



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 615**

51 Int. Cl.:
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04723273 .1**
96 Fecha de presentación : **25.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1613397**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

54 Título: **Uso de bacteriocinas para la mejora de la funcionalidad digestiva.**

30 Prioridad: **01.04.2003 PCT/IT03/00193**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.10.2011

73 Titular/es: **AVIP S.R.L.**
Via Farini, 11
40124 Bologna, BO, IT

72 Inventor/es: **Piva, Andrea y**
Casadei, Gabriele

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 365 615 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

Uso de bacteriocinas para la mejora de la funcionalidad digestiva

5 **Campo técnico**

El tema de la presente invención es el uso de bacteriocinas y/o las cepas que las producen para la mejora de la funcionalidad digestiva y para la mejora de las condiciones del tracto intestinal en especies de organismos monogástricos.

10

Estado de la técnica

Las bacterias del género *Pediococcus* son conocidas. Las bacterias del género *Pediococcus* son anaerobios facultativos homofermentativos no encapsulados. Las bacterias del género *Pediococcus* son quimiorganotrofos y, por lo tanto, tienen requerimientos nutritivos complejos, carecen de actividad proteolítica y son saprofitos de muchas plantas frescas y fermentadas. Su importancia económica en la transformación y la conservación de productos vegetales y carnes y su contribución al desarrollo de los sabores del queso hacen que este género sea particularmente atractivo desde el punto de vista industrial. Las bacterias del género *Pediococcus* se han aislado del rumen de animales bovinos y del ciego de pollos. Pueden identificarse ocho especies, dependiendo de su sensibilidad a la temperatura, pH y NaCl.

20

La especie *P. cerevisiae* ha sido eliminada y las cepas así indicadas previamente se han reunido en parte en la especie *P. damnosus* y en parte en la especie *P. pentosaceus*. Las bacterias de esta última clase tienen su hábitat natural en plantas y presentan temperaturas de desarrollo inferiores a 50°C (el óptimo para *P. pentosaceus* FBB61 se establece en 35°C), en contraste con los pediococos termófilos que crecen bien a 50°C, tienen tamaños celulares menores (0,5-0,8 µm) y se agrupan en la especie *P. acidilactici*.

25

Se sabe que una de las características de las bacterias lácticas, que las hace particularmente interesantes para un posible uso probiótico, es su capacidad de competir con otras bacterias por el mismo nicho ecológico y prevalecer. Esta capacidad es debida a la producción de ácidos orgánicos y productos metabólicos secundarios en elevadas concentraciones, asistida por sustancias de naturaleza proteica con actividad antimicrobiana designadas como "bacteriocinas".

30

Se sabe que el microorganismo *Pediococcus pentosaceus* FBB61 es responsable de la producción de una sustancia proteínica antimicrobiana (bacteriocina), designada como pediocina A.

35

Se sabe que la capacidad de las bacterias lácticas de competir con otras bacterias por el mismo nicho ecológico y prevalecer, además de deberse a la producción de ácidos orgánicos y a la tolerancia de un bajo nivel de pH, a veces se refuerza por la producción de sustancias antimicrobianas de naturaleza proteínica. Se reconoce ampliamente que estas proteínas o péptidos con actividad antimicrobiana, designados con el término "bacteriocinas", contribuyen de manera decisiva a la supervivencia o dominancia de determinadas cepas en ecosistemas microbianos como los alimentos o el tracto digestivo.

40

Existen ejemplos de producción de bacteriocinas en todas las especies bacterianas conocidas y, por lo general, estas solamente tienen actividad antagonista contra aquellas especies que abarcan el mismo nicho ecológico o aquellas filogenéticamente próximas al organismo productor. Los péptidos que contienen lantionina, como nisina y subtilina, constituyen una excepción a esta regla, ya que muestran generalmente actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas.

45

Probablemente el uso muy prolongado y positivo de estas bacterias reside en la producción de estas bacteriocinas, estudiadas hasta ahora con el propósito de extender la durabilidad de los alimentos y mejorar las características higiénicas en relación con el desarrollo de microorganismos patógenos.

50

La solicitud de patente internacional WO-A-9729645 desvela una combinación de *Pediococcus pentosaceus* con al menos dos bacteriocinas para el tratamiento de infecciones bacterianas en el estómago y en el intestino delgado y grueso. Sin embargo, el documento WO-A-9729645 no menciona composiciones que comprenden pediocina A o un análogo de esta y las cepas bacterianas que la producen seleccionadas entre al menos una de: *Pediococcus pentosaceus* FBB61, es decir, ATCC 43200; *Pediococcus pentosaceus* FBB63; *Pediococcus pentosaceus* L7230, es decir, ATCC 43201.

55

Por lo tanto, se sabe que las bacteriocinas se han estudiado, producido y purificado hasta ahora por su posible uso como productos finales y/o materias primas conservantes en virtud de su notable capacidad antimicrobiana contra microorganismos perjudiciales y/o dañinos. Sin embargo, el uso de bacteriocinas como moduladores del entorno intestinal y mejoradores de las condiciones sanitarias del intestino no se ha investigado hasta el momento.

60

Descripción de la invención

Esta invención se refiere a un nuevo uso de las bacteriocinas y las cepas que las producen como mejoradores de las condiciones del tracto gastrointestinal de las especies de organismos monogástricos incluidas a continuación:
 5 humanos, cerdos, conejos, caballos, aves de corral y también silvestres, ovejas, cabras, félicos, cánidos y prurumiantes. La adición a la dieta de una bacteriocina y la bacteria que la produce, una bacteria láctica, en este caso pediocina A y *Pediococcus pentosaceus* FBB61, *Pediococcus pentosaceus* FBB63 y sus bacteriocinas, *Pediococcus pentosaceus* L7230 y sus bacteriocinas, produce efectos positivos en el organismo gracias a una mejor
 10 organización general del tracto gastrointestinal.

Las bacterias lácticas, incluyendo lactobacilos y bifidobacterias, consideradas como GRAS (generalmente reconocidas como seguras) que se introducen en la dieta y/o se administran a un organismo conducen a la producción de ácido láctico dentro del tracto gastrointestinal, el cual determina un descenso del pH intestinal. Este pH bajo es inhospitable para varios microorganismos indeseados (incluyendo patógenos humanos y animales) que
 15 no pueden sobrevivir en condiciones tan ácidas. En consecuencia, la invención desarrolla un mejor equilibrio microbiano intestinal. La colonización de estas bacterias está impulsada por la producción de moléculas proteínicas antimicrobianas, denominadas bacteriocinas, que son capaces de ejercer su actividad y, por lo tanto, de ser usadas de cualquier manera, también en solitario ya que tienen autoactividad, sin la presencia obligatoria de la cepa productora. Otra ventaja de la invención resulta de la disminución de compuestos oncogénicos debida a la proliferación de las bacterias beneficiosas, bien de las cepas productoras de dichas bacteriocinas o de otras cepas bacterianas beneficiosas no afectadas por la actividad antimicrobiana de las proteínas antimicrobianas. Según se ha demostrado en sistemas de fermentación *in vitro*, tales efectos se muestran en la reducción de la producción de cresol, un metabolito de la tiroxina que se considera responsable de la aparición de tumores cutáneos y hepáticos en ratones, así como un factor de reducción del crecimiento del animal, por ejemplo en cerdos. Además, todavía dentro
 20 de los sistemas *in vitro*, la presencia de bacteriocinas y de las cepas bacterianas que las producen conduce a un aumento considerable de la producción de poliaminas de origen bacteriano, especialmente putrescina y espermidina, conocidas normalmente como fuentes energéticas de gran importancia para las células gastrointestinales. La presencia de grandes cantidades de estas moléculas representa no solo una condición importante especialmente para un animal joven, en el que la velocidad de proliferación y de renovación de las células intestinales es mayor que la de cualquier otra célula del organismo. Las observaciones discutidas anteriormente, correspondientes a sistemas *in vitro*, muestran una actividad moduladora real de los procesos metabólicos intestinales por parte del componente bacteriano, cuyas consecuencias se manifiestan después en una mayor higiene y salud del tracto gastrointestinal y, por lo tanto en un mejor estado de salud del animal.

La introducción en la dieta de bacteriocinas y de las cepas que las producen conduce a una mejor organización morfofuncional de la pared intestinal, con un aumento de la superficie epitelial dedicada a la absorción de nutrientes sin afectar a su integridad y, por consiguiente, a la funcionalidad. Estas observaciones, junto con un equilibrio microbiano intestinal renovado y mejorado y las consiguientes modificaciones metabólicas tienen como efecto un estado de salud óptimo del organismo y una mejor eficiencia del uso de los nutrientes. La eficiencia de la invención
 35 resulta también de la interacción de las bacteriocinas mencionadas con las estructuras de la mucosa intestinal. Con mayor precisión, aunque sin guardar relación con ningún mecanismo específico, las bacteriocinas descritas introducidas con la dieta o producidas *in situ* por las respectivas cepas bacterianas productoras ejercen su efecto tanto en la luz intestinal como al incorporarse en la capa de mucosidad que cubre las estructuras intestinales y al mantenerse activas aquí, desempeñan una función protectora contra el ataque de bacterias patógenas, tanto humanas como animales y evitan el ataque a la mucosa y los efectos dañinos, con la consiguiente reducción de la morbilidad y de la aparición de enfermedades gastrointestinales, perjudiciales para el organismo. Por lo tanto, la incorporación en la mucosidad intestinal protege la integridad funcional y protege a las bacteriocinas de los ataques de los procesos digestivos. Un aspecto sorprendente de esta invención es la modulación del entorno gastrointestinal en todos los aspectos, microbiológico, metabólico, higiénico, sanitario y profiláctico, con una mejora de las condiciones de salud del tracto digestivo. Por lo tanto, la invención es particularmente útil cuando las bacteriocinas y las cepas que las producen se emplean como aditivo, integrador o suplemento en la dieta para todas las especies mencionadas anteriormente.

El uso de la invención incluye además su empleo en cualquier medida en la prevención y la profilaxis de patologías causadas por clostridios en cualquiera de las especies mencionadas anteriormente y como apoyo de cualquier intervención antes, durante y/o después de la aparición de tales patologías.

En una realización preferida, esta invención se refiere a un nuevo uso de las bacteriocinas y de las cepas que las producen como mejoradores de las condiciones del tracto gastrointestinal de especies de organismos monogástricos. Las bacteriocinas y cepas bacterianas más adecuadas son *Pediococcus pentosaceus* FBB61, *Pediococcus pentosaceus* FBB63, *Pediococcus pentosaceus* L7230 (ATCC 43201), así como todas las bacteriocinas producidas por estas y/o moléculas análogas a pediocina A.

5 Cuando se ingieren, los microorganismos y sus bacteriocinas conducen a una mejora de la eficiencia alimentaria con un mejor uso de los nutrientes y una mejora del estado microbiológico, metabólico y sanitario por medio de: 1) la producción de ácido láctico con una disminución del pH y la aparición de condiciones adversas para bacterias dañinas y/o patógenas, 2) la colonización del tracto gastrointestinal por bacterias beneficiosas a costa de los microorganismos dañinos, 3) una notable actividad antimicrobiana de las bacteriocinas contra bacterias grampositivas adversas para el organismo, incluyendo clostridios, 4) la modulación del metabolismo con una reducción de la producción de productos oncogénicos (cresol), 5) la modulación del metabolismo con un aumento de la presencia de poliaminas (putrescina y espermidina) en la luz intestinal, que funcionan como fuentes energéticas importantes para las estructuras gastrointestinales, 6) el aumento de la superficie de absorción intestinal y mantenimiento de su adecuada funcionalidad, 7) la adhesión de las bacteriocinas en la mucosidad que cubre la mucosa gastrointestinal con la constitución de una barrera protectora contra cualquier actividad microbiana dañina.

10 En una realización preferida, se supone la introducción de bacterias productoras de varias bacteriocinas y de las bacteriocinas mismas en cualquier combinación útil.

15 La adición y mezcla de los componentes mencionados anteriormente puede tener lugar manualmente o mediante el uso de cualquier número y cualquier tipo de dispositivos adecuados para la preparación de pequeñas o grandes cantidades de pienso líquido o sólido. Si el pienso no es de naturaleza particulada, las bacterias y las bacteriocinas pueden añadirse en el momento de la granulación y/o molienda y/o pulverización del pienso mismo. Puede usarse cualquier procedimiento para la preparación de pienso en cualquier forma con el fin de asociar y hacer posible la introducción de las bacterias y las bacteriocinas en el pienso, también mediante el uso de aglutinantes, absorbentes, excipientes y cualquier otro procedimiento y/o sustancia adecuada para el fin.

20 De manera similar, las cepas bacterianas productoras de bacteriocinas y sus bacteriocinas pueden añadirse a la dieta o a las materias primas individuales en solitario o en cualquier combinación, en cualquier forma física, tanto liofilizada, como líquida, seca, granulada o química y en forma libre o protegida con cualquier procedimiento adecuado.

25 Convenientemente, las bacteriocinas están presentes en el pienso en una cantidad de 1 a 10.000 unidades activas (UA) por ml y/o g de pienso.

30 Los ejemplos siguientes solamente pretenden ser una ayuda para una mejor comprensión de la invención.

35 EJEMPLOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

40 Durante la investigación se han empleado: la cepa FBB61 de *Pediococcus pentosaceus* (ATCC 43200) como productora de pediocina A y la cepa FBB61-2 de *Pediococcus pentosaceus*, un mutante isogenético que no produce bacteriocinas y no muestra caracteres de inmunidad (Imm-) (Daeschel y Klaenhammer, 1985) como cepa indicadora. Estas dos cepas se cultivaron durante la noche en medio de cultivo M17 (Oxoid Ltd, Dasingstoke, RU) con glucosa al 1% (p/v) a 39°C (Sambrook y col., 1989). Los medios agarizados y aquellos usados para los ensayos de recubrimiento se prepararon con la adición de agar al 1,5% (p/v) al medio líquido.

45 Producción de bacteriocinas

50 Las dos cepas bacterianas FBB61 y FBB61-2 se incubaron en un medio M17 con glucosa al 1% (p/v) a 39°C durante 24 horas. Los cultivos se centrifugaron después a 10.000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se recogió y se filtró (filtros Nalgene, Nalge Nunc International, NY, EE. UU.) a través de membranas con un diámetro de poro de 0,45 µm. Después el sobrenadante filtrado se concentró por diálisis frente a polietilenglicol de 20.000 Da de peso molecular (PEG 20000, Sigma Chemical, San Luis, MO, EE.UU.). Para esta operación, se emplearon tubos de diálisis con límite de peso molecular de 12.000/14.000 (Spectra/Pro 4, Spectrum, Houston, Texas, EE. UU.). El proceso se llevó a cabo a una temperatura de 4°C durante toda una noche. Las dos disoluciones en las que sumergieron los tubos de diálisis se agitaron continuamente mediante un agitador, con el fin de conseguir un mejor flujo osmótico.

Purificación de pediocina A

60 El dializado de los dos cultivos, FBB61 (Dia+ = dializado de la cepa productora) y Dia- = dializado de la cepa no productora y sensible) se sometió a una diálisis adicional frente una disolución de NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, durante la noche, todavía a una temperatura de 4°C. El pH de la disolución obtenida se ajustó entonces a 8,1 mediante la adición de HCl al 33%. La disolución obtenida se esterilizó posteriormente por medio de filtración a través de filtros de una porosidad de 0,45 µm.

La purificación de la pediocina A se llevó a cabo por cromatografía de intercambio iónico de baja presión.

- 5 Cinco columnas de cromatografía de intercambio iónico, de 5 ml cada una, se montaron en serie y se conectaron a través de tubos de silicona a una bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson Italia Srl, Milán, Italia). La columna así obtenida se preparó pasando primeramente a su través un tampón inicial (Tris-HCl 20 mM, pH 8,2), después un tampón de regeneración (Tris-HCl 20 mM + NaCl 1 M, pH 8,2) y después un tampón inicial 2 (Tris-HCl 20 mM + NaCl 150 mM, pH 8,2). El volumen usado de cada disolución, cinco veces el total de la columna, se bombeó a una velocidad de 5 ml/min.
- 10 Cada una de las muestras preparadas se cargó en la columna cromatográfica a una velocidad de 5 ml/min hasta la saturación de la columna y el residuo obtenido se recogió y se congeló. La separación de fracciones a continuación se obtuvo mediante el paso a través de la columna de tres volúmenes de disoluciones de NaCl de fuerza iónica creciente (250 mM, 500 mM, 750 mM, 1 M), tamponadas a pH 8,1.
- 15 El procedimiento de cromatografía de intercambio iónico se realizó de manera continua dentro de un refrigerador adecuado para mantener una temperatura de aproximadamente 4°C.

Fermentaciones intestinales *in vitro*

- 20 Dado que se trata de procesos que tienen lugar en el contenido intestinal del intestino grueso después de la digestión y la absorción en el íleon, es necesario simular dicho efecto en el pienso que se empleará en la fermentación. El pienso, compuesto de: maíz, 38%; cebada, 30%; salvado de trigo, 15%; harina de soja, 12%; harina de arenque, 2%; vitaminas y minerales, 3%, se prepara por predigestión enzimática dividida en dos momentos, según la primera parte de la metodología de Vervaeke y col. (1989).
- 25 1ª – Etapa de digestión gástrica: se incuban 2 g de pienso (diámetro de partículas < 1 mm) en 40 ml de una disolución de pepsina al 0,2% en HCl 0,075 N (E.C. 3.4.23.1, P7000; Sigma Chemical, San Luis, MO, EE. UU) a 39°C en un baño maría agitado durante 4 h.
- 30 Una vez que el pH de la disolución del primer paso se ha ajustado a 7,5 con NaOH 1 N, comienza la
- 2ª – etapa de digestión intestinal: en la que una cantidad igual de tampón, 40 ml por cada 2 g de pienso, se añade a pancreatina al 1% (P1500 Sigma Chemical, San Luis, MO, EE. UU.) y se incuba como en el primer paso.
- 35 El tampón se obtuvo por mezcla de:
- 500 ml de una disolución: 46,5 g de Na₂HPO₄ + 49,0 g de NaHCO₃ + 2,35 g de NaCl + 2,85 g de KCl que se disuelven primeramente y después el volumen se ajusta a 1 l con agua desionizada,
 - 5 ml de una disolución de MgCl₂ al 6%,
 - 5 ml de una disolución de CaCl₂ al 4%.
- 40 Por lo tanto, un total de 510 ml se ajustaron de nuevo con agua desionizada a 2,5 l y después se ajustaron a pH 7,5 con HCl 3 N (Martillotti y col., 1987).
- 45 El alimento predigerido se obtuvo por centrifugación a 3.000 x g y 4°C, se lavó tres veces con agua desionizada y la simulación de la absorción intestinal se eliminó siempre por centrifugación. El residuo sólido acumulado en el fondo de los tubos después de la centrifugación se colocó en una estufa a 55°C, la temperatura requerida para evitar la desnaturalización de los principios activos alimenticios, hasta sequedad (aproximadamente 24 h), después volvió a molerse y se almacenó sellado en un congelador.
- 50 Análisis del alimento antes y después de la predigestión

	Pienso completo	Pienso predigerido
% de humedad	10,77	0,00
% de proteína bruta	17,59	4,19
% de lípidos brutos	4,10	1,98
% de cenizas brutas	3,73	2,95
% de NDF	14,08	27,23
% de ADF	4,97	11,27
% de almidón	49,42	50,04
Eficiencia de extracción 35-40%		

Preparación del inóculo cecal obtenido por sacrificio

- 55 1ª – Etapa de extracción: inmediatamente después de la extracción del intestino del cadáver, el ciego se ligó al nivel de la válvula ileocecal y se cortó. El contenido se dejó fluir cuidadosamente a través de un pequeño agujero en la

parte superior del ciego en un recipiente de nailon, del que se había eliminado el aire completamente y que se sumergió en agua a 39°C en una bolsa térmica hasta la etapa preliminar llevada a cabo en el laboratorio.

- 2ª – Etapa de laboratorio: el contenido cecal se midió vertiéndolo en un recipiente graduado, que se mantuvo a 39°C antes de su uso, al igual que todos los demás recipientes para usar en contacto directo con el inóculo. Una vez conocido el volumen, este se mezcló con la disolución tampón en una relación de 1:2. El tampón, compuesto de: NaHCO₃, 49 g; KCl, 2,85 g; CaCl₂·6H₂O, 0,395 g; Na₂HPO₄·12H₂O, 46,5 g; NaCl, 3,5 g; MgSO₄·7H₂O, 0,6 g, disueltos en 5 l de agua desionizada (McDougall, 1948), se ajustó a pH 6,7 mediante la adición de HCl 3 N. Esta disolución se mantuvo a 39°C en un baño maría y se agitó con anhídrido carbónico (CO₂) durante 20 min antes de su uso. El compuesto se filtró después a través de ocho capas de gasa en un frasco, se tapó con algodón y gasa y se volvió a poner en un baño maría con adición de CO₂ durante 10 min. El contenido cecal recién preparado se vertió en los recipientes con el pienso predigerido y calentado a 39°C por medio de una cánula conectada a una probeta, después de agitar el fondo con CO₂.
- 15 Inmediatamente después, los recipientes se sellaron herméticamente y se sumergieron en un baño maría a 39°C en el que se mantuvieron con agitación continua durante toda la duración de la fermentación (48 h).

Diagrama operativo de la fermentación:

- 20 - Tesis 1, control: 20 mg de harina + 5 ml de inóculo
 - Tesis 2, BAC+: 20 mg de pienso predigerido + 5 ml de inóculo + pediocina A igual a una concentración final de 160 UA/ml,
 - Tesis 3, BAC-: 20 mg de pienso predigerido + 5 ml de inóculo + las mismas fracciones de elución de sobrenadante de *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2 correspondientes a las fracciones de *Pediococcus pentosaceus* FBB61 que contienen pediocina A. La cantidad añadida produjo una concentración proteínica equivalente a la producida con pediocina A en la tesis 2.

Análisis químico de los piensos y el líquido cecal

- 30 El análisis centesimal de la dieta se realizó según el procedimiento de la AOAC (1990) y las fracciones fibrosas fueron la fibra lavada en condiciones neutras (NDF), la fibra lavada en condiciones ácidas (ADF) y la lignina (ADL) según Van Soest y col., 1991. En cambio, la hemicelulosa y la celulosa se calcularon por la diferencia entre NDF y ADF y entre ADF y ADL. La energía bruta se evaluó mediante una bomba calorimétrica (modelo 1261; Parr Instrument, Moline, IL, EE. UU.).

- 35 La determinación de la concentración de cresol en las muestras se realizó por el procedimiento propuesto por Birkett y col., 1995.

- 40 A partir de la experimentación resultó que las muestras recogidas durante las 48 h de fermentación mostraron una reducción significativa de la producción de cresol. Después de solo 31 h de proceso fermentativo, la presencia de pediocina A en el tratamiento denominado BAC+ (tratamiento en el que se usó una cepa productora) condujo a una reducción de la producción de la sustancia oncogénica cresol, (-73,30%; P < 0,05) en comparación con el tratamiento con el mutante isogénico BAC- (tratamiento en el que se usó una cepa no productora y sensible), mientras que después de 48 h la reducción de la concentración de cresol se puso de manifiesto por valores todavía más significativos: -87,65%; P, 0,05. La adición de pediocina A al líquido de fermentación a una concentración final de 160 UA/ml condujo a una intensa producción de putrescina durante las primeras 4 h (+203,40% en comparación con BAC-; P, 0,001), después de lo cual se estabilizó en estos valores hasta el final del ensayo. La concentración de espermidina después de la adición de pediocina A al líquido de fermentación siempre mostró valores más elevados en comparación con el control de referencia (BAC-), incluso cuando los altos valores registrados en la hora 16 (37,58 μmol/l) se redujeron al final del ensayo (8,08 μmol/l).

En el PROSPECTO 1, figuras A, B y C, se presenta el efecto de la pediocina A en la producción de poliaminas y cresol cuando se añade al líquido de fermentación a una concentración final de 160 unidades activas (UA)/ml.

55 Animales y dieta

- Un ensayo *in vivo* (72 lechones destetados, raza Segher) se usó para comprobar los efectos de una dieta suplementada con la cepa productora de pediocina A *Pediococcus pentosaceus* FBB61 (BAC+) en comparación con el control negativo BAC- constituido por la cepa isogénica FBB61-2 de *Pediococcus pentosaceus*. La dieta básica estuvo compuesta según se describe en las tablas 1 y 2. Al inicio del experimento, de 56 días de duración, los animales (hembras y machos castrados) mostraron un peso vivo medio (PV) de 7 kg y tenían una edad de 21 días. Los sujetos se dividieron en tres grupos: 1) CTR, control que recibió una dieta estándar, 2) BAC+, que recibió *Pediococcus pentosaceus* FBB61, cultivada en el medio M17 (OXOID) (relación pienso/caldo de cultivo 2:1), 3) BAC-, que recibió *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2, cultivada en el mismo medio de cultivo y con las mismas relaciones. Desde el día 0 al día 35 del ensayo, los animales se alimentaron *ad libitum*, después se racionaron al 9%

del peso vivo metabólico. En los días 0, 14, 35 y 56, los animales se pesaron por separado y se registraron los rendimientos de crecimiento, así como los parámetros de consumo. El estudio de la varianza para los rendimientos de crecimiento se desarrolló según el MLG (modelo lineal general) mediante el programa SAS, versión 6.12 (SAS Institute). El peso vivo inicial se consideró como covarianza con el fin de evaluar los pesos vivos y los aumentos diarios. El modelo estadístico usado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j (x_{ij} - \bar{x}) + \varepsilon_{ij}$$

en que: μ = media general; τ = efecto del animal; β = factor de corrección para la covariable; \bar{x} = media de los exámenes; ε = error.

- 10 Después de 35 días de ensayo se sacrificaron seis animales de los tratamientos BAC+ y BAC- para el análisis de los parámetros morfométricos intestinales (grosor de la pared del intestino delgado y del intestino grueso, profundidad de las criptas, grosor de las vellosidades, longitud de las vellosidades, túnica mucosa, índice mitótico, índice de apoptosis). Al mismo tiempo, también se extrajo el páncreas para el mismo tipo de análisis de laboratorio. Al día siguiente se seleccionaron cuatro animales de cada grupo para analizar la funcionalidad de la mucosa intestinal por medio de ensayos de absorción *in vivo*. Para este fin se usaron dos moléculas marcadoras: albúmina de suero bovino (BSA, 500 mg/kg PV) y fluoresceína sódica (Na-f, 9,4 mg/kg PV). Las moléculas se disolvieron en disolución salina isotónica antes de introducirlas directamente en la cavidad gástrica por cateterización. A las 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 h después de la administración se tomaron muestras de 4 ml de sangre para el análisis siguiente.
- 15
- 20 A partir de la experimentación realizada resultó que la comparación efectuada entre los rendimientos de crecimiento de los dos grupos que habían recibido las dos cepas bacterianas mostraba aspectos interesantes (tabla 3). Después de solo 35 días desde el inicio del ensayo, incluso sin diferencias de peso significativas, los animales que habían recibido *Pedococcus pentosaceus* FBB61 mostraron un mejor uso de los piensos, según se indica por los índices de eficiencia alimenticia (FCR) en comparación con los controles internos (BAC-) (1,58 en BAC+ frente a 1,68 en BAC-, $p = 0,09$). Dado que la eficiencia alimenticia no difirió durante el primer periodo de investigación (0-14 días), la mejor tendencia registrada después de 35 días ha de atribuirse a un mejor FCR durante el periodo desde el día 14 al día 35: BAC+ -5,6% ($P = 0,08$) frente a BAC-.
- 25

Las pruebas histológicas muestran criptas de mayor profundidad en los animales pertenecientes al grupo BAC+ que en los del grupo BAC-, tanto en el yeyuno proximal como en el medio, lo que sugiere una mayor velocidad de proliferación celular en estas regiones. A la inversa, las pruebas histológicas del intestino medio mostraron un índice mitótico inferior en los animales que habían recibido *Pedococcus pentosaceus* FBB61 (ATCC 43200) en comparación con los animales que habían recibido *Pedococcus pentosaceus* FBB61-2. Este dato explica cómo la mayor profundidad de las criptas es debida a una mayor actividad secretora de las células en su interior, más que a su mayor proliferación. Las mediciones relativas de las estructuras de las vellosidades intestinales mostraron (tablas 4 y 5): 1) una mayor longitud potencial de las vellosidades en el yeyuno proximal y medio; 2) un aumento significativo del grosor del borde en cepillo, compuesto por microvellosidades en el polo luminal de los enterocitos; 3) una túnica mucosa significativamente más gruesa en comparación con los animales del grupo BAC-, tanto en el yeyuno proximal como en el medio; una menor velocidad de división celular en el yeyuno medio. La última observación, combinada con el mayor grosor potencial de las vellosidades puede indicar una renovación celular intestinal reducida, lo que, sin embargo, no afectaría a la integridad de la mucosa, según se ha demostrado mediante ensayos de permeabilidad *in vivo*. El aumento del grosor del borde en cepillo de los enterocitos junto con el grosor potencialmente mayor de las vellosidades conduce a una superficie de absorción aumentada. Un tratamiento con *Pedococcus pentosaceus* FBB61 condujo a una reducción del grosor de la túnica mucosa sin afectar a otras estructuras en el ciego, así como a parámetros histológicos pancreáticos sin cambios.

30

35

40

45

Tabla 1: dieta de control usada en el ensayo *in vivo*. Las dietas de los grupos tratados incluyeron, a partir de la misma base, la adición en una relación de 1:2 de caldo de cultivo con *Pedococcus pentosaceus* FBB61 (BAC+) o *Pedococcus pentosaceus* FBB61-2 (BAC-).

50	Ingredientes (g/kg de pienso)
	Maíz 327,2
	Harina de soja 210,0
	Aceite de soja 20,0
	Cebada 70,0
55	Copos de cebada 250,0
	Harina de pescado 30,0
	Suero en polvo 50,0
	L-lisina 5,0
	DL-metionina 1,0
60	Carbonato de calcio 3,0
	Fosfato de calcio 27,0
	Cloruro de sodio 1,8
	Mezcla de vitaminas y minerales 5,0
	Suplementos (por kg de pienso)
65	Proteínas 179,4

	Grasas 52,9
	Fibra 47,9
	Cenizas 66,2
	Almidón 418,5
5	Energía digerible (MJ) 0,811
	Energía neta (MJ) 0,612
	Suplementos de mezcla de vitaminas y minerales (por kg de pienso)
	Vitamina A (UI) 15.000
	Vitamina D3 (UI) 1.700
10	Vitamina E (mg) 35
	Fe 200
	Cu 170
	Zn 200

15	<u>Tabla 2:</u> perfil de aminoácidos de la dieta.	
	AA totales %	AA digeribles %
	Met + Cys	0,73
	Lisina	1,37
	Treonina	0,71
	Triptófano	0,23

En el PROSPECTO 2, tabla 3, se muestran los rendimientos productivos de los animales. Los datos se presentan como medias \pm SD. (ADG = aumento diario medio; FCR = eficiencia alimenticia).

20 En el PROSPECTO 3, tabla 4, se muestran los análisis morfométricos efectuados en el intestino. Los datos se presentan como medias \pm SEM. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,0001 al comparar los grupos de animales BAC+ frente a BAC-. MI = índice mitótico.

En el PROSPECTO 4, tabla 5, se muestra el análisis morfométrico efectuado en el ciego y el páncreas. Los datos se presentan como medias \pm SEM. ** P < 0,01, al comparar los grupos de animales BAC+ frente a BAC-. MI = índice mitótico.

En el PROSPECTO 4, figura D, se muestra un ensayo de permeabilidad. Concentración de Na-f (μ g/ml) en las muestras de plasma de los animales. Los datos se presentan como medias \pm SD.

30 Interacciones entre pediocina y las estructuras celulares

El cultivo de la bacteria láctica *Pediococcus pentosaceus* FBB61, la producción de su bacteriocina pediocina A y su purificación se efectuaron según se describe anteriormente. Después, la pediocina A purificada se marcó con el sistema ECL para biotilación de proteínas (Amersham Pharmacia Biotech, RU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección de la proteína marcada se realizó con un conjugado de estreptavidina y peroxidasa de rábano (HRP) para la detección en el análisis por inmunotransferencia o por medio de un conjugado de estreptavidina e isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma Aldrich, EE. UU.) para los exámenes microscópicos.

40 *Detección de pediocina A en la mucosa intestinal*

Se sacrificaron cerdos, ratas y ratones, se recogieron sus intestinos delgados y gruesos y se lavaron inmediatamente en una disolución fría de PBS (pH 7,5). Se dio la vuelta a una pequeña porción del yeyuno de ratas y ratones, de modo que la mucosa pudiera ponerse perfectamente en contacto con la disolución de PBS, mientras que del intestino de los cerdos se recogió una porción de 0,25 cm² de superficie. Las porciones de intestino así obtenidas se sumergieron durante 15 min en una disolución de PBS que contenía pediocina A biotilada (160 UA/ml). Seguidamente, con el fin de eliminar la proteína no unida a la mucosa, los tejidos se lavaron dos veces en PBS frío. Después, las porciones intestinales se sumergieron en 2 ml de agua destilada estéril para extraer la proteína marcada. A continuación se eliminaron los tejidos. Después, se liofilizaron 2 ml de la disolución y se resuspendieron en 40 μ l para su análisis posterior por SDS-PAGE.

SDS-PAGE e inmunotransferencia

Las muestras obtenidas se examinaron por SDS-PAGE según Laemmli (1970) con geles superpuestos de acrilamida al 3% y al 12%. Después de la electroforesis, las proteínas aisladas del gel se transfirieron a un vehículo de nitrocelulosa mediante un sistema mini Trans-blot (BIO-RAD). La detección de pediocina A se realizó con estreptavidina-HRP.

Interacciones entre pediocina y mucosidad

Para este ensayo se usaron mucinas del tipo II de estómago de cerdo, suspendidas en una disolución de PBS a una concentración de 1 mg/ml. La misma cantidad (1 mg/ml) se usó y se incubó a 37°C durante 15 min en una disolución que contenía pediocina A (160 UA/ml). Las muestras se centrifugaron después a 8.000 x g durante 15 min y el sedimento obtenido se lavó tres veces con la disolución de PBS. Se añadieron 3 µl de estreptavidina-FITC al sedimento, suspendido entretanto en 1 ml de la disolución de PBS. Después de otros 15 min de incubación a temperatura ambiente, las muestras volvieron a centrifugarse y el sedimento se lavó tres veces con la disolución de PBS. Los tejidos de cerdo recogidos se sometieron al mismo procedimiento: se recogió una superficie de 0,25 cm² que se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en un tampón que contenía pediocina A biotinilada a una concentración de 160 UA/ml. La proteína no unida se eliminó por lavado con una disolución de PBS. Las muestras así obtenidas se analizaron mediante un microscopio invertido TMD Nikon, provisto de un juego de filtros para FITC Omega XF100 (Optical-USA). El control negativo usado estuvo representado por las mismas muestras sin incubar con pediocina. Esto es para excluir las interacciones del marcador con las estructuras intestinales, independientemente de la presencia de pediocina A.

Microscopía electrónica

Las células de *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2 (cepa ismutante no productora y sensible a la actividad de la bacteriocina) contenidas en 1 ml de un cultivo fresco se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 300 µl de una disolución de PBS que contenía pediocina A biotinilada a una concentración de 160 UA/ml. Después de dos lavados con PBS se añadió estreptavidina marcada con partículas de oro (diámetro 5 nm). Después de 10 min de incubación, las células se lavaron en PBS. Se sacrificaron cerdos, ratas y ratones, se recogieron sus intestinos delgados y gruesos y se lavaron inmediatamente en una disolución fría de PBS (pH 7,5). Se dio la vuelta a una pequeña porción del yeyuno de ratas y ratones, de modo que la mucosa pudiera ponerse perfectamente en contacto con la disolución de PBS, mientras que del intestino de los cerdos se recogió una porción de 0,25 cm² de superficie. Las porciones de intestino así obtenidas se sumergieron durante 15 min en una disolución de PBS que contenía pediocina A biotinilada (160 UA/ml). Seguidamente, con el fin de eliminar la proteína no unida a la mucosa, los tejidos se lavaron dos veces en PBS frío. Llegado este punto, las células bacterianas y los tejidos intestinales se prepararon para su análisis con el microscopio electrónico (Jeol JEE 1200 EXII, Jeol LTD, Tokio, Japón, a 80 kV). Los tejidos también se prepararon y analizaron por medio del microscopio electrónico de barrido Philips XL 30 ESEM.

A partir de la experimentación realizada se encontró que, teniendo en cuenta los exámenes mediante el microscopio de fluorescencia, es evidente que la pediocina A interacciona con la mucosidad. El control negativo no muestra ninguna fluorescencia, lo que significa que el conjugado estreptavidina-FITC no permanece unido a la mucosidad. La pediocina A recuperada de la mucosidad indica el mantenimiento de una actividad antibacteriana excelente, como muestra la presencia de halos de inhibición en placas Petri previamente sembradas con la cepa sensible *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2. El mecanismo de interacción entre la pediocina A y la mucosidad se desconoce por el momento, pero la bacteriocina se mantiene unida también cuando dos estructuras de mucopolisacárido están totalmente saturadas por lectinas. Las conexiones de proteínas con tejidos intestinales detectadas no mostraron ningún tipo de enlace específico con una región delimitada del intestino. A la inversa, la pediocina A es capaz de unirse a cualquier estructura (intestino delgado o grueso) en cualquiera de las tres especies animales ensayadas (cerdo, rata, ratón). Una interacción inespecífica, pero en cualquier caso efectiva se muestra además entre la pediocina A y la cepa bacteriana *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2, sensible a su actividad. Ya después de 5 min de coincubación se detectan moléculas de pediocina A próximas a la membrana bacteriana, tanto en combinaciones como en forma de moléculas individuales. Los exámenes con el microscopio electrónico y de barrido muestran la presencia de pediocina A marcada con el conjugado estreptavidina-oro. Más en particular, también en este caso la pediocina A parece permanecer atrapada en la mucosidad que cubre las estructuras gastrointestinales, ofreciendo protección contra patógenos grampositivos, gracias a la preservación de su actividad antibacteriana.

La pediocina A se ha caracterizado adicionalmente según se discute en los ensayos siguientes, nºs 1, 2 y 3.

Ensayo nº 1: purificación de la pediocina A producida por *P. pentosaceus* FBB61 mediante filtración de flujo tangencial (TFF).

En este ensayo se ensaya un nuevo procedimiento de purificación de la pediocina A por la técnica de filtración de flujo tangencial (TFF). En la filtración habitual, un flujo de líquido que se filtra tiene una dirección perpendicular respecto a la superficie de la membrana filtrante, mientras que en TFF el flujo es impulsado por una bomba en una dirección tangencial respecto a la membrana filtrante. Los componentes del fluido que quedan retenidos y no pasan a través de la membrana, en el caso de TFF, no se acumulan sobre la superficie del filtro sino que se transportan por el flujo evitando de este modo la obstrucción de los poros de la membrana.

En el módulo de filtración tiene lugar una separación entre el filtrado y el retenido; el filtrado se recoge, mientras que el retenido vuelve a introducirse en el recipiente de alimentación para proceder cíclicamente a la filtración y aumentar el rendimiento en cuanto a purificación y concentración del soluto que se recupera.

- 5 El caldo de cultivo para someter a filtración de flujo tangencial (TFF) se obtuvo por incubación de *P. pentosaceus* FBB61 en un medio M17 con glucosa al 1% (p/v) a 39°C durante 20 horas a 38°C. Al final de la incubación, el caldo de cultivo se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se recogió y se filtró (Stericup, Millipore Corporation, Bedford, Massachussets, EE. UU.) a través de membranas Durapore® con un diámetro de poro de 0,45 mm. Para la TFF se usó un módulo de filtración plano (filtro Pellicon® XL, Millipore Corporation, Bedford, MS, EE. UU.) con una membrana de polietersulfona modificada Biomax® y un NMWL (límite nominal de peso molecular) de 100 kDa (fig. 15).

- 15 El módulo de filtración de TFF se preparó según las instrucciones del fabricante. El caldo de cultivo sometido a filtración se introdujo en el módulo de filtración mediante una bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson Italia Srl, Milán, Italia) con un flujo de 20 ml/min. El caldo de cultivo sometido a filtración, el filtrado y las disoluciones de preparación se mantuvieron en un baño de hielo durante toda la duración de la filtración. Después de reducir el volumen de la disolución de alimentación (2.000 ml) a aproximadamente una cuarta parte del volumen inicial (530 ml), la TFF se interrumpió y las dos disoluciones así obtenidas, la disolución de alimentación, que es el retenido (R2), y el filtrado (F2) se congelaron a -20°C.

20

Resultados del ensayo n° 1

- 25 Al usar un filtro con un NMWL (límite nominal de peso molecular) de 100 kDa para el procedimiento de filtración de flujo tangencial, se pensó que la pediocina A se recuperaría en el filtrado (F), es decir, en el componente que atraviesa el filtro. En contra de las expectativas, la actividad inhibitoria frente a la cepa indicadora (*P. pentosaceus* FBB61-2) se encontró en el retenido (R) que contenía las sustancias incapaces de pasar a través de la membrana filtrante usada. Considerando que el peso molecular de la pediocina A es 80 kDa, probablemente este resultado tiene que atribuirse a la formación de agregados de pediocina A, dada su naturaleza hidrófoba (Piva y Headon, 1994), que son incapaces de atravesar la malla del filtro usado.

30

- 35 La purificación de 2.000 ml de caldo de cultivo con el procedimiento de filtración de flujo tangencial permite alcanzar una purificación de alta eficiencia (3,55 veces el cultivo inicial). La actividad específica y, por consiguiente, la relación entre las unidades arbitrarias y el contenido proteínico (UA/mg) de la muestra presenta un valor de 21,88 UA/mg frente al valor inicial de 6,16 UA/mg. Además, la recuperación total de la actividad presente inicialmente en el sobrenadante filtrado de los caldos de cultivo existentes dentro del caldo de cultivo inicial (100%) fue de especial importancia, mientras que las metodologías de purificación anteriores condujeron a una disminución media de aproximadamente el 20-30% en las primeras etapas de purificación.

- 40 La purificación por filtración de flujo tangencial requiere periodos de tiempo considerablemente inferiores en comparación con la purificación por el procedimiento convencional, lo que facilita los procedimientos manuales y reduce las posibles fuentes de error y, así, pérdidas del contenido de pediocina A, y demuestra ser un procedimiento de purificación válido cuando se espera la producción de bacteriocinas en gran cantidad, en particular de pediocina A.

45 Ensayo n° 2: determinación de la sensibilidad térmica de la pediocina A

- 50 La pediocina A se obtuvo por incubación de *P. pentosaceus* FBB61 en un medio M17 con glucosa al 1% (p/v) a 39°C durante 20 h a 38°C. Al final de la incubación el caldo de cultivo se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se recogió y se filtró (Stericup, Millipore Corporation, Bedford, Massachussets, EE. UU.) a través de membranas Durapore® con un diámetro de poro de 0,45 mm. Posteriormente, el sobrenadante filtrado se concentró por diálisis frente a polientilenglicol de 20.000 Da de peso molecular (PEG 20000, Sigma Chemical, San Luis, MO, EE. UU.). Para esta operación se emplearon tubos de diálisis con límite de peso molecular de 12.000/14.000 (Spectra/Pro 4, Spectrum, Houston, Texas, EE. UU.). El proceso se llevó a cabo a una temperatura de 4°C durante toda una noche. Para ajustar el pH a valores próximos a la neutralidad, el dializado así obtenido se sometió a una segunda diálisis frente a una disolución de PBS (NaCl 137 mM + KCl 2,7 mM + Na₂HPO₄·7H₂O 4,3 mM + KH₂PO₄ 1,4 mM) durante 24 a 4°C y se designó como D1+PBS.

- 60 La sensibilidad térmica de la pediocina A así producida y semipurificada se evaluó por exposición de alícuotas de la preparación D1+PBS a temperaturas crecientes (45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C) durante intervalos de tiempo crecientes (5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min). Cuatro alícuotas de 1 ml de la preparación D1+PBS de pediocina A se distribuyeron en tubos eppendorf y se sumergieron en agua para cada combinación de temperatura y tiempo. Después de la exposición a la temperatura durante los intervalos de tiempo establecidos, las muestras se congelaron a -20°C antes de evaluar la actividad de la pediocina A por la técnica de los pocillos.

Resultados del ensayo n° 2

El ensayo realizado permitió confirmar la sensibilidad térmica de la pediocina A, que no muestra ninguna inhibición de la cepa indicadora FBB61-2 de *P. pentosaceus* en la evaluación de actividad efectuada por medio de la técnica de los pocillos, al haberla sometido previamente a un tratamiento a 65°C durante 45 min (tabla 6). Los tratamientos a 65°C durante intervalos de tiempo inferiores a 45 min y los tratamientos a temperaturas inferiores a 65°C para todos los intervalos de tiempo considerados no disminuyeron la actividad de la pediocina A. Los tratamientos a temperaturas superiores a 65°C para todos los intervalos de tiempo considerados disminuyeron la actividad inhibitoria de la pediocina A por debajo del límite de detección de la técnica seleccionada.

Gracias a su caracterización, la pediocina A puede usarse en todas aquellas preparaciones cuya tecnología de producción implique la obtención de altas temperaturas de trabajo, no superiores a 65°C, durante no más de 30 min.

Tab. 6. Actividad UA/ml detectada con la técnica de los pocillos en muestras de pediocina A expuestas a tratamiento térmico.

	45°C	55°C	65°C	75°C	85°C
5 min	1.600	1.600	1.600	0	0
15 min	1.600	1.600	1.600	0	0
30 min	1.600	1.600	1.600	0	0
45 min	1.600	1.600	0	0	0
60 min	1.600	1.600	0	0	0

Ensayo n° 3: ensayos de contacto entre pediocina A y *Clostridium perfringens*

Se evaluó la actividad antimicrobiana de la pediocina A sobre el crecimiento de *C. perfringens* mediante la exposición de la bacteria *Clostridium perfringens* a cantidades crecientes (20, 40, 80, 160, 320 UA/500 µl) de la bacteriocina misma durante un intervalo de tiempo predeterminado de 60 min. Para este ensayo se usó la preparación de pediocina A obtenida por filtración de flujo tangencial según el "ensayo n°2" discutido anteriormente.

Resultados del ensayo n° 3

Se ha detectado una reducción significativa ($P < 0,05$) del número de células de *C. perfringens* recuperadas al final de los 60 min de contacto con la disolución que contenía la mayor cantidad de pediocina A (320 UA/500 µl) respecto al número de células recuperadas después de 60 min de tiempo de residencia en una disolución salina isotónica. La muestra tratada con 320 UA/500 µl muestra una reducción de las unidades formadoras de colonias (UFC) recuperadas al 67% respecto a una muestra sin tratar. Una reducción semejante no se presenta en otras muestras examinadas.

Tab. 7. Resultados del ensayo de contacto entre *Clostridium perfringens* y pediocina A. UA = unidades arbitrarias de pediocina A existentes en 500 µl; * = n° = 3; dos letras diferentes corresponden a resultados significativamente diferentes ($P < 0,05$).

UA	UFC/500 µl *
0	8,00 ± 2,83 ^a
320	2,67 ± 0,58 ^b
160	9,50 ± 0,71 ^a
80	8,00 ± 3,46 ^a
40	10,00 ± 1,73 ^a
20	12,00 ± 2,83 ^a

Además, a partir de los ensayos de contacto por la técnica de los pocillos ha sido posible evaluar la sensibilidad de la bacteria *Clostridium perfringens* frente a la actividad antimicrobiana de pediocina A, por comparación con la de la cepa indicadora estándar FBB61-2 de *Pediococcus pentosaceus*. Este ensayo permitió establecer que la sensibilidad de *C. perfringens* es 160 veces superior a la de *P. pentosaceus* FBB61-2.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende pediocina A y las cepas bacterianas que la producen, en que la cepa bacteriana se selecciona entre al menos una de:
5 *Pediococcus pentosaceus* FBB61, ATCC 43200;
 Pediococcus pentosaceus FBB63;
 Pediococcus pentosaceus L7230, ATCC 43201;
para su uso como medicamento.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1 para su uso como aditivo de la dieta.
3. El uso de una composición según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para la prevención y profilaxis de infecciones por clostridios; preferentemente de infecciones por *Clostridium perfringens*.
- 15 4. El uso de una composición según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para la prevención y profilaxis de tumores cutáneos y hepáticos debidos a cresol.
5. El uso de una composición según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la disminución del crecimiento de los animales debida a cresol; preferentemente en cerdos.
- 20 6. El uso de una composición según la reivindicación 2 para la preparación de un aditivo de la dieta para aumentar la producción de fuentes energéticas para las estructuras gastrointestinales, dichas fuentes energéticas estando representadas por putrescina y espermidina.
- 25 7. El uso de una composición según la reivindicación 2 para la preparación de un aditivo de la dieta para aumentar la superficie epitelial de la pared intestinal dedicada a la absorción de nutrientes.
8. El uso de una composición según la reivindicación 2 para la preparación de un aditivo de la dieta para aumentar la longitud de las vellosidades en el yeyuno intestinal proximal y medio.
- 30 9. El uso de una composición según la reivindicación 2 para la preparación de un aditivo de la dieta para aumentar el grosor del borde en cepillo, compuesto por microvellosidades en el polo luminal de los enterocitos.
10. El uso de una composición según la reivindicación 2 para la preparación de un aditivo de la dieta para aumentar el grosor de la túnica mucosa, tanto a nivel del yeyuno proximal como del medio.