores sólo marginalmente más pequeñas que las producidas en el MRS no tamponado.

#### Caracterización de la actividad antimicrobiana

5 Se demostró que la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus* sp. 1 y 118 era secretada al sobrenadante exento de células después de 8 horas de crecimiento en caldo MRS, cuando se examinó sobre *Ls. innocua* y *B.coagulans* 1761. El CFS de 118 también presentaba inhibición hacia *P. fluorescens*, pero este indicador era menos sensible que los dos previos. No se observó inhibición de *E. coli* por ABP1 ni ABP118. Se midieron títulos de hasta 2000 UA/ml y 1000 UA/ml (al usar *Ls. innocua* y *L. fermentum* KLD, respectivamente). Se halló que las actividades inhibitorias de *L. salivarius* 1 y 118, ABP1 y ABP118, respectivamente, eran proteínicas ya que no se observó inhibición alguna de indicadores sensibles con el CFS tratado con proteasas. Esto indica que ambas cepas producen bacteriocinas.

#### Espectros inhibitorios de huéspedes

15 Se vio que los lactobacilos inhiben una gran variedad de microorganismos indicadores Gram positivos y Gram negativos en medios tanto tamponados como no tamponados. Se observó poca actividad inhibitoria hacia bacterias ácido-lácticas, tales como *Streptococcus* y otros lactobacilos. Los espectros inhibitorios de *L. salivarius* 1 y 118 eran bastante amplios. Se observó poca inhibición de bacterias ácido-lácticas; sin embargo, se visualizó claramente la inhibición de especies de *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Salmonella*, *E. coli*, *Pseudomonas* y *Listeria*. Esta inhibición también se produjo en presencia de bilis humana en concentraciones fisiológicas. También se examinaron el CFS y la APS de 1 y 118, ABP1 y ABP118, respectivamente, en cuanto a su actividad inhibitoria sobre una gran variedad de microorganismos, y resultaron muy activos contra diversas bacterias Gram positivas, siendo ABP118 también activo contra el microorganismo Gram negativo *Pseudomonas fluorescens*. Los CFS no fueron muy inhibitorios hacia otras bacterias ácido-lácticas relacionadas, tales como *Lactobacillus* y las especies de *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus*. Se vio actividad sobre *Enterococcus* sp. Más digna de mención es la inhibición de cepas de *Helicobacter pylori* y *S. aureus* resistente a metilina por ABP118 y ABP1, como se muestra en la Tabla 6.

25

Tabla 6

Espectros inhibitorios de ABP1 y ABP118, producidos por *L. salivarius* 1 y 118, respectivamente

Cepas indicadoras	ABP118	ABP1
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1	–	–
<i>L. salivarius</i> 118	–	–
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+
<i>E. faecium</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 1505	+	+
<i>St. aureus</i> 1551	+	+
<i>St. aureus</i> 1522	+	+
<i>St. aureus</i> 1963	+	+
<i>St. aureus</i> 2044	+/-	+/-
<i>St. aureus</i> 771	+	+
<i>St. aureus</i> 6511	–	+/-
<i>St. aureus</i> MH	+	–
<i>St. aureus</i> 148 (resistente a metilina)	+	–
<i>St. carnosus</i>	+	+

Tabla 6 (continuación)

Espectros inhibitorios de ABP1 y ABP118, producidos por *L. salivarius* 1 y 118, respectivamente

Cepas indicadoras	ABP118	ABP1
<i>Bacillus subtilis</i> DW	+	+
<i>B. cereus</i> DW	+	+
<i>B. cereus</i> NCDO 577	+	-
<i>B. thuringiensis</i> 1146	-	+
<i>B. megaterium</i> 1773	+	+
<i>B. coagulans</i> 1761	+	+
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> 1756	+/-	+/-
<i>C. tyrobutyricum</i> 885A	+/-	+/-
<i>C. tyrobutyricum</i> 1757	+/-	+/-
<i>C. tyrobutyricum</i> 1729	+/-	+/-
<i>C. butyricum</i> 7423	+/-	+/-
<i>Pneumococcus</i> sp. 788	+/-	+/-
<i>Pneumococcus</i> sp. 904	+/-	+/-
<i>Haemophilus</i> sp.	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-
<i>P. fragi</i>	+	-
<i>Escherichia coli</i> 1266	-	-
<i>E. coli</i> V517	-	-
<i>E. coli</i>	-	-
<i>Enterobacter</i> sp. 736	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	-	-
<i>S. typhimurium</i>	-	-
<i>S. enteritidis</i>	-	-
<i>Helicobacter pylori</i> Pu25	-	-

<i>H. pylori</i> Pu35	+	–
<i>H. pylori</i> Pu37	–	–
<i>Campylobacter</i> sp.	–	–
<i>Bacteroides</i> sp. 28644-1	+	nd
<i>Bacteroides</i> sp. 28644-2	+	nd

Tabla 6 (continuación)

Espectros inhibitorios de ABP1 y ABP118, producidos por  
*L. salivarius* 1 y 118, respectivamente

Cepas indicadoras	ABP118	ABP1
<i>Proteus</i> sp. 776	–	–
<i>Proteus</i> sp. 778	–	–
<i>Proteus</i> sp. 889	–	–
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+
<i>Ls. innocua</i>	+	+

En la Tabla 6:

+ = inhibición de cepas indicadoras

– = sin inhibición de cepas indicadoras

+/- = ligera inhibición de cepas indicadoras

nd = no determinado

### Ejemplo 5

#### Crecimiento y mantenimiento de cultivos

5 Se aisló *Lactobacillus salivarius* 118 del tracto intestinal humano y se identificó y cultivó, de la manera descrita en el Ejemplo 1.

10 Los microorganismos indicadores usados en este Ejemplo se propagaron en caldo triptona soja complementado con extracto de levadura al 0,6% (TSAYE, Oxoid) bajo las condiciones de crecimiento siguientes. *Bacillus* (37 °C, aeróbico), *Escherichia coli* (37 °C, anaeróbico), *Salmonella* (37 °C, anaeróbico) y *Listeria* (30 °C, aeróbico). Se inocularon todas las cepas a medio de crecimiento fresco y se cultivaron durante la noche antes de ser usadas en experimentos. Se prepararon agares aguados (cubrimientos) y placas de agar añadiendo agar al 0,7% (peso/volumen) y 1,5% (peso/volumen), respectivamente, al medio de caldo.

#### Detección de actividad antimicrobiana

15 Se cultivó *L. salivarius* 118 durante 12-16 horas en caldo MRS y se centrifugó el cultivo a 14.000 g durante 10 minutos. Se salpicó (5-10 µl) el sobrenadante exento de células (CFS) sobre céspedes recién sembrados de *Listeria innocua* y *Bacillus coagulans* 1761. Se midieron las zonas de inhibición.

Se examinó la actividad del CFS mediante una modificación del método de dilución crítica generalmente usado para el examen de bacteriocinas [Mayr-Harting et al. (1972), supra]. Se salpicaron diluciones sucesivas (5

μl) sobre céspedes recién sembrados de *Ls. innocua* y *B. coagulans* 1761 y se incubaron apropiadamente las placas. El título fue definido como el valor recíproco de la mayor dilución de inhibidor que demuestra la inhibición completa del césped indicador, y se expresó como unidades de actividad (UA) por mililitro (ml).

#### Precipitación del sobrenadante exento de células que contiene ABP118, con sulfato amónico

5 Se cultivó *L. salivarius* 118 en caldo (800 ml) bajo condiciones anaeróbicas a 37 °C y se recolectaron las células después de una incubación de 6-8 horas. El sobrenadante fue concentrado utilizando sulfato amónico al 40% durante 1 hora a 4 °C con agitación constante, mantenido a 4 °C durante la noche y luego centrifugado a 13.000 g durante 30 minutos. Se recogieron el sedimento de centrifugación y la película (la capa de la parte superior del sobrenadante) y se disolvieron en un pequeño volumen de tampón de fosfato, pH de 6,5. Las disoluciones fueron dializadas frente a 5 l de tampón de fosfato, pH de 6,5, durante 24 horas a 4 °C con 2-3 cambios de tampón. Las disoluciones fueron luego esterilizadas por filtración, examinadas en cuanto a actividad antimicrobiana y almacenadas a 4 °C. Esto se utilizó en los experimentos siguientes a menos que se afirme otra cosa.

#### Factores que influyen en el crecimiento de *L. salivarius* 118 y la producción de ABP118

pH

15 Se cultivó *L. salivarius* 118 durante la noche en caldo MRS (50 ml) a 37 °C y luego se inoculó (2%) a caldo MRS (1,5 l) en un recipiente de fermentación (Modelo 502D; L.H. Fermentation, Stoke Poges, Bucks) que estaba conectado a un controlador automático del pH, a 37 °C, con agitación suave (200 rpm) y barrido continuo de CO<sub>2</sub> al 5%. Se impusieron las condiciones de pH siguientes en cuatro experimentos diferentes: (1) pH de 5,5; (2) pH de 5,0; (3) pH de 4,5; y (4) pH de 4,0, y se mantuvo el pH durante el experimento utilizando una disolución de hidróxido amónico al 8%. A intervalos regulares, se registraron el pH, la DO<sub>600</sub>, las cuentas bacterianas (cfu/ml) y la actividad antimicrobiana (UA/ml) a lo largo de un periodo de 24 horas.

Medio de crecimiento

25 Se examinaron diversos medios de laboratorio en cuanto a su capacidad para sostener tanto el crecimiento de *L. salivarius* 118 como la producción de ABP118. Aquellos incluían MRS, infusión de cerebro y corazón (BHI), GM 17 y caldo triptona soja complementado con extracto de levadura al 0,6% (TSBYE). También se evaluaron los efectos de la eliminación de componentes de medios del caldo MRS sobre el crecimiento y la producción antimicrobiana. Los ingredientes eliminados incluían a) Tween 80, b) peptona, c) extracto de levadura, d) extracto de vacuno, e) Tween 80 y extracto de vacuno, y f) Tween 80, extracto de vacuno y peptona.

30 También se controlaron el crecimiento y la producción antimicrobiana en leche desnatada al 13,5%, leche desnatada al 13,5% complementada con extracto de levadura al 0,6%, leche desnatada al 13,5% complementada con glucosa al 2%, y leche desnatada al 13,5% complementada con glucosa al 2% y extracto de levadura al 0,6%, y en caldo MRS complementado con bilis humana al 0,3% (obtenida de vesícula biliar humana y esterilizada a 80 °C durante 10 minutos). A intervalos regulares, se registraron el pH, la DO<sub>600</sub>, las cuentas bacterianas y la actividad antimicrobiana. Todas las curvas de crecimiento se obtuvieron a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas.

#### Estabilidad de ABP118 frente al pH y la temperatura

35 Se examinó ABP118 en cuanto a su estabilidad en condiciones tanto alcalinas como ácidas. El pH del CFS activo fue ajustado a un valor de 1 a 10 usando NaOH y HCl 1 N. Se esterilizaron las disoluciones por filtración y, después de una incubación durante 1 hora a temperatura ambiental, se calculó la actividad antes y después del ajuste utilizando *Ls. innocua* como indicador. Luego se reajustó a 7 el pH de las disoluciones con pH ajustado, utilizando NaOH y HCl 1 N, y se incubaron de nuevo las disoluciones durante 1 hora a temperatura ambiental y se examinaron en cuanto a UA/ml. Los testigos usados eran caldo MRS con el pH ajustado a los mismos valores.

40 Para determinar la estabilidad de ABP118 frente a la temperatura, se incubaron partes alícuotas (10 ml) a diversas temperaturas durante diferentes periodos de tiempo y se calculó la actividad antes y después de la incubación, utilizando el indicador *Ls. innocua*.

#### Sensibilidad de ABP118 a las acciones de enzimas, detergentes y disolventes orgánicos

45 Para determinar la naturaleza y estabilidad de la actividad antimicrobiana, se incubó ABP118 con las enzimas siguientes (en una relación de 3 a 1) durante 30-60 minutos y se examinó en cuanto a actividad antimicrobiana: proteinasa K (50 mg/ml, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH de 7,5), pronasa E (50 mg/ml, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH de 7,5), tripsina (50 mg/ml, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 67 mM, pH de 7,6), α-quimotripsina (50 mg/ml, Tris 80 mM, pH de 7,8), α-amilasa (50 mg/ml, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH de 6,9), lipasa exenta de proteasas (50 mg/ml), ficina ( KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH de 7,0), catalasa (50.000 U/ml de dH<sub>2</sub>O), lisozima (10 mg/ml, Tris-HCl 25 mM, pH de 8,0), fosfatasa alcalina (Tris-HCl 80 mM, pH de 8,0), pepsina (HCl 10 mM), fosfolipasa C (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH de 7,0) y papaína (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH de 7,0). Se salpicaron partes alícuotas (5 μl) de cada una de estas disoluciones sobre placas ya sembradas con *Ls. innocua* y *B. coagulans* 1761. Los testigos incluían tampón y enzima, y ABP118.

5 También se trató ABP118 con diversos disolventes y detergentes durante 1-2 horas a 37 °C. Los disolventes usados fueron β-mercaptoetanol al 5%, cloroformo al 10%, acetona al 10%, isopropanol al 10%, etanol al 25%, acetonitrilo al 50%, butanol al 10% y diclorometano al 50%. Los detergentes usados incluían Tween 80 (1%), Tween 20 (1%), Triton X-100 (1%), N-laurilsarcosina (1%) y SDS (0,1% y 1%). Después de la incubación, las disoluciones fueron dializadas, secadas bajo vacío o liofilizadas, y examinadas en cuanto a actividad.

#### Actividad enzimática de ABP118.

10 Se aplicó ABP118 al sistema ZYM (BioMeriux, Francia), que se usa para examinar la actividad enzimática constitutiva (véase el anterior Ejemplo 1). Para examinar las actividades hemolítica y proteolítica, se salpicó ABP 118 (10 μl) sobre placas de agar sangre y agar leche desnatada, respectivamente. Se registraron las reacciones después de incubaciones de 24 horas y 48 horas a 37 °C.

#### Determinación del tamaño molecular de ABP118 por ultrafiltración

15 Se estimó el tamaño de ABP118 a partir del sobrenadante exento de células (CFS) y la disolución sometida a precipitación con sulfato amónico (APS; véase el anterior Ejemplo 4) de un cultivo de *L. salivarius* 118. Se ultrafiltraron partes alícuotas a través de diversas membranas (Amicon Inc., Massachusetts, EE.UU.) que incluían tamaños de exclusión molecular de 100, 30, 10 y 3 kDa. Se determinó la actividad bacteriocina en las fracciones retenidas y filtradas.

#### Aislamiento de variantes deficientes en la producción de ABP118

20 Caldo MRS (100 ml) al que se había inoculado (2%) *L. salivarius* 118 fue incubado a temperaturas por encima de la que permitía el crecimiento óptimo (40 °C, 42 °C y 45 °C). Después de 36-48 horas de crecimiento, los caldos fueron sucesivamente diluidos y sembrados por extensión (100 μl) sobre agar MRS. Luego se duplicaron las colonias en agar MRS y agar MRS complementado con tampón de β-glicerofosfato al 2%. Se cubrieron las placas con indicador sensible (*B. coagulans* 1761), y se sembraron colonias no inhibitoras por estrías para pureza y se almacenaron en glicerol al 40% a -20 °C. Se registraron las velocidades de crecimiento de las cepas y los perfiles de fermentación de hidratos de carbono (API 50CHL) y se compararon con los de *L. salivarius* 118 de tipo silvestre.

#### 25 Estudios de cocultivo

30 Se estudió el crecimiento asociativo de *L. salivarius* 118 y *Salmonella* (*S. typhimurium* y *S. enteritidis*) en medio MRS modificado (sin acetato sódico). Se inocularon cepas indicadoras y productoras en una relación 1:1. Como testigo, también se cultivaron individualmente cepas en el mismo medio. Los medios que habían sido inoculados fueron incubados anaeróbicamente a 37 °C. Se tomaron muestras a intervalos regulares para determinar el crecimiento celular (cfu/ml). Se utilizaron los medios *Salmonella*-*Shigella* (Oxoid) y MRS (Oxoid) para la enumeración selectiva de *Salmonella* y *Lactobacillus*, respectivamente. Se usó agar triptona soja complementado con extracto de levadura al 0,6% (TSAYE) para obtener las cuentas de placa totales. También se cocultivó *Salmonella*, 1:1, con una variante no productora de ABP118 del *L. salivarius* 118 de tipo silvestre.

#### Naturaleza del compuesto antimicrobiano ABP118

35 El inhibidor ABP118 es de naturaleza proteica y es neutralizado por enzimas proteasas tales como pronasa E, tripsina y pepsina, como se muestra en las Tablas 7 y 8, y es además activamente secretado al sobrenadante.

Tabla 7

Sensibilidad de ABP118 a enzimas proteolíticas y no proteolíticas

Pronasa E	+
Proteinasa K	+
Tripsina	+
α-quimotripsina	+
Ficina	+
Papaína	+
Pepsina	+
Lipasa (exenta de proteasas)	-

Catalasa	–
Fosfatasa alcalina	–
Fosfolipasa C	–
Lipoproteína lipasa	–

+ = ABP118 es sensible al tratamiento enzimático

– = ABP118 es resistente al tratamiento enzimático

Tabla 8

Efecto del tratamiento con proteasa sobre la actividad de ABP118

Tratamiento	Actividad de ABP118 (UA/ml)
ABP118 (sin tratamiento)	2000
ABP118 + proteinasa K a 37°C x 30 min	0
ABP118 a 100°C x 15 min	2000
ABP118 + [proteinasa K a 100°C x 15 min] a 37°C x 30 min	2000
[ABP118 + proteinasa K] a 100°C x 15 min	2000
{[ABP118 + proteinasa K] a 37°C x 30 min} a 100°C x 15 min	0

5 La proteasa eliminó la actividad antimicrobiana, que fue irrecuperable después de la inactivación de la proteasa. No parece que ABP118 tenga un componente lipídico basándose en el hecho de que la lipasa no ejerció efecto alguno sobre la actividad (véase la Tabla 7). El compuesto era activo en el intervalo 1-10 de pHs, no observándose reducción de actividad (frente a *Ls. innocua*). Es una proteína térmicamente estable que conserva el 100% de actividad durante al menos 1 hora a 100 °C y con una pérdida de sólo 50% después de un tratamiento térmico intenso en auto-clave, como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9

Perfil de estabilidad de ABP118 frente a la temperatura

Tratamiento	Actividad de ABP118 (UA/ml)	% de reducción de la actividad de ABP118
Sin tratamiento	2000	0
121 °C x 15 min	1000	50
100 °C x 1 h	2000	0
100 °C x 2 h	500	75
63 °C x 30 min	2000	0
60 °C x 1 h	2000	0
60 °C x 2 h	2000	0
37 °C x 1 semana	500	75
30 °C x 1 semana	1000	50

15 °C x 1 semana	2000	0
4 °C x 4 meses	2000	0

El inhibidor ABP118 era también muy estable cuando se almacenaba a 4 °C durante 4 meses, sin pérdida alguna de actividad. El tratamiento del compuesto con diversos disolventes orgánicos y detergentes no dio lugar a una actividad disminuida, como se muestra en la Tabla 10.

5

Tabla 10

Estabilidad de ABP118 en disolventes orgánicos y detergentes	
Tratamiento	Actividad de ABP118 (UA/ml)
Sin tratamiento	2000
Disolventes orgánicos	
Cloroformo (10%)	2000
Acetona (10%)	2000
Isopropanol (10%)	2000
Etanol (25%)	2000
Acetonitrilo (50%)	2000
Butanol (10%)	2000
Diclorometano (50%)	2000
β-mercaptoetanol (5%)	2000
Detergentes	
Tween 80 (marca comercial) (1%)	2000
Tween 20 (marca comercial) (1%)	2000
Triton X (marca comercial) - 100 (1%)	2000
N-laurilsarcosina (1%)	2000
SDS (0,1%)	2000
SDS (1,0%)	1500

10 Cuando se salpicó ABP118 sobre agar leche desnatada, no se observó proteólisis a lo largo de un periodo de incubación de 24 horas a 37 °C o a temperatura ambiental. Las reacciones en agar sangre (conejo y caballo) fueron menos concluyentes. Aunque se registraron pequeñas zonas de lisis, también se observaron pequeñas zonas de lisis cuando se salpicó caldo MRS concentrado sobre las placas de agar sangre. El kit ZYM, que permite examinar una gran variedad de actividad enzimática, incluyendo las actividades esterasa y lipasa, no reveló actividad enzimática evidente para ABP118. La ultrafiltración del sobrenadante de cultivo y el ABP118 parcialmente purificado mostró que la mayoría de la actividad estaba presente en el producto de retención con la membrana de corte de 100 kDa y toda la actividad quedaba retenida sobre la membrana de corte de 30 kDa.

15

Cinética de la producción de ABP118

La producción de ABP118 era dependiente de la fase de crecimiento. En la Figura 4 se ilustra la cinética de crecimiento y producción antimicrobiana por *L. salivarius* 118. La producción de ABP118 era máxima durante la fase logarítmica, con una reducción de la concentración de ABP118 durante la fase estacionaria. Se halló la máxima concentración de actividad de ABP118 cuando se controló el pH en un valor de 5,5, produciéndose hasta 4000 UA/ml después de 3-4 horas, cuando la biomasa era bastante elevada. En un pH de 4,0, se redujo el crecimiento del cultivo y no se detectó ABP118. Estos estudios indican que sólo se produce ABP118 por células en crecimiento, y no por células en no crecimiento.

De los cuatro medios de laboratorio examinados, MRS y BHI eran los dos más adecuados para sostener la producción de grandes concentraciones de ABP118. Para determinar si un medio menos complejo aún sostendría la producción de ABP118, se examinó el efecto de Tween 80, extracto de levadura y fuentes de peptona. Los resultados muestran que, en ausencia de cualquiera de estos, la concentración de ABP118 sólo alcanza el 50% de la concentración producida en caldo MRS. Sin embargo, la actividad de ABP118 permanecía más estable en el medio que carecía de extracto de levadura que en cualquier otro medio examinado.

Se investigó la capacidad de un medio basado en leche desnatada para actuar como un vehículo adecuado para sostener el crecimiento de *L. salivarius* 118 y la producción de ABP118. El crecimiento en leche desnatada, leche desnatada más extracto de levadura, y leche desnatada más glucosa fue bastante escaso. El pH no bajó de 5,7 después de 12 horas de incubación y se detectó poca actividad de ABP118, si acaso había alguna. Sin embargo, cuando se cultivó *L. salivarius* 118 en leche desnatada más extracto de levadura más glucosa, el pH alcanzó un valor de 4,4 y 3,87 después de 12 y 24 horas de incubación, respectivamente. Se detectó actividad de ABP118 en bajos niveles después de 2 horas, y la mayoría del ABP118 (10.000 UA/ml frente a *B. coagulans* 1761) se produjo en la fase de crecimiento de logarítmica tardía a estacionaria temprana. También se observó que la leche empezaba a coagular después de 10 horas de incubación.

La velocidad de crecimiento de *L. salivarius* 118 en bilis humana al 0,3% era equivalente a la velocidad de crecimiento en caldo MRS. Sin embargo, sólo se produjo un tercio de la concentración de ABP118.

Ejemplo 6Detección de actividad antimicrobiana

## Ensayo de manchas

Se cultivó *L. salivarius* 118 en caldo MRS y se centrifugó el cultivo a 14.000 g durante 10 minutos. Se salpicó (5-10 µl) el sobrenadante exento de células (CFS) sobre céspedes de indicador recién sembrados, se incubó y se registraron las zonas de inhibición. Se examinó la actividad del sobrenadante exento de células mediante una modificación del método de dilución crítica generalmente utilizado para el ensayo de bacteriocinas [Mayr-Harting et al. (1972), *supra*]. Se salpicaron diluciones sucesivas (5 µl) sobre céspedes recién sembrados de *Es. innocua*, *B. coagulans* 1761 y *L. fermentum* KLD y se incubaron apropiadamente las placas. El título fue definido como el valor recíproco de la mayor dilución de inhibidor que demostraba la inhibición completa del césped indicador, y se expresó como unidades de actividad (UA) por mililitro (ml).

## Ensayo en placas para microtitulación

Durante el procedimiento de purificación, se midió la actividad bacteriocina mediante el ensayo en placas para microtitulación, de la manera descrita por H. Holo et al. (1991), J. Bacteriol. 173, 3879-3887. Se prepararon diluciones sucesivas de dos órdenes de magnitud de extractos de bacteriocina (50 µl) en caldo TSAYE, en placas para microtitulación (Greiner GmbH, Frickenhausen). Se añadieron ciento cincuenta microlitros de cultivo indicador fresco ( $A_{600} \sim 0,1$ ) y 50 µl de TSAYE y se incubaron las placas a 37 °C. El crecimiento de la cepa indicadora se midió espectrofotométricamente a 600 nm. Se definió una unidad de bacteriocina como la cantidad de bacteriocina que causa una inhibición del crecimiento del 50% (50% de la turbidez del cultivo testigo sin bacteriocina) en este ensayo.

Purificación de bacteriocinas

## Precipitación con sulfato amónico

Se cultivó *L. salivarius* 118 hasta la fase logarítmica tardía en 2 l de caldo MRS (Oxoid) y se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos. Se añadió sulfato amónico (300 g/l) al sobrenadante exento de células, se agitó a 4 °C durante 1 hora y se centrifugó a 8000 rpm durante 30 minutos. Se combinaron el sedimento de centrifugación y la película (material sólido flotante) y se disolvieron en 100 ml de H<sub>2</sub>O (Fracción I).

## Cromatografía de interacción hidrófoba

Se mezcló la Fracción I con 10 g de Amberlite XAD-16 (Supelco) durante 30-45 minutos, se aplicó la mezcla a una columna y se lavó una vez con H<sub>2</sub>O (100 ml) y luego dos veces con etanol al 40% (100 ml). La bacteriocina

na fue eluida de la columna con 100 ml (10 × 10 ml) de isopropanol al 70%-HCl 10 mM (Fracción II).

#### Cromatografía de intercambio catiónico

5 Se ajustó el pH de la Fracción II a 2-3 con H<sub>2</sub>O + ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% y se aplicó inmediatamente la fracción a una columna de intercambio catiónico S-Sepharose Fast Flow de 2 ml de capacidad, previamente equilibrada con tampón de fosfato sódico 5 mM, pH de 5,4 (tampón A). Después del subsiguiente lavado con 40 ml de tampón A, la bacteriocina fue eluida con 20 ml de NaCl 1 M en tampón A (Fracción III).

#### FPLC en fase inversa C<sub>2</sub>/C<sub>18</sub>

10 Se aplicó la Fracción III a una columna para cromatografía de resolución rápida en fase líquida para proteínas (FPLC; del inglés, *fast protein liquid chromatography*), en fase inversa C<sub>2</sub>/C<sub>18</sub> (cromatografía preparativa en fase inversa), equilibrada con isopropanol que contenía TFA al 0,1%, disolución A. La bacteriocina fue eluida con un gradiente lineal de disolución A que variaba de 30 a 37% durante 40 minutos, lo que fue seguido de un gradiente de disolución A al 37-100% durante otros 5 minutos. El caudal fue 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 1 ml. Cada fracción fue examinada en cuanto a actividad usando el ensayo en placa para microtitulación. Se mezclaron las fracciones con alta actividad bacteriocina y se sometieron de nuevo a cromatografía en la columna de fase inversa.

#### 15 Análisis de la composición y secuencia de aminoácidos

20 La bacteriocina purificada fue hidrolizada y analizada en un analizador de aminoácidos del modo previamente descrito [E. M. Fykse et al. (1988), *Biochem. J.* 256, 973-980]. Se obtuvo la secuencia de aminoácidos por degradación de Edman con un secuenciador automático de Applied Biosystems, modelo 477A, conectado con un analizador 120A de feniltiohidantoína-aminoácido [G. G. Cornwell et al. (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154, 648-653]. La parte C-terminal de la secuencia se obtuvo después de la escisión de la bacteriocina con bromuro de cianógeno (CnBr) [K. Sletten et al. (1974), *Eur. J. Biochem.* 41, 117-125].

#### Modo de acción de ABP118

##### Ensayos de adsorción

25 Se investigó la capacidad de ABP118 para ser adsorbido por la pared celular de cepas sensibles y resistentes. En resumen, cada uno de tres cultivos nocturnos de *Ls. innocua*, *L. salivarius* UCC 118, *L. fermentum* KLD, *E. coli* 1266 y *B. coagulans* 1761 fue subcultivado en caldo fresco (20 ml) y desarrollado hasta la fase logarítmica media. Las células fueron recolectadas por centrifugación, lavadas dos veces en tampón de fosfato sódico 50 mM, pH de 6,5, y resuspendidas en tampones de pH 4,0, 6,0 y 8,0 que contenían 2000 UA/ml de ABP118. Se incubaron las mezclas a 37 °C durante 2 horas. Luego se separaron las células por centrifugación y se determinó el título antimicrobiano del sobrenadante. Los testigos incluían la incubación de 2000 UA/ml de ABP118 sin células y con células sin ABP118 añadido.

#### 30 Acción bactericida frente a bacteriostática de ABP118

35 Se cultivaron duplicados de *Ls. innocua*, *L. fermentum* KLD y *B. coagulans* 1761 hasta la fase logarítmica (DO<sub>600</sub> de 0,2-0,5). A un grupo de células se añadieron 5000 UA/ml de ABP118. El segundo grupo de células fue lavado dos veces y resuspendido en tampón de fosfato, pH de 6,5, antes de la adición de 5000 UA/ml de ABP118. Se controló el crecimiento (cfu/ml) bajo las condiciones apropiadas durante otras 7-8 horas. Se repitió este experimento usando células en fase estacionaria.

#### Efecto de ABP118 sobre la síntesis de DNA, RNA y proteínas de células sensibles

40 Se inoculó el indicador sensible *B. coagulans* 1761 [3% (volumen/volumen)] a medio de crecimiento TSAYE y se cultivó hasta la fase logarítmica temprana (3-4 horas) a 37 °C. Se dividió el cultivo en dos. Se añadieron 5000 UA/ml de compuesto antimicrobiano a una mitad, mientras que se añadió un volumen equivalente de medio de crecimiento a la otra mitad. Luego se complementó cada mitad con un sustrato radiomarcado. Se usaron los siguientes sustratos (New England Nuclear Corps.): [5,6-<sup>3</sup>H]uridina (1,465·10<sup>12</sup> Bq/milimol) en 1,85·10<sup>5</sup> Bq/ml, metil[<sup>3</sup>H]timidina (2,479·10<sup>11</sup> Bq/milimol) en 1,85·10<sup>5</sup> Bq/ml, y L-[<sup>35</sup>S]metionina (4,348·10<sup>13</sup> Bq/milimol) en 1,85·10<sup>5</sup> Bq/ml. A intervalos regulares, se tomaron muestras de los cultivos y se añadió medio de crecimiento (pH de 5,8). Cada muestra fue luego complementada con ácido tricloroacético (TCA) al 15%, mezclada bien e incubada sobre hielo durante 18 horas. Las muestras fueron luego filtradas a través de filtros de fibra de vidrio y lavadas con TCA al 5% y secadas. Los filtros se pusieron en viales para centelleo con líquido de centelleo Beckman Ecolite y se sometieron a recuento en un contador Beckman de centelleo en estado líquido.

#### Purificación de ABP118

50 El ABP118 de los medios de cultivo, que se produce en la fase logarítmica de crecimiento (véase el Ejemplo 5), fue concentrado por un factor de 20 mediante precipitación con sulfato amónico (Fracción I) para dar lugar a un aumento de actividad específica de 292 órdenes de magnitud con una recuperación de 250%, como se muestra en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11

Purificación de ABP118

Etapa de purificación	Volumen (ml)	A <sub>280</sub> total*	Act. total (UB)
Sobrenadante de cultivo	2000	54.800	5.120.000
Fracción			
I. Precipitación con sulfato amónico	100	470	12.800.000
II. Interacción hidrófoba (XAD-16)	15	51	192.000
III. Intercambio catiónico	20	5,98	6400
IV. FPLC en fase inversa C <sub>2</sub> /C <sub>18</sub>	1,5	0,192	2400

\* A<sub>280</sub> total es igual a la densidad óptica a 280 nm multiplicada por el volumen en ml

Tabla 12

Purificación de ABP118

Etapa de purificación	Activ. espec.*	Factor de aumento de activ. espec.	Rendimiento (%)
Sobrenadante de cultivo	93	1	100
Fracción			
I. Precipitación con sulfato amónico	27.234	292	250
II. Interacción hidrófoba (XAD-16)	3765	40	3,75
III. Intercambio catiónico	1070	12	0,13
IV. FPLC en fase inversa C <sub>2</sub> /C <sub>18</sub>	12.500	135	0,047

\* La actividad específica es el número de unidades de bacteriocina (UB) dividido por la densidad óptica a 280 nm

5

10

Después del paso a través de la columna hidrófoba XAD-16, hubo una drástica pérdida de actividad específica con un rendimiento de 3,75% (Tabla 12, Fracción II). La operación de purificación final que da lugar a ABP118 puro fue una cromatografía en fase inversa. El pico activo, recogido como una fracción, fue eluido en isopropanol con una concentración de 100%. Cuando se volvió a aplicar este pico a la columna, el pico activo puro fue eluido en isopropanol al 31,5%. La actividad específica del ABP118 puro era 135 veces mayor que la del sobrenadante del cultivo, y la recuperación final fue 0,047% (Tabla 12, Fracción IV). El paso a través de una columna de intercambio catiónico antes de la FPLC disminuyó la actividad específica (Tabla 12, Fracción III) pero dio lugar a una mejor purificación. Se estimó que la concentración final de proteína era 130 µg/ml.

15

#### Análisis de la composición y secuencia de aminoácidos

Se determinó la composición de aminoácidos del ABP118 puro, como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13

Composición de aminoácidos de ABP118

Aminoácido	Restos/moléculas
Asp/Asn	4
Glu/Gln	2
Ser	1-2
Gly	8-10
His	0-1
Arg	2
Thr	2
Ala*	6
Pro*	4
Met*	1
Cys	1
Ile*	1
Leu*	5
Phe*	2
Lys	2
Val	2
Total	43-47
* Aminoácidos hidrófobos	

5 No se detectaron aminoácidos inusuales. Se encontró una elevada proporción de glicocola, alanina y leucina. No estaban presentes restos de triptófano ni tirosina. Tras la degradación de Edman, el extremo N resultó bloqueado. Como estaba presente un resto de metionina, se llevó a cabo una escisión con bromuro de cianógeno y se determinaron cinco restos de aminoácido en el extremo N o adyacentes a él: -Lys-Arg-Gly-Pro-Asn- C (ID. SEC. nº 1). De los 43-47 aminoácidos, veintiuno eran hidrófobos. La capacidad para experimentar escisión por bromuro de cianógeno es indicativa de la presencia del resto de metionina aguas arriba del resto de lisina en el extremo N.

#### 10 Modo de acción de ABP118

ABP118 es adsorbido por células sensibles

Se examinó la adsorción de ABP118 a lo largo del intervalo de pHs de 4,0-8,0. Se observó que ABP118 se unía a las células sensibles examinadas (véase la Tabla 14) pero no a la cepa productora resistente *L. salivarius* UCC118.

Tabla 14

Adsorción de ABP118 (1600 UA/ml) por células sensibles y resistentes bajo diferentes condiciones de pH*			
Cepa	ABP118 (UA/ml) no adsorbido		
	pH de 4,0	pH de 6,0	pH de 8,0
<i>Lactobacillus fermentum</i> KLD (S)	1000 (40%)	800 (50%)	800 (50%)
<i>L. salivarius</i> UCC 118 (R)	1600 (0%)	1600 (0%)	1600 (0%)
<i>Escherichia coli</i> 1266 (R)	1600 (0%)	1600 (0%)	800 (50%)
<i>Bacillus coagulans</i> 1761 (S)	1000 (40%)	1000 (40%)	1000 (40%)
<i>Listeria innocua</i> (S)	1000 (40%)	1000 (40%)	1000 (40%)

\* Las cifras representan ABP118 no adsorbido, con el % de adsorción entre paréntesis; S = cepa sensible a ABP118; R = cepa resistente a ABP118

Se observó la unión de ABP118 a *E. coli* 1266 en un pH de 8,0 pero no en los valores de pH menores examinados. Después de 2 h de incubación a 37 °C, se midió un 40% de adsorción de ABP118 por células sensibles. Nunca se observó la adsorción total de 100%. Se halló menos adsorción cuando se repitió el experimento a 4 °C. Cuando las células fueron tratadas en autoclave, se registró un 40% de adsorción por las células tanto sensibles como resistentes. Cuando las células fueron tratadas con proteasa, hubo poco aumento de adsorción por células sensibles y resistentes.

ABP118 posee actividad tanto bactericida como bacteriostática

El inhibidor ABP118 es de naturaleza bactericida. El ejemplo más impresionante de esto fue el efecto que ejercía ABP118 sobre el crecimiento de *B. coagulans* 1761 durante la fase de crecimiento tanto logarítmica como estacionaria (sobre células tanto lavadas como no lavadas; véanse las Figuras 5A – 5D). El caldo se aclaró durante el primer par de horas después de la adición de ABP118, lo que demuestra la actividad lítica de ABP118. La actividad bactericida hacia *Ls. innocua* y *L. fermentum* KLD fue más evidente en la fase logarítmica de crecimiento que en la fase estacionaria. Se advirtió que tenía lugar una rápida disminución de la viabilidad celular de la cepa KLD después de la incubación de células en fase estacionaria durante 4 horas tras la adición de ABP118. También se examinó la actividad de ABP118 (5000 UA/ml) sobre una cepa de *P. fluorescens* Gram negativa y una cepa de *S. aureus* resistente a meticilina. Después de 60-90 minutos de incubación, resultó claramente evidente un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de ambas cepas (Figuras 6 y 7). Después de 1 h de incubación a 30/37 °C, las células se dividieron en dos, se añadió ABP118 a una porción (flechas) y se controló el crecimiento durante otras 8-9 horas. La línea  $\blacklozenge\blacklozenge$  ilustra el efecto bacteriostático de ABP118.

ABP118 inhibe la síntesis de DNA y RNA

La adición de 5000 UA/ml de ABP118 a células en fase logarítmica no dio lugar a la incorporación de timidina ni uridina, lo que indica que hubo inhibición de la síntesis de las macromoléculas DNA y RNA, respectivamente. Cuando no se añadió bacteriocina, las células incorporaron activamente timidina y uridina. No se demostró la inhibición de la síntesis proteica a causa de la baja incorporación de aminoácido radiomarcado tanto en el ensayo como en el testigo (probablemente como resultado de la elevada concentración de aminoácidos libres normalmente presentes en el medio TSAYE). Los resultados se muestran en la Figura 8A y la Figura 8B.

#### Ejemplo 7

##### Análisis de la composición y secuencia de aminoácidos de ABP1

Con objeto de determinar la composición de aminoácidos del ABP1 puro, se repitió el procedimiento seguido en el Ejemplo 6 para obtener la composición de aminoácidos de ABP118. La composición de aminoácidos se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15

## Composición de aminoácidos de ABP1

Aminoácido	Restos/moléculas
Asp/Asn	5
Glu/Gln	6
Ser	5-6
Gly	8-9
His	1
Arg	2-3
Thr	2
Ala*	4-5
Pro*	2
Ile*	1-2
Leu*	3
Phe*	1
Lys	3
Tyr	1
Val*	2-3
Total	46-52
* Aminoácidos hidrófobos	

5 Como para ABP118, no se detectaron aminoácidos inusuales. Se halló una elevada proporción de glicocola y alanina y una proporción relativamente elevada de leucina. No se encontró triptófano; sin embargo, se hallaron tirosina y valina. De los 46-52 aminoácidos, 13-16 eran hidrófobos.

Ejemplo 8Secuencia de ABP118

10 Se aisló el DNA genómico total de UCC118 cultivado en MRS complementado con DL-treonina 40 mM, mediante el método de Leenhouts et al., 1991, (J. Bacteriol. 173: 4794-4798), y se purificó por centrifugación en gradiente de densidades de flotación de CsCl-bromuro de etidio, con las modificaciones siguientes. Tras recoger las células como sedimento de centrifugación y lavarlas en tampón STE, pH de 8,0 (sacarosa al 6,7%, Tris 50 mM/HCl, EDTA 1 mM), las células nuevamente recogidas como sedimento de centrifugación fueron almacenadas a -20 °C durante la noche. Las células fueron lisadas usando 8 mg/ml de lisozima y 50 U/ml de mutanolisina sobre hielo durante 1 h y fueron luego incubadas a 37 °C durante 45 minutos. Antes de añadir la disolución de SDS, se añadieron 2 mg/ml de proteínasa K y se incubó a 55 °C durante 1 hora.

20 El DNA genómico total de UCC118 fue digerido con la endonucleasa de restricción BamHI de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim). Se sintetizaron cebadores oligonucleotídicos en un sintetizador de DNA Beckman Oligo 1000M. Un fragmento que incluía el supuesto gen estructural de ABP118 fue multiplicado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction) usando la polimerasa BIOTAQ™ (Bioline) y fue posteriormente purificado en un gel de agarosa usando el kit de extracción en gel Qiaex II (Qiagen). Se llevó a cabo la clonación en el sistema vector pGEM-T (Promega), lo que fue seguido de la transformación de células competentes de *E. coli* JM109. Los posibles recombinantes de pGEM-T fueron identificados por exploración azul-blanco usando isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido (X-gal). La presencia de

insertos fue confirmada por PCR usando los cebadores de secuenciación de pGEM-T diseñados para las conocidas secuencias de los promotores de T7 y SP6. Estos fragmentos multiplicados por PCR fueron secuenciados mediante el secuenciador automatizado de DNA 373 Stretch XL (PE Applied Biosystems) usando el kit de reacción listo para secuenciación cíclica por terminador colorante con la DNA polimerasa Ampli Taq, FS (Applied Biosystems).

5 Después de la escisión con bromuro de cianógeno y la subsiguiente secuenciación, se obtuvo una secuencia de 30 aminoácidos de la región C-terminal de ABP118, incluyendo 1 aminoácido que no pudo ser identificado, como se indica a continuación.

Asn Met Lys Arg Gly Pro Asn ? Val\* Gly Asn Phe\* Leu Gly\* Gly Leu Phe Ala Gly Ala\* Ala\* Ala\* Gly Val  
Pro Leu\* Gly Pro-(Ala-Gly-Ile)-Cys (ID. SEC. nº 3).

10 \* indica la probabilidad de más de una especie de aminoácido en las posiciones 8, 11, 13, 19, 20, 21 y  
25.

? indica aminoácido no identificado.

() indica la posibilidad de una secuencia errónea.

15 Esta secuencia fue confirmada mediante una PCR con DNA total restringido con BamHI, utilizando cebadores degenerados, diseñándose los cebadores directos (5'ATGAAACGNGGNCCNAAC3') (ID. SEC. nº 4) para los seis primeros aminoácidos N-terminales conocidos, mientras que se diseñó el cebador inverso (5'GGGCCTRNGGNACNCC3') (ID. SEC. nº 5) para los aminoácidos 21 a 26, siendo R = purina. Se aisló un fragmento de 80 bp y se secuenció posteriormente como se indica a continuación,

20 5'ATGAAACGCGGACCCAACTGTGTAGGTAAGTCTTAGGTGGTCTATTTGCTGGAGCAGCTGCAGGT  
GTCCCCAAGGGCCC3'

(ID. SEC. nº 6)

Se descontó esta secuencia de DNA para obtener la secuencia proteica siguiente, confirmándose así la identidad de los aminoácidos de las posiciones 7, 8, 11, 13, 19, 20, 21 y 25 en la secuencia original.

25 Asn Met Lys Arg Gly Pro Asn Cys Val Gly Asn Phe Leu Gly Gly Leu Phe Ala Gly Ala Ala Ala Gly Val  
Pro Gln Gly Pro Cys (ID. SEC. nº 2).

La secuencia de DNA no mostró homología alguna con secuencias conocidas de los bancos de datos.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

(i) SOLICITANTE

- 5 (A) NOMBRE: FORBAIRT (en el comercio como BioResearch Ireland)
- (B) CALLE: Glasnevin
- (C) CIUDAD: Dublín 9
- (E) PAÍS: Irlanda
- (F) CÓDIGO POSTAL: ninguno
- (G) TELÉFONO: +353-1-8370177
- 10 (H) TELEFAX: +353-1-8370176
- (A) NOMBRE: UNIVERSITY COLEGE CORK
- (B) CALLE: College Road
- (C) CIUDAD: Cork
- (E) PAÍS: Irlanda
- 15 (F) CÓDIGO POSTAL: ninguno
- (A) NOMBRE: COLLINS, John Kevin
- (B) CALLE: Spur Hill
- (C) CIUDAD: Doughcloyne, County Cork
- (E) PAÍS: Irlanda
- 20 (F) CÓDIGO POSTAL: ninguno
- (A) NOMBRE: O'SULLIVAN, Gerald Christopher
- (B) CALLE: Ballinveltig, Curraheen Road, Bishopstown
- (C) CIUDAD: Cork
- (E) PAÍS: Irlanda
- 25 (F) CÓDIGO POSTAL: ninguno
- (A) NOMBRE: THORNTON, Geraldine Mary
- (B) CALLE: Ballymah
- (C) CIUDAD: Waterfall, County Cork
- (E) PAÍS: Irlanda
- 30 (F) CÓDIGO POSTAL: ninguno
- (A) NOMBRE: O'SULLIVAN, Marian Mary Geraldine
- (B) CALLE: 126 Castle Farm
- (C) CIUDAD: Shankill, County Dublin
- (E) PAÍS: Irlanda
- 35 (F) CÓDIGO POSTAL: ninguno

(ii) TÍTULO DEL INVENTO: Cepas probióticas de *Lactobacillus salivarius* y agentes antimicrobianos obtenidos de ellas

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 6

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR

(A) TIPO DE MEDIO: disquete

(B) ORDENADOR: compatible con PC IBM

5

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn emisión nº 1.0, versión nº 1.30 (EPO)

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

10

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 1:

**Lys Arg Gly Pro Asn**  
1 5

15

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 29 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

20

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 2:

**Asn Met Lys Arg Gly Pro Asn Cys Val Gly Asn Phe Leu Gly Gly Leu**  
1 5 10 15

**Phe Ala Gly Ala Ala Ala Gly Val Pro Gln Gly Pro Cys**  
20 25

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

25

(A) LONGITUD: 32 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 3:

**Asn Met Lys Arg Gly Pro Asn Xaa Val Gly Asn Phe Leu Gly Gly Leu**  
1 5 10 15

**Phe Ala Gly Ala Ala Ala Gly Val Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ile Cys**  
20 25 30

30

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

5

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 4:

ATGAAACGNG GNCNAAC 18

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 5:

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 16 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 5:

GGCCTRNGG NACNCC 16

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 80 pares de bases

20

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 6:

**ATGAAACGCG GACCCAAC TG TAGGTAAC TTCTTAGGTG GTCTATTTGC TGGAGCAGCT 60**

**GCAGGTGTCC CCCAGGGCCC 80**

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un cultivo biológicamente puro de una cepa de *Lactobacillus salivarius* aislada de tracto gastrointestinal humano resecado y lavado y que es adherente para el mismo, que inhibe una amplia variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos y que secreta un producto que tiene actividad antimicrobiana a un sobrenadante exento de células, actividad que es producida sólo por células en crecimiento y que es destruida por proteinasa K y pronasa E, cepa cuyas propiedades inhibitorias y productos secretores se mantienen en presencia de concentraciones fisiológicas de bilis humana y jugo gástrico humano, cepa que presenta un amplio espectro de actividad sobre bacterias, incluyendo *Listeria*, *Staphylococcus* y *Bacillus*, pero que no inhibe a muchos lactobacilos íntimamente relacionados.
- 10 2. Un cultivo biológicamente puro de la cepa UCC 1 de *Lactobacillus salivarius* (NCIMB 40830) o de un mutante o variante de la misma que tiene las mismas propiedades.
3. Un cultivo biológicamente puro de la cepa UCC 118 de *Lactobacillus salivarius* (NCIMB 40829) o de un mutante o variante de la misma que tiene las mismas propiedades.
4. Un producto promotor de la salud, que contiene una cepa de *Lactobacillus salivarius* de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-3 como probiótico.
- 15 5. Una fracción purificada de un agente antimicrobiano obtenible de una cepa de *Lactobacillus salivarius* de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, que tiene las propiedades siguientes:
- (i) un peso molecular de 5,0 – 5,3 kDa;
  - (ii) una composición relativa de aminoácidos que tiene más de 45% de aminoácidos hidrófobos, 19-21% de glicocola, 13-14% de alanina y 11-12% de leucina, nada de triptófano ni tirosina, una metionina y cuatro restos de prolina;
  - 20 (iii) una secuencia de aminoácidos ID. SEC. nº 1 en, o adyacente a, el extremo N; y
  - (iv) comprende una secuencia de aminoácidos ID. SEC. nº 2.
6. Una fracción purificada de acuerdo con la Reivindicación 5, para uso en productos alimenticios.
7. Una fracción purificada de acuerdo con la Reivindicación 5, para uso como medicamento.
- 25 8. Una fracción purificada de acuerdo con la Reivindicación 5, para uso contra *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA).
9. La secuencia de DNA ID. SEC. nº 6 que codifica la bacteriocina ABP118.

Fig. 1

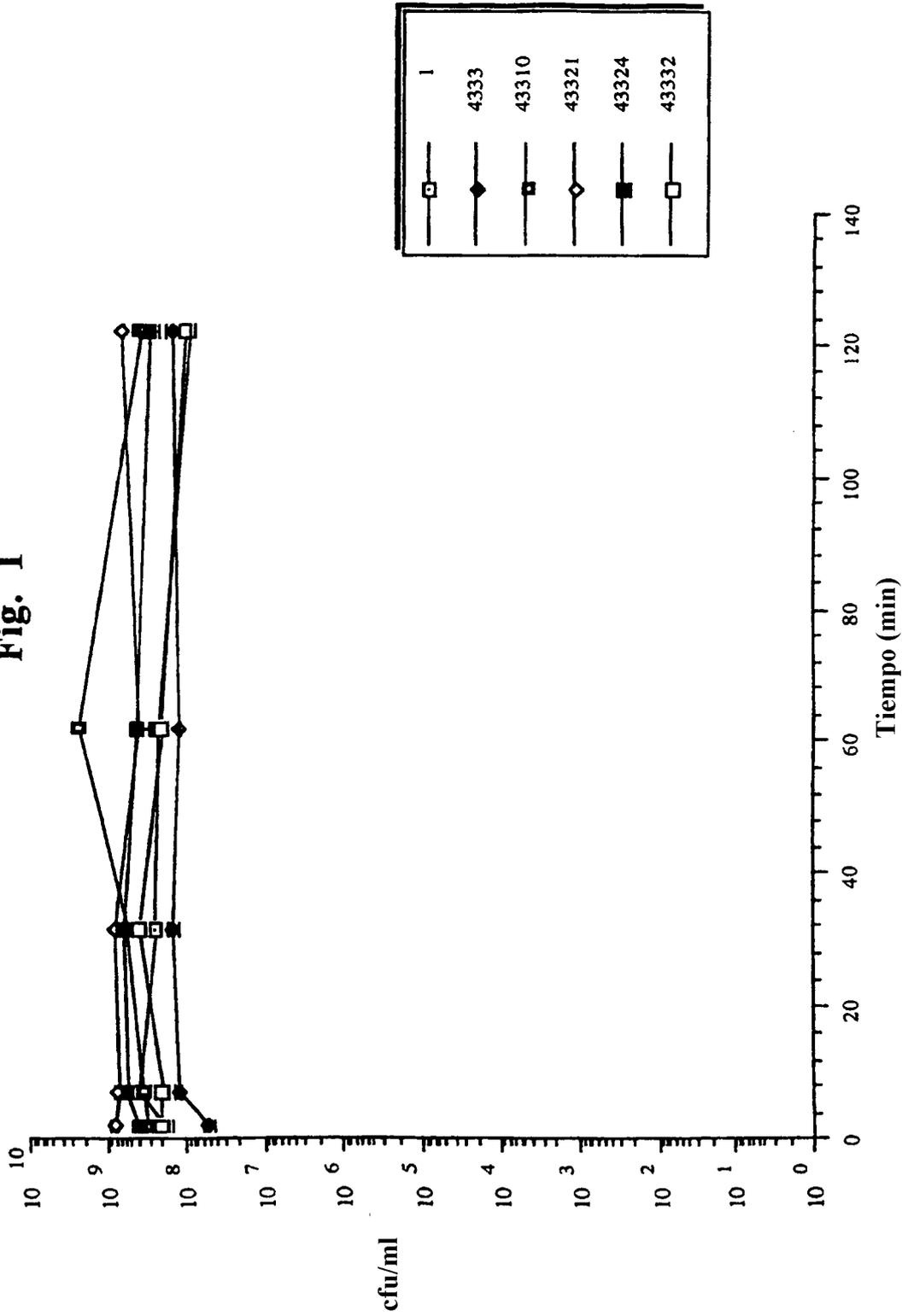


Fig. 2

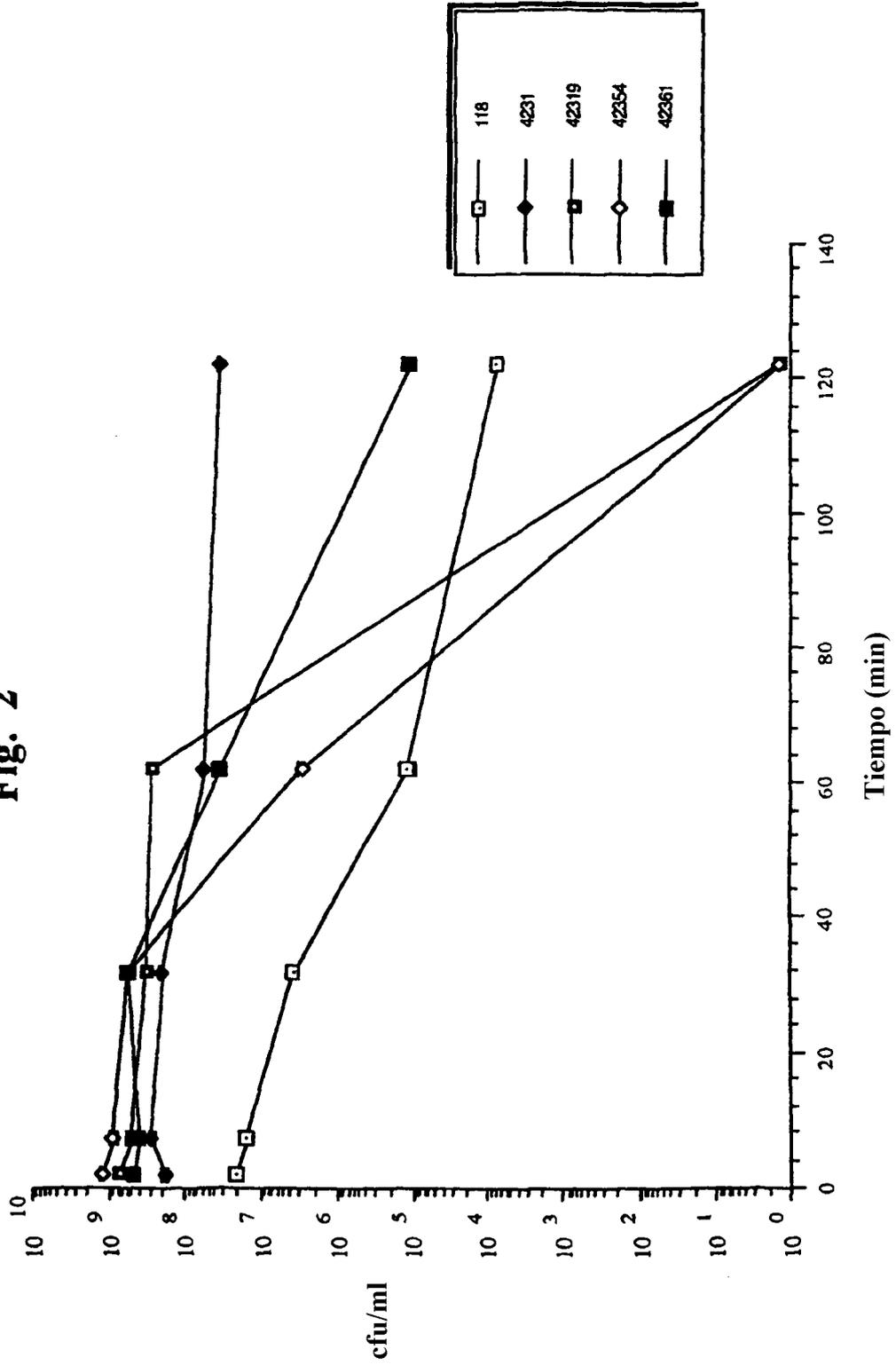


Fig. 3

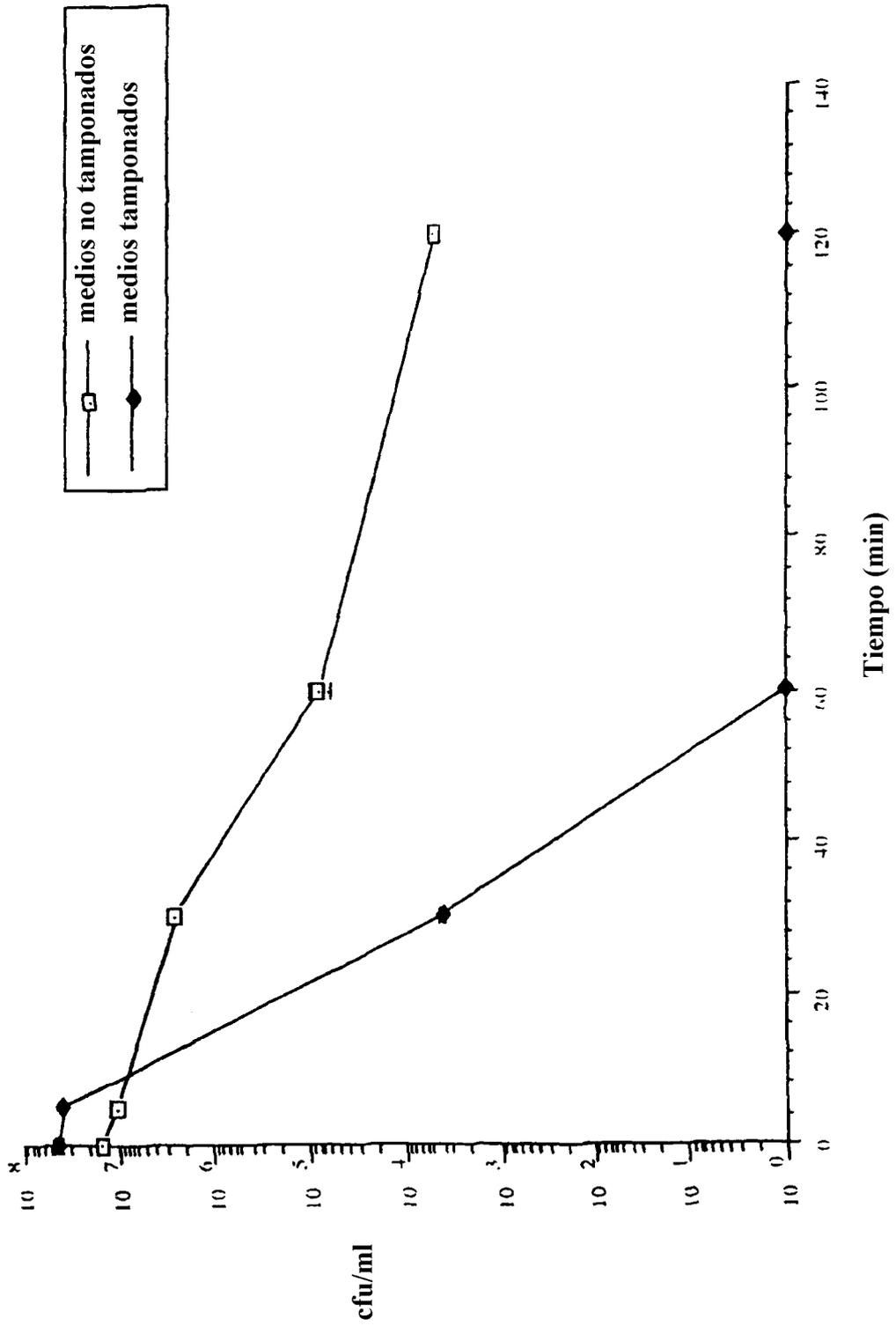
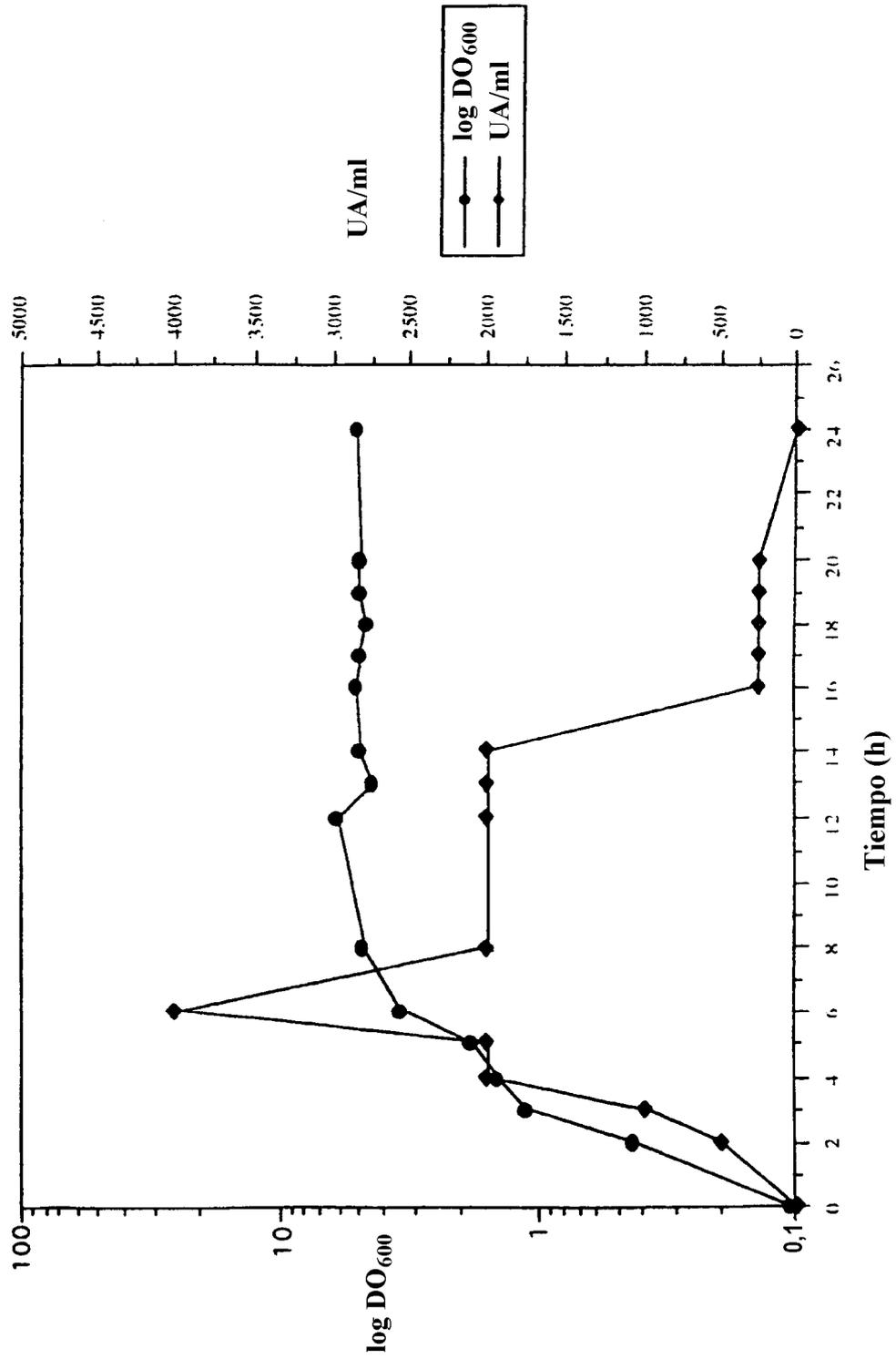
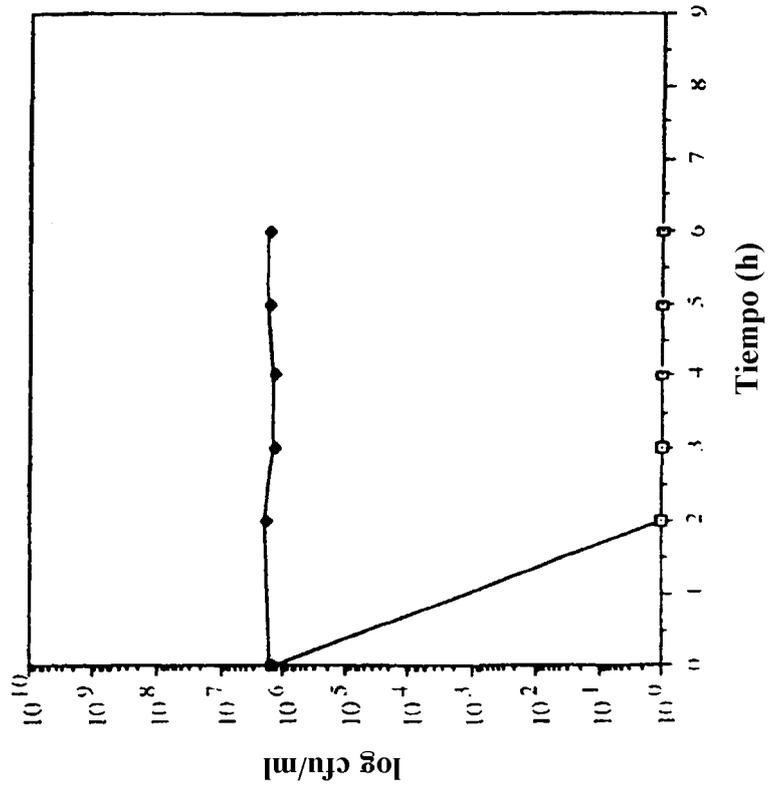
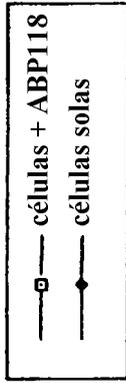


Fig. 4



**Fig. 5B**



**Fig. 5A**

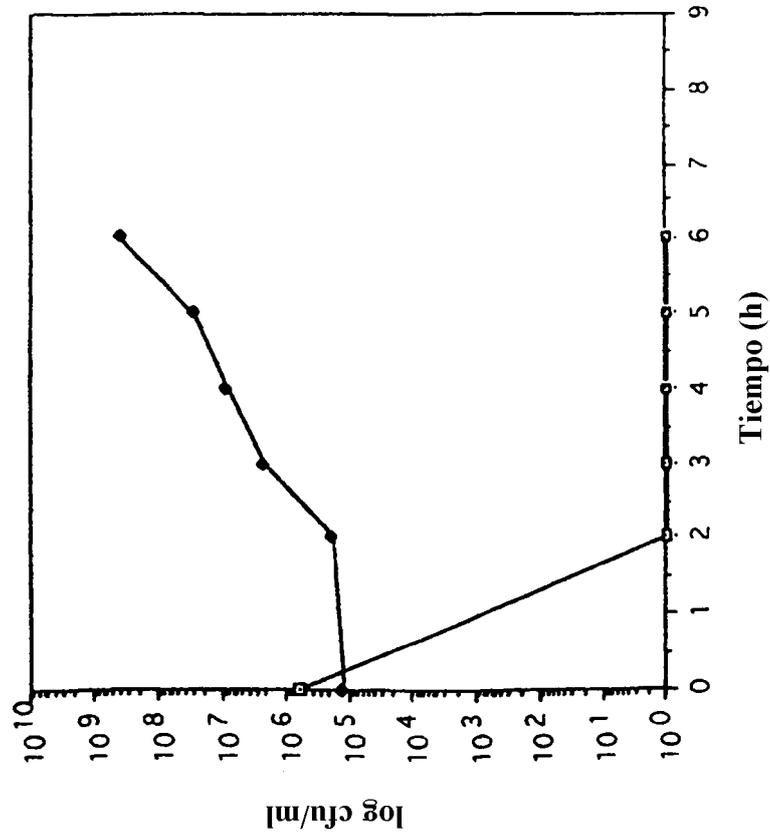


Fig. 5D

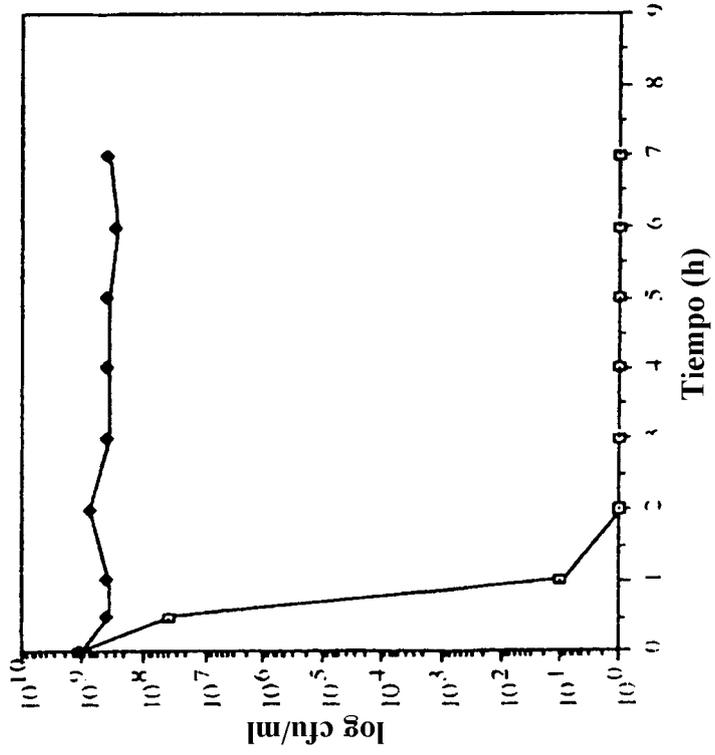


Fig. 5C

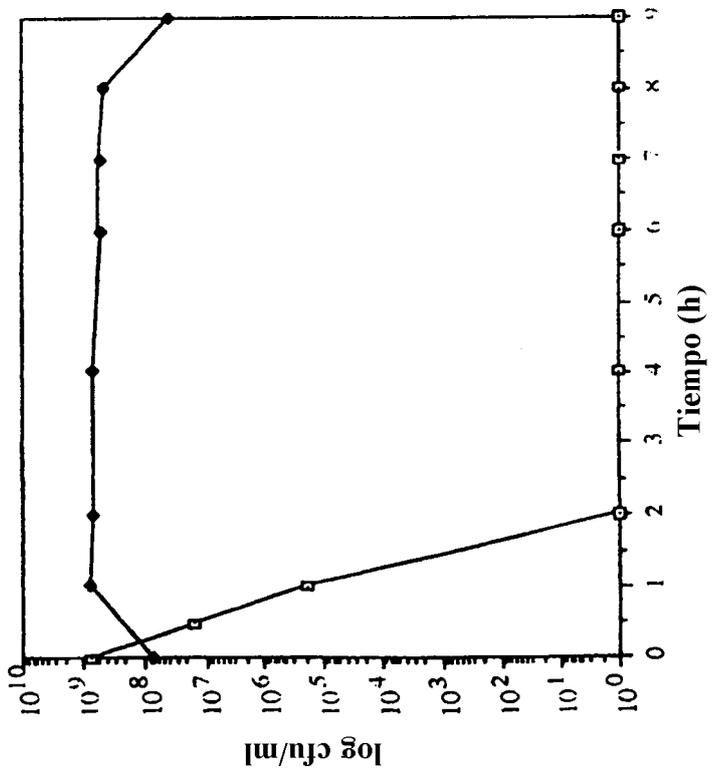


Fig. 6

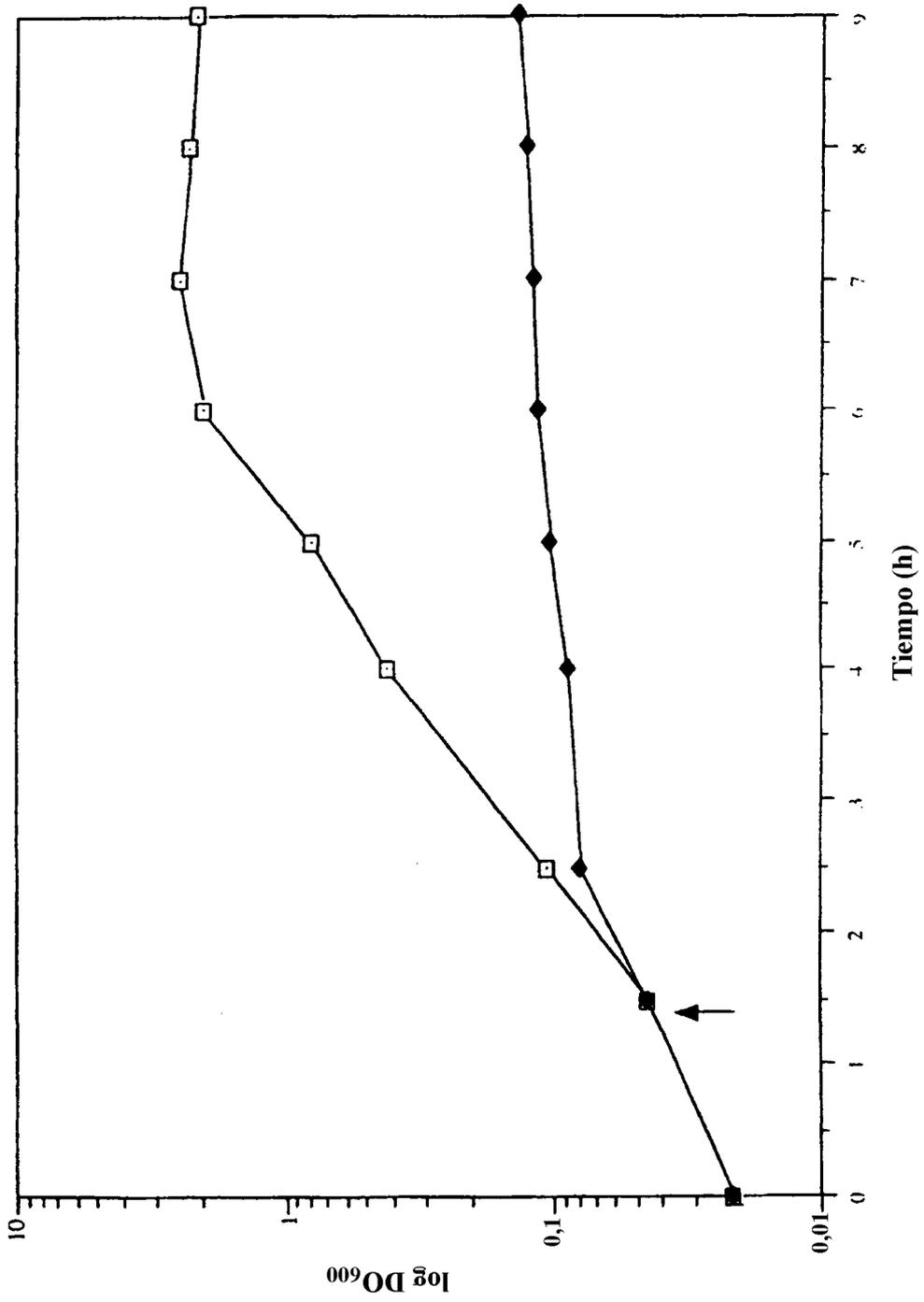
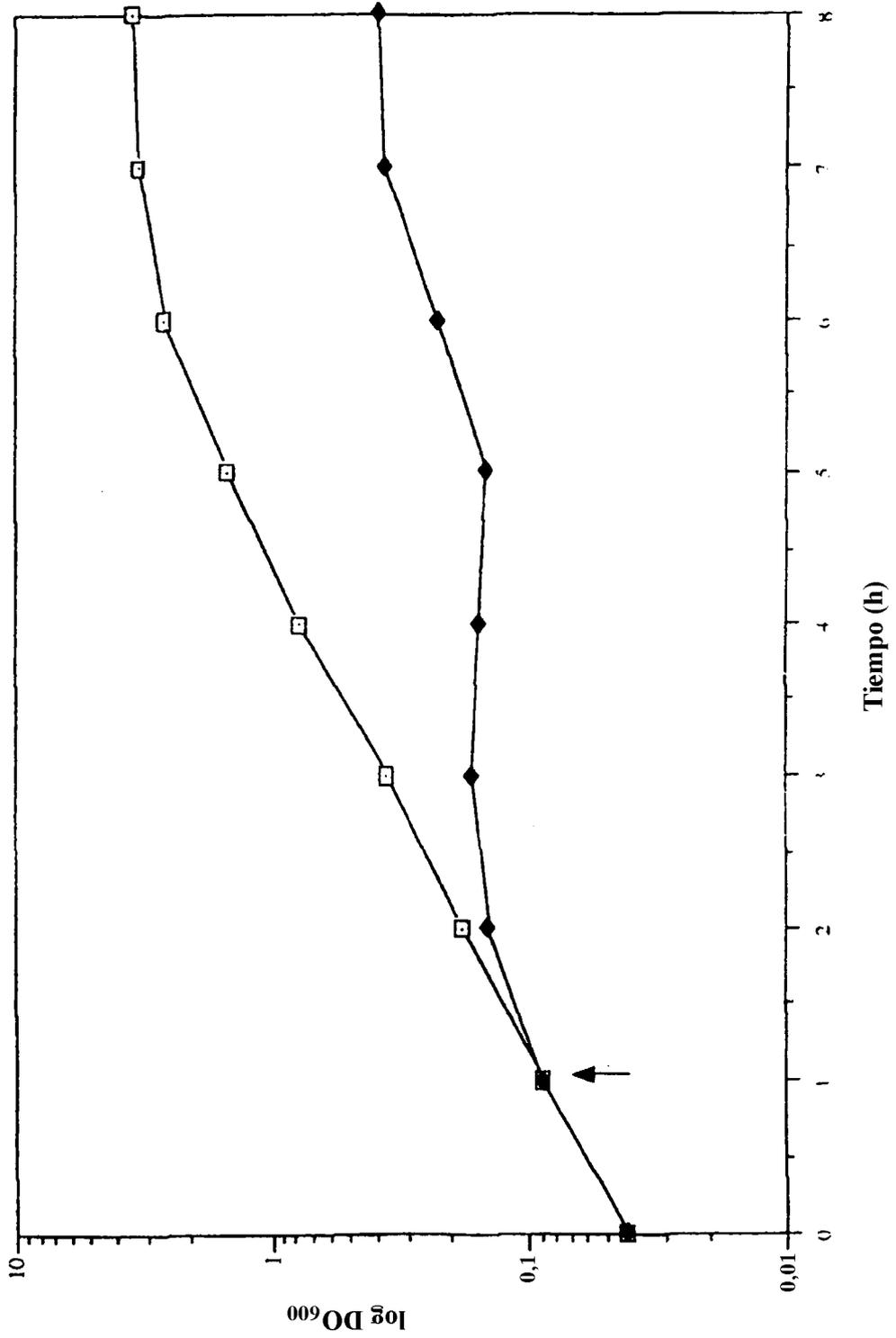


Fig. 7



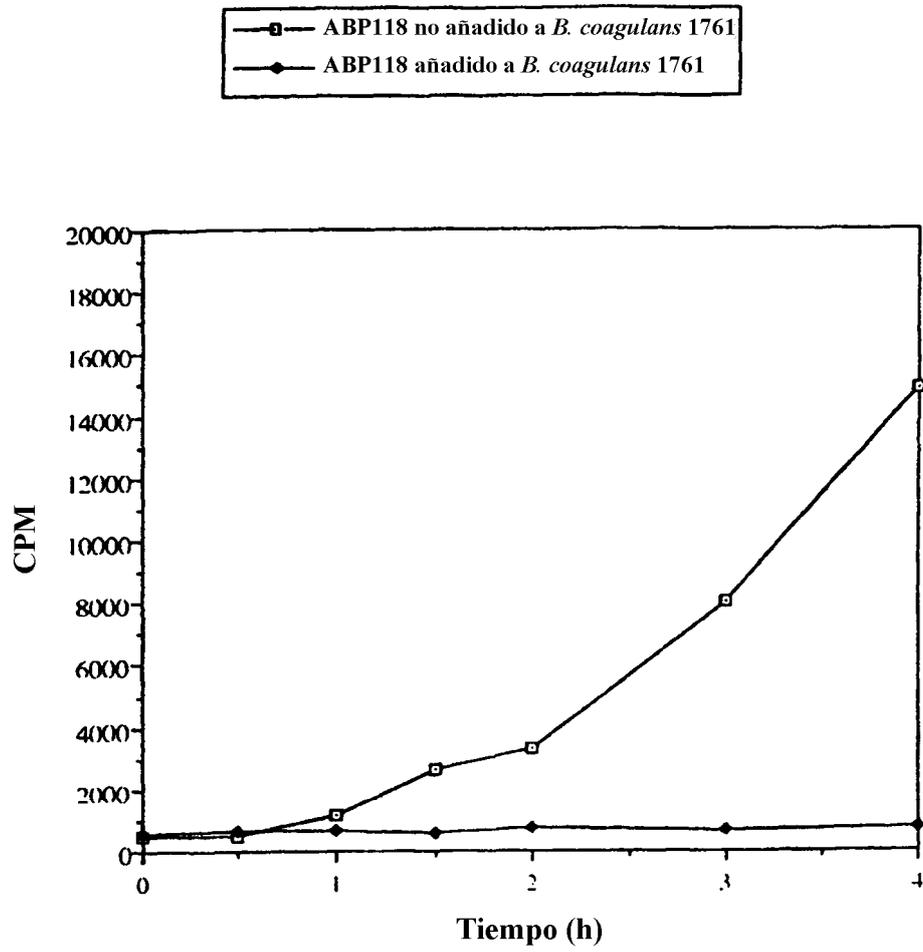


Fig. 8A

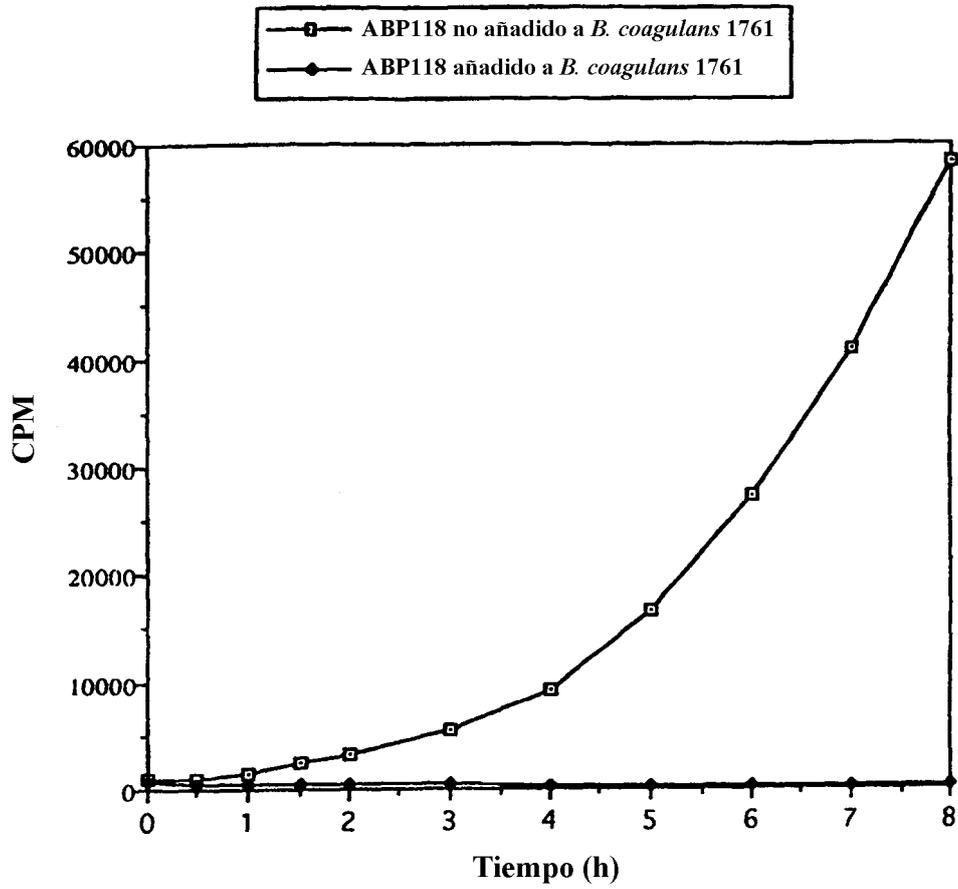


Fig. 8B