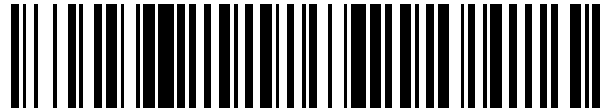


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 366**

51 Int. Cl.:

C12R 1/225 (2006.01)
A23L 1/03 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2005 E 05729506 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 1743042**

54 Título: **Cepas de bacterias de ácido láctico que presentan propiedades probióticas, y composiciones que las comprenden**

30 Prioridad:

31.03.2004 IT RM20040166

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.10.2013

73 Titular/es:

**SYNBIOTEC S.R.L. (100.0%)
VIA GENTILE III DA VARANO
62032 CAMERINO (MC), IT**

72 Inventor/es:

**CRESCI, ALBERTO;
ORPIANESI, CARLA;
SILVI, STEFANIA y
VERDENELLI, MARIA CHRISTINA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 424 366 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).

DESCRIPCION

Cepas de bacterias de ácido láctico que presentan propiedades probióticas, y composiciones que las comprenden

5 La presente invención se refiere a la selección y al empleo de cepas bacterianas adecuadas para la preparación de alimentos y suplementos alimenticios para el aumento o restauración de la microflora intestinal (microflora del intestino).

ESTADO ACTUAL DE LA TECNICA

10 Es conocido que varias cepas bacterianas, por ejemplo, las cepas bacterianas de ácido láctico (LAB) entre las cuales, las que pertenecen al género Lactobacillus y Bifidobacterium, son componentes normales de la microflora intestinal humana y animal.

15 La microflora intestinal comprende varias especies bacterianas (la microflora intestinal humana, por ejemplo está representada por más de 500 especies de bacterias) y contribuye significativamente al mantenimiento de un buen estado de salud del anfitrión. Además es conocido que las deficiencias o daños a la microflora intestinal tanto en los humanos como en los distintos animales, están a menudo correlacionados con un aumento de las enfermedades, como por ejemplo, las infecciones del tracto gastrointestinal, la enfermedad del intestino irritable, la colitis ulcerativa, las alergias alimentarias, las diarreas inducidas por los antibióticos, la enfermedad cardiovascular, y algunas clases de tumores.

20 Las características beneficiosas de varias bacterias, como por ejemplo, los lactobacilos y las bifidobacterias han sido reconocidas en su papel de componentes normales de la microflora intestinal, así como también en los organismos administrados como probióticos.

25 En particular, Ouwehand et al., en LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY ("Literatura sobre microbiología aplicada"), vol. 30 n° 1 Enero de 2000, páginas 10-13, describe las propiedades del Bifidobacterium lactis Bb12, Haller et al., en SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY ("Microbiología sistemática y aplicada), vol 24, n° 2, 2001 páginas 218-226, describe las propiedades metabólicas y funcionales de las Lactic Acid Bacteria ("bacterias del ácido láctico") en el sistema gastrointestinal humano, y Madsen et al., in GASTROENTEROLOGY vol. 121 n° 3 Septiembre 2001 páginas 580-591 describe los efectos de las bacterias probióticas sobre la función barrera del epitelio intestinal ratonil y humano.

30 Las cepas de estos organismos se usan habitualmente tanto para humanos como para animales, como productos terapéuticos, probióticos o añadidas a productos alimenticios debido a sus actividades en la mejora de la salud.

35 La utilidad de estos microorganismos, los cuales pueden ser administrados por medio de composiciones farmacéuticas o a través de la toma de alimentos probióticos que los contienen, reside, por ejemplo, en su capacidad de colonizar la mucosa intestinal adheriéndose a sus células, reemplazando cualquier especie patógena hacia la cual desarrollan un comportamiento competitivo en la colonización. Por lo tanto, la capacidad de las cepas administradas para adherirse a las mucosas juega claramente un papel clave en la eficacia de las mismas, dado que aumenta las probabilidades de que las cepas que exhiban una alta capacidad de adhesión pueden reemplazar o prevenir la adhesión de patógenos mediante una acción competitiva.

40 Además, se ha descubierto que la microflora intestinal en los ancianos experimenta modificaciones con respecto a la de los individuos adultos más jóvenes o la de los jóvenes. Estas modificaciones como por ejemplo, la menor presencia de algunos géneros como por ejemplo, las bifidobacterias o algunas especies particulares, como por ejemplo, varias especies de lactobacilos, parecen estar directamente correlacionadas con una mayor susceptibilidad de los individuos ancianos a las formas clínicas indicadas más arriba (S.Silvi et al., Journal of Food Engineering ("Revista de ingeniería de los alimentos"), volumen 56, páginas 195 – 200, 2003).

45 La composición de la microflora en los ancianos confirma además el hecho de que existen situaciones, algunas de ellas fisiológicas, en las cuales la microflora intestinal se halla en un estado comprometido con respecto a la microflora óptima. Por lo tanto es un objeto de la presente descripción, el aislar nueva cepas probióticas que presentan características como por ejemplo ofrecer una colonización óptima, por lo tanto capaz de dar efectos beneficiosos a medio plazo en la restauración de la microflora intestinal.

RESUMEN DE LA INVENCION

60 La presente invención se refiere a cepas bacterianas de ácido láctico como se describe en la reivindicación 1, a una composición farmacéutica o veterinaria como se describe en la reivindicación 4, a un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica o veterinaria como se describe en la reivindicación 5, a un alimento probiótico o un suplemento alimenticio, como se describe en la reivindicación 6, a un procedimiento para la

preparación de un alimento probiótico o un suplemento alimenticio como se describe en la reivindicación 8, y a su empleo, como se describe en la reivindicación 9. Versiones adicionales de la invención están descritas en las reivindicaciones restantes.

5 Con el fin de aislar y proporcionar nuevas cepas de bacterias LAB, en la presente descripción se han tenido en cuenta criterios de selección ya conocidos, conjuntamente con nuevos criterios de selección. Los criterios ya conocidos considerados son: la resistencia a los ácidos requerida para que las bacterias sobrevivan pasando al interior del estómago; la resistencia a las sales biliares, necesaria también para la supervivencia de las bacterias dentro del tracto digestivo. Sin embargo, estas propiedades por sí mismas no aseguran la consecución del efecto deseado. Por el contrario, es decisiva la capacidad de las cepas de las bacterias para adherirse a la mucosa intestinal, una propiedad que ha sido considerada como un criterio de selección adicional. Como ya se ha indicado antes, una adhesión efectiva implica no solamente una colonización igualmente efectiva de la mucosa intestinal, sino también una fuerte competición frente a cualquier cepa patógena. Por lo tanto cuanto mayor sea la capacidad de adhesión, mayor será la efectividad de la cepa seleccionada en la sustitución de patógenos o la prevención de su colonización. Sobre la base de este criterio, se seleccionan las cepas de bacterias caracterizadas por una alta adhesividad, es decir, aquellas cepas que tienen valores de adhesión iguales a, o mayores que, los valores máximos conocidos para cada especie de LAB.

20 Sin embargo, junto a los parámetros indicados más arriba, se consideró un nuevo criterio adicional de selección anteriormente desatendido, que permitía identificar cepas particularmente efectivas en la colonización de la mucosa intestinal. Es conocido que varias cepas de bacterias pueden inhibir el crecimiento de, o ser inhibidas en su crecimiento por, otras cepas cuando son co-inoculadas en un medio de cultivo. Por lo tanto, los autores de la presente invención han considerado la capacidad de co-adhesión de las cepas identificadas de acuerdo con los precedentes criterios, como un criterio de selección adicional. De hecho, no se ha estimado suficiente que cada una de las cepas seleccionadas tenga muy altos valores de adhesividad (o adhesión) a la mucosa intestinal; a pesar de ello, se ha estimado esencial que cada una de las cepas seleccionadas sea también capaz de mantener dichas propiedades en presencia de otras cepas seleccionadas de la misma manera, de forma que los valores totales de adhesión para pares de grupos de cepas seleccionadas sea por lo menos igual a la suma de los valores de adhesión medidos individualmente para cada cepa. Este resultado se alcanza cuando en la co- inoculación cada cepa tiene una adhesión inalterada o incluso aumentada, mientras que en el caso de que una adhesión disminuya con respecto a una o más cepas, esta tendrá que ser balanceada mediante un aumento de adhesión por las otras cepas.

35 La aplicación de dichos parámetros, además de los descritos en la presente, permite además perfeccionar la selección e identidad de aquellas cepas que tienen una muy alta probabilidad de adhesión también en presencia de otras cepas, co-inoculadas o naturalmente presentes en el intestino.

40 Esta propiedad ofrece una doble ventaja: la co-inoculación in vivo de dos o más bacterias seleccionadas conducirá a un espectro general de adhesión muy alto. Sin embargo, incluso la mera inoculación de una cepa individual tendrá probabilidades de una adhesión más alta, no solamente debido a su intrínseca alta efectividad, sino también debido a su capacidad de adhesión en presencia de otras cepas naturalmente pertenecientes a la microflora intestinal del anfitrión. De hecho, las últimas cepas podrían competir con las cepas administradas, inhibiéndolas en su colonización y desbaratando su acción.

45 A la luz de lo mencionado, se describe un procedimiento para la selección de cepas de bacterias adecuadas para la restauración de la microflora intestinal humana o animal, el cual comprende los pasos en los cuales las cepas de bacterias que han tenido que ser aisladas de las heces humanas o animales y cultivadas son preseleccionadas en cuanto a su tolerancia a los ácidos gástricos y a las sales biliares, y sometidas a pasos adicionales de :

- 50 a) verificación in vitro de los valores de adhesión de cada cepa a las células del epitelio intestinal y selección de las cepas que presentan una alta adhesión, es decir valores de adhesión iguales o más altos que los valores máximos conocidos para cada especie correspondiente;
- b) identificación entre estas cepas, de las cepas individuales que, en un ensayo de co- adhesión con una cepa adicional seleccionada mediante el mismo procedimiento, suministran valores de una adhesión total, no inferiores a la suma de los valores de la adhesión detectados para cada una de las cepas ensayadas individualmente;
- 55 c) aislamiento de las cepas individualmente, en pares o en grupos como se han identificado en b).

60 Objeto de la invención son también las cepas individuales, pares o grupos de cepas seleccionados mediante dicho procedimiento, composiciones farmacéuticas o veterinarias o suplementos alimenticios o alimentos probióticos que las contienen, los procedimientos para su preparación y el empleo de cada cepa individualmente, en pares o en grupos como principios activos en los alimentos probióticos.

Las cepas seleccionadas de acuerdo con el método descrito, aunque adecuadas para la restauración de la flora intestinal bajo cualquier circunstancia, serán particularmente eficaces en aquellas situaciones en las cuales dicha

colonización es más difícil, como por ejemplo, en la ancianidad, en la cual se ha demostrado que muchas especies bacterianas tienen una menor supervivencia y menor capacidad de colonización.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS FIGURAS

La figura 1 se refiere a curvas de crecimiento, en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis, de las cepas bacterianas *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 (figura 1a) y *Lactobacillus paracasei* IMC 502 (figura 1b); los símbolos en forma de rombo indican el crecimiento en anaerobiosis, los símbolos que tienen forma cuadrada indican el crecimiento en aerobiosis.

La figura 2 se refiere a la viabilidad de las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 (fig. 2a) y de *Lactobacillus paracasei* IMC 502 (fig. 2b), durante la fermentación (20,5 horas a 37°C) y almacenamiento refrigerado (21 días a 4°C) en leche de alta calidad (AQ), leche entera (I) y leche semidesnatada (PS).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La toma de muestras fecales y el aislamiento de las varias cepas bacterianas puede efectuarse como se describe en Silvi et al., "Journal of Food Engineering" ("Revista de ingeniería de los alimentos"), 56 (2003) páginas 195 – 200, ó mediante cualquier otro método adecuado conocido por una persona experta en la técnica. Los medios de selección iniciales pueden seleccionarse de acuerdo con el género bacteriano que se desea aislar.

Las bacterias LAB pueden aislarse a partir de las heces humanas o animales. Además, en función de su origen, es posible efectuar la selección en subgrupos específicos de individuos, como por ejemplo personas que padecen un trastorno específico, personas ancianas, individuos con dietas específicas relacionadas, por ejemplo, con el medio ambiente en el cual viven, o familias animales como por ejemplo los cánidos, felinos, bóvidos, cerdos, ovinos, equinos, caprinos, u otras especies animales.

En una versión de particular interés, las cepas LAB se recogen de individuos ancianos, por ejemplo de una edad que oscila desde los 60 hasta los 90 años. De todos modos, es ventajoso que dichos individuos sean sanos y no hayan sido tratados con antibióticos por lo menos en las cuatro semanas anteriores al muestreo fecal.

El ensayo de resistencia a los ácidos puede ser efectuado por cualquier vía conocida por una persona experta en la técnica, siempre y cuando se tenga en cuenta una acidez comparable con la acidez gástrica del anfitrión del cual las cepas han sido aisladas. En los seres humanos, por ejemplo el valor del pH gástrico oscila desde aproximadamente 1,5 hasta 4,5, en un periodo de 2 horas, y depende del tiempo de digestión y el tipo de contenido gástrico. Por supuesto, también la temperatura a la cual se efectúa el ensayo debe de ser una temperatura comparable a la temperatura del cuerpo.

Un ensayo adecuado a las cepas aisladas de las muestras fecales humanas, prevé el tratamiento de una cantidad conocida de células de un cultivo bacteriano fresco con tampón de citrato a un pH desde aproximadamente 3, durante aproximadamente 5 horas, a aproximadamente 37 °C, la centrifugación y el lavado de las células con una solución fisiológica estéril hasta la eliminación del tampón de citrato, la evaluación de las células supervivientes con técnicas de contaje bacteriano sobre un medio adecuado. El margen de supervivencia viene dado por el ratio entre el número de células sobrevivientes al tratamiento, y el número de células presentes antes del tratamiento con ácido.

El ensayo de tolerancia a las sales biliares puede efectuarse de acuerdo con cualquier método conocido. Dicho método debe reproducir las condiciones fisiológicas; por lo tanto, sería aconsejable verificar la resistencia a diferentes concentraciones adecuadas de sales biliares a temperaturas comparables a las temperaturas del cuerpo. Dicho ensayo puede efectuarse sembrando una cantidad conocida de células bacterianas sobre un medio adecuado que contiene sales biliares a diferentes concentraciones, como por ejemplo: sal biliar (extracto de bilis purificado y estandarizado, de la firma Oxoid) a las concentraciones de 0,1 %, 0,3 %, 0,5 %; ó sal biliar nº 3 (sales biliares purificadas desconjugadas, de la firma Oxoid) a las concentraciones de 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %. Las células se incuban a aproximadamente 37 °C en anaerobiosis durante 24-48 horas, verificando a continuación el crecimiento bacteriano a las diferentes concentraciones y sobre los diferentes substratos. La supervivencia al tratamiento puede ser confirmada además por el subsiguiente crecimiento en un medio de cultivo adecuado de las células bacterianas que han sido expuestas a las sales biliares.

Para el ensayo de adhesión, pueden emplearse todos los ensayos conocidos que permiten dictaminar los valores de la adhesión de cada cepa. De esta forma, las adhesiones de las cepas nuevas pertenecientes a determinadas especies podrán ser comparadas a las de las cepas ya conocidas de las mismas especies.

Por ejemplo pueden efectuarse ensayos de adhesión mediante los procedimientos descritos por Tuomola (nacida Lehto) et al.: "Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco 2 cell cultures", ("Adhesion de algunos probióticos y cepas de *Lactobacillus* de la leche, a cultivos de células Caco 2"), "International Journal of Food Microbiology" ("Revista Internacional de Microbiología de los Alimentos"), 1998; 41:45-51 ó mediante Blum, S.

et al.: "Adhesion of selected Lactobacillus strains to enterocyte-like Caco 2 cells in vitro: a critical evaluation of reliability of in vitro adhesion assays" ("Adhesión de cepas seleccionadas de Lactobacillus, a células Caco 2 similares a los enterocitos, in vitro: una evaluación crítica de la confianza de los ensayos de adhesión in vitro"), ("4th Workshop, Demonstration of Nutritional Functionality of Probiotic Foods (4º taller, demostración de la funcionalidad nutritiva de los alimentos probióticos)", Rovaniemi, Finlandia, febrero 25-28, 2000.

El método para la evaluación de la adhesión bacteriana puede efectuarse por ejemplo, empleando una línea celular de origen humano en un cultivo como en el modelo in vitro, para el epitelio intestinal. Por ejemplo la conocida línea celular HT-29 aislada del adenocarcinoma de colon humano, proporciona un ventajoso modelo celular dado que expresa in vitro una diferenciación morfológica y funcional y presenta las características de los enterocitos maduros, incluyendo la polarización, un borde funcional estriado (en forma de cepillo) e hidrolasas intestinales apicales.

A continuación, puede evaluarse la adhesión de las células bacterianas después de haber incubado durante 2 horas a aproximadamente 37 °C, una suspensión bacteriana de concentración conocida con una capa de células confluyentes HT-29. Después de la incubación, se efectúa un conteo de las bacterias, por ejemplo con el método de diluciones en serie y difusión sobre placa, ambos del sobrenadante y de la capa de células. A partir de los dos conteos bacterianos se obtiene el número de células no adheridas y el número de células adheridas a la capa de células, respectivamente. A continuación la tasa de adhesión puede ser calculada por comparación del número de células adheridas con el número total de células de la suspensión bacteriana empleada.

Este método permite definir los valores en tanto por ciento de la adhesión típica de cada una de las cepas preseleccionadas pertenecientes a una especie dada, y por lo tanto comparar los valores encontrados con los valores máximos conocidos para las mismas especies o para identificar los valores máximos para cada una de las especies cuyos datos de adhesión no están disponibles. Por lo tanto el método permite seleccionar fácilmente a partir de especies bacterianas conocidas nuevas cepas bacterianas, las cuales de acuerdo con la invención presentan valores de adhesión comparables a, o mayores de, los valores máximos conocidos para dichas especies. Por ejemplo, los valores de adhesión descritos en la literatura para especies conocidas están registrados en la tabla I, Tuomola (nacida Letho) et al., (ver más arriba).

Los valores de adhesión máximos son: para las especies *L. casei* (Fyos®, Nutricia), subsiguientemente identificadas mediante el método API CHL (4,0) como especies *L. rhamnosus*, $14,4 \pm 3,9$ %, para el *L. acidophilus* 1 género (LCI®, Nestlé) $12,6 \pm 2,5$ %, y para las especies de *L. casei* (BIO® Danone), subsiguientemente identificadas mediante el método API CHL (4,0) como especies de *L. paracasei*, $4,8 \pm 1,3$ %.

El término "alta adhesión" empleado en la presente solicitud indica los valores de adhesión comparables a, o mayores que, los valores máximos conocidos para cada especie dada, en donde "comparable" significa que los valores difieren de los valores máximos en no más de 0,5 puntos del tanto por ciento.

Los ensayos de co-adhesión pueden efectuarse análogamente a los de adhesión, empleando sin embargo mezclas de suspensiones bacterianas de concentraciones conocidas de cada cepa. Pueden emplearse mezclas de dos o más cultivos. La tasa de adhesión puede a continuación calcularse con respecto a la mezcla, obteniendo con ello un valor de la adhesión total, o con respecto a cada cepa bacteriana permitiendo con ello conocer el valor de la adhesión total y el valor de la adhesión que presenta cada una de las cepas co-incubada.

Por lo tanto, para los fines de la invención, se seleccionarán aquellas cepas que, siguiendo los ensayos de co-adhesión, dan una adhesión total igual por lo menos a la suma de los valores de la adhesión de cada una de las cepas consideradas individualmente.

Ventajosamente, el ensayo de co-adhesión sobre grupos de cepas bacterianas puede ser efectuado mediante la adición de una cepa cada vez, partiendo de pares de cepas para los cuales la co-adhesión satisfactoria ha sido ya verificada. Así, podrían ser seleccionados todos los grupos de bacterias cuyo valor de la co-adhesión es igual por lo menos a la suma de los valores individuales de la adhesión.

Por lo tanto en virtud de la evaluación del parámetro de co-adhesión, el procedimiento descrito en la presente permite la identificación y selección no simplemente de cepas individuales que presentan una alta capacidad de adhesión, sino sobre todas las combinaciones específicas de bacterias (pares o grupos) particularmente adecuadas para la restauración de la microflora bacteriana intestinal.

Evidentemente, tanto la selección de las cepas individuales como la selección de las cepas plurales que tengan las deseadas características, es extremadamente ventajoso que estas cepas siendo particularmente efectivas en la restauración de la microflora intestinal sean también efectivas en su acción competitiva contra bacterias patógenas.

Una propiedad adicional que puede ser evaluada para la selección de cepas bacterianas, obtenidas en pares o en grupos en el paso c) del procedimiento, es la presencia o la ausencia de sinergia en el crecimiento en un medio de cultivo. Así, podrían ser identificadas todas aquellas cepas que presenten además de las características de selección, también un crecimiento sinérgico, permitiendo ventajosamente un aumento del rendimiento en el propio paso de producción de bacterias.

El procedimiento descrito en la presente puede comprender además un paso adicional (d) apto para el ensayo de la tolerancia al oxígeno de cada una de las cepas seleccionadas y así seleccionar las cepas tolerantes. Por supuesto, el ensayo de la tolerancia al oxígeno puede efectuarse en cualquier momento del proceso de selección, aunque es claramente más sistemático efectuar dicho ensayo solamente sobre las cepas identificadas en el paso c) del proceso reivindicado. La tolerancia al oxígeno puede ser verificada por cualquiera de los caminos conocidos por una persona experta en la técnica. Esta verificación puede efectuarse por ejemplo, sometiendo cada una de las cepas de interés a un crecimiento en condiciones aeróbicas en un medio de cultivo adecuado durante un periodo de aproximadamente 24 horas, transfiriendo las células a un medio fresco, verificando su crecimiento en condiciones anaeróbicas y seleccionando las cepas tolerantes al oxígeno.

La ventaja de este tipo de selección reside en el hecho de que las cepas que presentan tolerancia al oxígeno, y por lo tanto una capacidad de crecer tanto en condiciones aeróbicas como en condiciones anaeróbicas, son más fácilmente procesables durante la etapa de crecimiento. Además, su resistencia al oxígeno ocasiona que los productos que las contienen, bien sean composiciones farmacéuticas, composiciones veterinarias o alimentos probióticos, no requieran ningún almacenamiento específico ni ningún envase apto para mantener las bacterias bajo condiciones anaeróbicas. Por lo tanto, desde el punto de vista tanto de la producción del producto final como del almacenamiento, la selección de las bacterias resistentes al oxígeno es particularmente ventajosa.

Otra propiedad evaluada como criterio de selección adicional, el paso (e), es la capacidad de las cepas, preseleccionadas individualmente, en un par o en grupo, para crecer en leche sin adición de más sustancias que promuevan su crecimiento. Por supuesto, este tipo de paso de selección puede efectuarse en cualquier etapa del procedimiento, aunque es más práctico, como en el paso d), verificarlo sobre las cepas ya preseleccionadas para la co-adhesión.

La ventaja de este tipo de selección es evidente para la preparación de alimentos probióticos o suplementos alimenticios que comprenden leche o están basados en la leche o están basados en derivados de la leche. En este caso, el medio de cultivo para el crecimiento de las cepas seleccionadas puede ser la propia leche, sin necesidad de más tratamientos de purificación para las bacterias antes de su integración en el alimento probiótico que lo comprende, o sin ninguna necesidad de añadir a dichos productos uno o más nutrientes que podrían cambiar el sabor del alimento o no ser adecuados para el empleo alimenticio.

Cepas particularmente adecuadas de acuerdo con la presente invención son las cepas que pertenecen al género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. Los pares o grupos de cepas de acuerdo con la invención podrían comprender cepas pertenecientes a uno o ambos géneros. En particular, las cepas individuales, pares o grupos, podrían pertenecer a todas las especies de lactobacilos y bifidobacterias, o comprender, cuando están en pares o en grupos, una o más especies de lactobacilos y/o una o más especies de bifidobacterias. Algunos ejemplos de especies adecuadas son el *Bifidobacterium adolescentis*, el *Bifidobacterium bifidum*, el *Bifidobacterium longum*, el *Lactobacillus acidophilus*, el *Lactobacillus brevis*, el *Lactobacillus buchneri*, el *Lactobacillus cellobiosus*, el *Lactobacillus delbuckii* spp. *bulgaricus*, el *Lactobacillus fermentum*, el *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei*, el *Lactobacillus plantarum*, el *Lactobacillus rhamnosus*, el *Lactobacillus salivarius*, el *Lactobacillus curvatus*.

En una versión de acuerdo con la invención, las cepas bacterianas pertenecen a las especies *Lactobacillus rhamnosus* y/o *Lactobacillus paracasei*.

Además, los criterios de selección pueden comprender uno o más de los siguientes parámetros de selección.

En otra versión, las cepas de la invención presentan una resistencia a los antibióticos. Esto las convierte en particularmente adecuadas como bacterias probióticas, para ser administradas en todas las terapias concomitantes con los antibióticos.

Por lo tanto, estas bacterias pueden ser seleccionadas también sobre la base de la evidencia de una resistencia a los antibióticos.

Además, las cepas de acuerdo con la invención, podrían presentar una actividad de inhibición sobre microorganismos potencialmente patogénicos (por ejemplo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, etc.). Por supuesto, esto las convierte en las más interesantes como probióticas. Por lo tanto, también el parámetro de la inhibición de los microorganismos potencialmente patogénicos puede constituir un parámetro de selección.

Finalmente, las cepas de acuerdo con la invención podrían presentar una alta conservación de la viabilidad bacteriana cuando se inoculan en leche y se almacenan a aproximadamente 4 °C. En una versión, las cepas presentan una viabilidad bacteriana substancialmente inalterada incluso después de 21 días de almacenamiento a aproximadamente 4 °C. Esta propiedad puede también constituir un parámetro de selección.

Ventajosamente, dichas cepas podrían también no influenciar el pH de la leche en la cual han sido almacenadas, no fermentando en la misma sin cepas iniciadoras y sin acidificarla. También la verificación de esta propiedad puede ser un parámetro de selección.

Las cepas de la invención han sido depositadas en fecha 08 de Diciembre de 2003 en la DMSZ, Deutsche Sammlung Von Microorganismen Und Zellkulturen ("Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares"), Alemania, de acuerdo con el tratado de Budapest, con los números de depósito DSM 16104 y DSM 16105. En la presente descripción, estas cepas se caracterizan como *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 DSM 16 104 y *Lactobacillus paracasei* IMC 502 DSM 16105, respectivamente.

El par de dichas cepas o cada uno de los grupos que comprenden dichas cepas son versiones de la invención.

Además del número de depósito, dichas cepas se caracterizan también por lo siguiente:

- tolerancia a los ácidos (pH aproximadamente 3);
- tolerancia a las sales biliares;
- capacidad para crecer en aerobiosis así como también en anaerobiosis;
- capacidad para crecer en leche sin adición de otras sustancias aptas para promover el crecimiento de las mismas;
- efecto sinérgico sobre el crecimiento cuando se coinocula;
- valores de la adhesión:

Lactobacillus rhamnosus IMC 501 DSM 16104 14,9 % ± 3,2 y *Lactobacillus paracasei* IMC 502 DSM 16105 4,7 % ± 1,5;

- valores de la adhesión inalterados en el ensayo de co-adhesión que comprende ambas cepas.

Las características bacteriológicas de las dos cepas son como sigue:

Lactobacillus rhamnosus IMC 501 DSM 16104

Características morfológicas: microorganismo en forma de varillas, gram-positivo, que no forma esporas, habitualmente en forma de cadenas. Las colonias en medio de agar, aparecen con forma esférica con los márgenes completos, blancuzcas sobre MRS y amarillentas sobre BHI (infusión de cerebro corazón).

Características de cultivo: la temperatura de crecimiento óptimo es de 34-39 °C. El crecimiento en un medio líquido tiene lugar con la formación de un sedimento suave y homogéneo. No forma películas.

Fermentación de azúcares: el ensayo efectuado mediante el kit enzimático API 50 CHL (bioMérieux). La cepa ha sido encontrada positiva para: la ribosa, la galactosa, la D-glucosa, la D-fructosa, la D-mannosa, la L-sorbosa, ramnosa, el manitol, el sorbitol, el α-metil-D-glucósido, el N-acetil-glucosamina, la amigdalina, la arbutina, la salicina, la celobiosa, la maltosa, la lactosa, la sucrosa, la trehalosa, la melezitosa, la β-gentiobiosa, la D-turanosa, la D-tagatosa, mientras que ha sido encontrada en negativa para: la glicerina, el ertitol, la D-arabinosa, la L- arabinosa, la D-xilosa, la L-xilosa, el adonitol, el β-metil-xilósido, el dulcitol, el inositol, el α- metil-D-manósido, la melibiosa, la inulina, la D-rafinosa, el almidón, el glicógeno, el xilitol, la D-lixosa, la D-fucosa, la L-fucosa, el D-arabitol, el L-arabitol, el gluconato, el 2-ceto-gluconato, el 5-ceto-gluconato.

Características fisiológicas: la cepa se encontró capaz de hidrolizar la esculina.

Lactobacillus paracasei IMC 502 DSM 16105

Características morfológicas: microorganismo gram-positivo, en forma de varillas, a menudo constituido de 4 unidades, o dispuestos en cadena. Las colonias en medio agar, tienen forma esférica con bordes enteros. Sobre MRS las colonias son blancuzcas y brillantes, mientras que sobre BHI presentan una región central ligeramente elevada con bordes transparentes.

Características de cultivo: la temperatura de crecimiento óptimo es de 34-39°. El crecimiento sobre un medio líquido tiene lugar con la formación de un sedimento suave y homogéneo. No forma películas.

5 Fermentación de azúcares: la cepa ha sido encontrada positiva a: la ribosa, la galactosa, la D-glucosa, la D-fructosa, la D-mannosa, el manitol, el sorbitol, la N-acetil-glucosamina, arbutina, salicina, celobiosa, maltosa, sucrosa, trehalosa, inulina, β -gentiobiosa, D-turanosa, D-tagatosa, mientras que la cepa se ha encontrado negativa a: la glicerina, el eritrol, la D- arabinosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, la L-xilosa, el adonitol, el β -metil-xilósido, la L-sorbosa, la ramnosa, el dulcitol, el inositol, el α -metil-D-mannósido, el α -metil-D-glucósido, la amigdalina, la lactosa, la melibiosa, la melezitosa, la D-rafinosa, el almidón, el glucógeno, el xilitol, la D-xilosa, la D-fucosa, la L-fucosa, el D-arabitol, el L-arabitol, el gluconato, el 2-ceto-gluconato, el 5-ceto-gluconato.

10 Características fisiológicas: la cepa se encontró capaz de hidrolizar la esculina.

15 Tanto las cepas IMC 501 como las cepas IMC 502 presentan una resistencia a varios antibióticos, como por ejemplo la vancomicina, el sulfato de colistina, el ácido oxolínico y la penicilina G, y mantienen la misma viabilidad bacteriana cuando se almacenan en leche a aproximadamente 4 °C durante por lo menos 21 días. Además, las cepas no acidifican la leche en la cual están almacenadas.

20 De acuerdo con la invención, las cepas individuales, en pares o en grupos seleccionados pueden también estar en forma liofilizada. La liofilización puede efectuarse de acuerdo con uno o cualquiera de los métodos conocidos por una persona experta en la técnica. De manera similar, las bacterias de la invención pueden ser deshidratadas como por ejemplo describe la patente canadiense CA2263954.

25 Las cepas de la invención, seleccionadas individualmente, en pares o en grupo, son útiles como medicamentos. Dos tipos de composiciones farmacéuticas o veterinarias pueden prepararse: la primera composición comprende por lo menos una de las cepas obtenibles mediante el procedimiento de selección aquí descrito, la segunda comprenderá por lo menos uno de los pares o uno de los grupos de cepas que pueden obtenerse como se ha citado. Junto con las bacterias seleccionadas, en la composición habrá uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, y, opcionalmente, principios activos adicionales.

30 Junto por lo menos con una de las cepas obtenibles mediante el proceso de selección descrito en la presente, la composición podría comprender también cepas adicionales seleccionadas individualmente. Alternativamente, la composición podría comprender uno o más pares o uno o más grupos seleccionados de acuerdo con la invención. Sin embargo dicha composición podría también estar limitada a una nueva cepa bacteriana sencilla, obtenible mediante el procedimiento aquí descrito juntamente con los excipientes adecuados, los principios activos opcionales adicionales y/o los aromatizantes y/o los edulcorantes. Dichos principios activos adicionales podrían también ser cepas LAB ya conocidas.

35 En el último caso, la composición debería comprender por lo menos un par o un grupo de cepas obtenibles mediante el procedimiento descrito, y podría todavía comprender cepas adicionales seleccionadas individualmente con el mismo procedimiento, u otros principios activos que podrían ser cepas LAB conocidas, junto con excipientes y aditivos farmacéuticamente aceptables.

40 Dichas composiciones farmacéuticas podrían comprender las bacterias en forma liofilizada o en forma no liofilizada; por consiguiente podrían estar en forma de polvo, comprimidos, cápsulas, líquidos, líquidos densos o semisólidos. Cuando estas composiciones comprenden bacterias en forma liofilizada, estas últimas estarán generalmente en una forma liofilizada e inactiva, en una cantidad oscilando desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10 billones por dosis. Excipientes adecuados podrían ser: un medio de cultivo llevado a la neutralidad y liofilizado, carbonato de calcio, ácido silícico, talco, estearato de magnesio, lactosa anhidra, gelatina. Opcionalmente, podría añadirse también un aroma apto para que la preparación farmacéutica sea agradable al paladar y un edulcorante (sucrosa, fructosa, etc.).

50 Excipientes adecuados para las preparaciones en forma líquida podrían ser por ejemplo, agua purificada, y la concentración total de las bacterias podría ser desde 1 hasta 10 billones por dosis, de preferencia aproximadamente 5 billones.

55 Ejemplos de formulaciones y preparaciones farmacéuticas de las mismas son ya conocidos en la técnica; adecuados a los fines de la presente invención pueden ser los procedimientos descritos en la solicitud de patente publicada US 2004/0057943, así como también otros procedimientos conocidos por una persona especializada en la técnica. Las bacterias podrían estar en suspensión, liofilizadas o inactivadas, siempre que no murieran. Por lo tanto, la preparación de las composiciones de la invención podría efectuarse mediante liofilización de cultivos bacterianos, mezclando cultivos liofilizados o en suspensión con agua o excipientes adecuados adicionales y opcionalmente con adición de otros principios activos. En una versión alternativa de la invención, las cepas de bacterias seleccionadas están comprendidas en alimentos probióticos o suplementos alimenticios.

60 Estos pueden estar en forma líquida, semi-líquida, sólida, o en polvo, y deberían comprender por lo menos una de las cepas bacterianas o por lo menos un par o un grupo de cepas bacterianas de la invención, ingredientes

alimenticios adecuados, y, opcionalmente, conservantes, acidificantes, antioxidantes, cepas bacterianas probióticas adicionales, suplementos alimenticios y/o excipientes.

Por lo tanto, los alimentos pueden comprender una cepa bacteriana individual, o un par o un grupo de cepas bacterianas, y pueden comprender todavía cepas adicionales, pares o grupos en cualquier combinación entre sí. Además, también las cepas LAB ya conocidas podrían ser añadidas a las nuevas cepas de la invención.

Los alimentos probióticos de particular interés podrían ser productos lácteos o productos basados en lácteos, y podrían también ser o comprender, leche deshidratada.

Los alimentos de la invención pueden prepararse de cualquier manera ya conocida por una persona especializada en la técnica, mezclando por lo menos una de las cepas bacterianas, o por lo menos un par o un grupo de las cepas bacterianas de la invención, siendo las mismas, frescas, liofilizadas, inactivadas o deshidratadas (mientras no estén muertas), con ingredientes alimenticios adecuados y, opcionalmente, conservantes, acidificantes, antioxidantes, cepas bacterianas probióticas adicionales, suplementos alimenticios y/o excipientes.

Para la preparación de leche probiótica deshidratada o de un alimento que la comprende, la leche puede fermentarse con bacterias LAB de la invención, opcionalmente con bacterias LAB adicionales conocidas. A continuación, se añade glutamato de sodio y ácido ascórbico y la leche fermentada se seca por atomización. El sólido así obtenido puede a continuación procesarse en forma de comprimidos, dulces, u otras clases de alimento.

Pueden prepararse yogures probióticos que contienen las bacterias de la invención, mediante técnicas ya conocidas por una persona experta en la técnica, como por ejemplo los descritos en la solicitud de patente internacional WO-A-03090546 ó en la patente US nº 6.599.504 ó en la solicitud de patente EU nº EP-A-1243180.

La cantidad de bacterias que deberían estar presentes en los alimentos está indicada en dicha referencia, y de todos modos es conocida por una persona experta en la técnica. En general los alimentos probióticos comprenden desde 1 hasta 10 millones de bacterias por gramo. Dichas bacterias pueden hacerse crecer directamente en el alimento, en el material de partida, o pueden añadirse en cualquier etapa de la preparación del alimento. La adición puede efectuarse mediante la adición al medio (por ejemplo, leche) en el cual las bacterias han crecido, o después de la purificación de este último.

La descripción proporciona también métodos para la trazabilidad de las bacterias de la invención mediante secuenciación con técnicas estándar o kits 16S rDNA, comercialmente disponibles.

De hecho, el 16S rDNA comprende regiones altamente conservadas en bacterias interpuestas en regiones hipervariables. Estas regiones hipervariables comprenden secuencias que caracterizan los grupos filogenéticos e incluso especies. La información taxonómica contenida en el 16S rDNA, que presenta características específicas de las cepas, constituye el fundamento de los métodos analíticos moleculares, que son adecuados para una rápida identificación de las cepas bacterianas.

Por lo tanto, a partir de la secuencia en cuestión pueden construirse, con metodologías o programas estándar, cebadores que permiten la trazabilidad de las cepas deseadas tanto en los productos funcionales como para fines de investigación.

A continuación, se describen varios ejemplos puramente a título ilustrativo y no limitativo del alcance de las reivindicaciones.

EJEMPLOS:

EJEMPLO 1

Aislamiento y selección de las cepas bacterianas

Se recogieron heces de individuos ancianos, de ambos sexos y de una edad oscilando desde 60 hasta 90 años, en recipientes estériles y se pusieron en un saco de plástico impermeable al agua en condiciones anaeróbicas obtenidas mediante el empleo de bolsitas de "AnaeroGen" (OXOID-UNIPATH Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). Las muestras se almacenaron a + 4°C durante un período de tiempo máximo de 24 horas y dentro de este tiempo se transfirieron, en un recipiente anaeróbico (Concept 400, Ruskinn Technology Limited, Leeds, West Yorkshire, Reino Unido), a un laboratorio.

Para el aislamiento, se emplearon medios selectivos para el género Lactobacillus: agar LAMVAB (Lactobacillus Anaerobic MRS con vancomicina y verde bromocresol) y MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) agar (Oxoid). Los medios

selectivos inoculados se incubaron en anaerobiosis a 37 °C durante 72 horas. Se aislaron 54 cepas de bacterias *Lactobacillus* spp.

La identificación de dichas cepas se efectuó mediante el método enzimático API 50 CHL (bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Dichas cepas fueron sometidas a ensayos de tolerancia a los ácidos gástricos, a las sales biliares y al oxígeno. El *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 y el *Lactobacillus paracasei* IMC 502 sobrevivieron a los ensayos de tolerancia.

EJEMPLO 2

Métodos de crecimiento del inóculo y métodos de almacenamiento

El *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 y el *Lactobacillus paracasei* IMC 502 se cultivaron en medio MRS (de Man, Rogosa y Sharpe). El crecimiento tuvo lugar en condiciones aeróbicas y anaeróbicas a 37 °C después de una incubación de 24 - 48 horas.

Las cepas se almacenaron durante un corto período a 4 °C, durante un mes en agar inclinado, mientras que para períodos de tiempo más largos, las células pueden ser transferidas a un sistema de almacenamiento a -80 °C empleando el sistema Microbank (PRO-LAB DIAGNOSTIC, NESTON, Reino Unido) o liofilizadas después de haber añadido un 20 % de leche desnatada y almacenado a temperatura ambiente.

La composición del medio MRS es como sigue:
MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) (cantidades expresadas en gramos/litro):

Peptona	10,0
Lab-Lemco	8,0
Extracto de levadura	4,0
Glucosa	20,0
Tween 80	1 ml
Fosfato de potasio monoácido	2,0
Acetato de sodio 3 H ₂ O	5,0
Citrato de triamonio	2,0
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0,2
Sulfato de manganeso 4 H ₂ O	0,05
pH 6,2 ± 0,2	

EJEMPLO 3

Ensayo de la adhesión bacteriana sobre el epitelio intestinal

La capacidad bacteriana para adherirse a las células epiteliales se considera como uno de los criterios de selección para las cepas probióticas.

Debido a la dificultad de estudiar la capacidad de adhesión de las bacterias in vivo, el ensayo de adhesión bacteriana de los dos cepas sobre el epitelio intestinal se estudió empleando una línea de células de origen humano en un cultivo como un modelo in vitro del epitelio intestinal.

La línea de células empleada es la HT-29, aislada del adenocarcinoma del colon humano una de las líneas celulares empleada más a menudo con el fin de evaluar la capacidad de adhesión de las cepas probióticas. La ventaja de este modelo de célula es que la misma expresa in vitro una diferenciación morfológica y funcional y presenta las características de los enterocitos maduros, incluyendo la polarización, un borde funcional estriado (en forma de cepillo) e hidrolasas intestinales apicales.

La adhesión celular bacteriana se evaluó después de haber incubado durante 2 horas a 7 °C una suspensión bacteriana de concentración conocida con una capa de confluencia de las células HT-29. Después de la incubación se efectuó un contaje bacteriano por el método de las diluciones en serie y difusión sobre placa, tanto del sobrenadante como de la capa de células.

A partir de los dos contajes bacterianos, se obtuvo el número de células no adheridas y el número de células adheridas a la capa de células, respectivamente.

La tasa de adhesión se calculó por comparación del número de células adheridas respecto al total de células de la suspensión bacteriana empleada.

El *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 presenta una tasa de adhesión del 14,9 % \pm 3,2, y el *Lactobacillus paracasei* IMC 502 una tasa de adhesión del 4,7 % \pm 1,5, las cuales, comparadas con los valores conocidos de las cepas comerciales pertenecientes a las mismas especies (tabla 1), están entre las más altas.

5

Tabla 1

Tasas de adhesión de cepas bacterianas probióticas comercialmente disponibles		
Cepas bacterianas	Identificación API CHL (4,0)	Adhesión (%), (media + S.D.)
<i>L. casei</i> (Fyos®, Nutricia)	<i>L. rhamnosus</i>	14,4 \pm 3,9
<i>L. acidophilus</i> 1 (LC 1®, Nestlé)	<i>L. acidophilus</i>	12,16 \pm 2,5
<i>Lactobacillus</i> GG ATCC 53103	<i>L. rhamnosus</i>	9,7 \pm 3,3
<i>L. casei</i> (BIO®, Danone)	<i>L. paracasei</i>	4,8 \pm 1,3
<i>L. casei</i> inmunitas (Actimel®, Danone)	<i>L. paracasei</i>	4,4 \pm 1,1
<i>L. casei</i> Shirota (Yakult®, Yakult)	<i>L. paracasei</i>	3,2 \pm 0,52
<i>L. casei</i> var- <i>rhamnosus</i> (<i>Lactophilus</i> ®, Laboratoires Lyocentre)	<i>L. rhamnosus</i>	2,6 \pm 0,69

EJEMPLO 4

10

Curvas de crecimiento en condiciones de anaerobiosis y de aerobiosis

Empleando el método espectrofotométrico se determinaron las curvas del crecimiento bacteriano de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 y de *Lactobacillus paracasei* IMC 502 en el medio líquido MRS, manteniendo las condiciones óptimas de pH y temperatura y monitorizando el crecimiento bajo condiciones de anaerobiosis así como también de aerobiosis durante un tiempo de nueve horas.

15

La figura 1 representa las curvas de crecimiento de las dos cepas bacterianas.

20

El *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 presenta, en la etapa de crecimiento exponencial en condiciones de anaerobiosis, valores más altos de D.O. hasta la séptima hora, y a continuación el crecimiento en condiciones de aerobiosis tiene valores más altos.

25

El *Lactobacillus paracasei* IMC 502 presenta en la etapa de crecimiento exponencial en condiciones de anaerobiosis, valores más altos de D.O. hasta la octava hora; a continuación, el crecimiento en aerobiosis se encontró que era mejor.

EJEMPLO 5

30

a. Ensayo de la sensibilidad a los antibióticos

El perfil de resistencia a los antibióticos de las dos cepas bacterianas *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 y *Lactobacillus paracasei* IMC 502 se ensayó empleando el método clásico de difusión en agar. Se ensayaron un total de 11 sustancias antibióticas, a saber, la ampicilina, la eritromicina, la rifampicina, la neomicina, la amoxicilina, el sulfato de colistina, el ácido oxolínico, la penicilina G, la polimixina, el cloranfenicol, y la vancomicina. Ambas cepas se encontraron resistentes a la vancomicina, al sulfato de colistina, al ácido oxolínico, y a la penicilina G, y sensibles a los otros 7 antibióticos ensayados.

35

b. Evaluación de la actividad antimicrobiana

40

Los efectos inhibidores de las dos cepas bacterianas sobre los microorganismos potencialmente patogénicos como por ejemplo el *Escherichia coli*, el *Staphylococcus aureus* y la *Candida albicans* se estudiaron empleando la técnica modificada de "racha transversal diferida", descrita en Fang et al.: "Antagonismo de las bacterias del ácido láctico al *Staphylococcus aureus* y la *Escherichia coli* sobre placas de agar y en la leche" "Investigación Veterinaria" - 1996, 27: 3-12. La actividad de inhibición de las dos cepas probióticas se evaluó sobre la base del diámetro de la zona de inhibición frente a los patógenos intestinales comunes. Los resultados están registrados en la Tabla 2.

45

Tabla 2

Grado de inhibición de las cepas probióticas frente a los potenciales patógenos intestinales			
Cepas probióticas	<i>E. coli</i> (ATCC 11775)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>C. albicans</i> (ATCC 10291)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IMC 501	++	++	+++
<i>Lactobacillus paracasei</i> IMC 502	++	++	+++
++ zona de inhibición > 2 x 2 cm			
+++ zona de inhibición > 3 x 3 cm			

- 5 Como se desprende de los resultados registrados más arriba, ambas cepas exhiben una buena inhibición en el crecimiento de las 3 cepas ensayadas, particularmente potenciada para la *Candida albicans*.

EJEMPLO 6

10 Propiedades tecnológicas de las cepas probióticas

Mediante el empleo de la medición del pH y la evaluación de la viabilidad, se evaluó la capacidad de las dos cepas de bacterias *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 y *Lactobacillus paracasei* IMC 502 para acidificar la leche. Para esta prueba, se utilizaron tres tipos diferentes de leche: leche fresca entera homogeneizada pasteurizada, leche fresca semi-descremada homogeneizada pasteurizada y leche fresca de alta calidad. Las leches se inocularon con una suspensión de las dos cepas bacterianas y se dejaron fermentar durante aproximadamente 20,5 horas a 37 ° C. El proceso fue monitorizado mediante la medición del pH. A continuación, los productos se almacenaron a aproximadamente 4 ° C durante 21 días, llevando a cabo un recuento de la viabilidad bacteriana en agar de MRS después de la inoculación, después del proceso de fermentación y después de 7, 14 y 21 días de almacenamiento.

- 20 Ninguna de las dos cepas fue capaz de acidificar la leche, por lo tanto, son particularmente adecuadas para la integración de la leche fresca sin variar su pH.

Ambas cepas permanecieron viables durante el almacenamiento a 4 ° C hasta 21 días después de la inoculación, y el valor de pH de los productos lácteos fue constante durante todo el período. (Figura 2).

25 Además se evaluó la supervivencia en la leche de las cepas probióticas de la invención durante el almacenamiento en frío. Después de la inoculación, la muestra se almacenó a aproximadamente 4 ° C durante 21 días. La viabilidad de las cepas se analizó mediante recuento en placas MRS después de la inoculación y después de 7, 14 y 21 días de almacenamiento. Ambas cepas mantuvieron el recuento de bacterias presentes en la inoculación hasta 21 días de almacenamiento a 4 ° C.

EJEMPLO 7

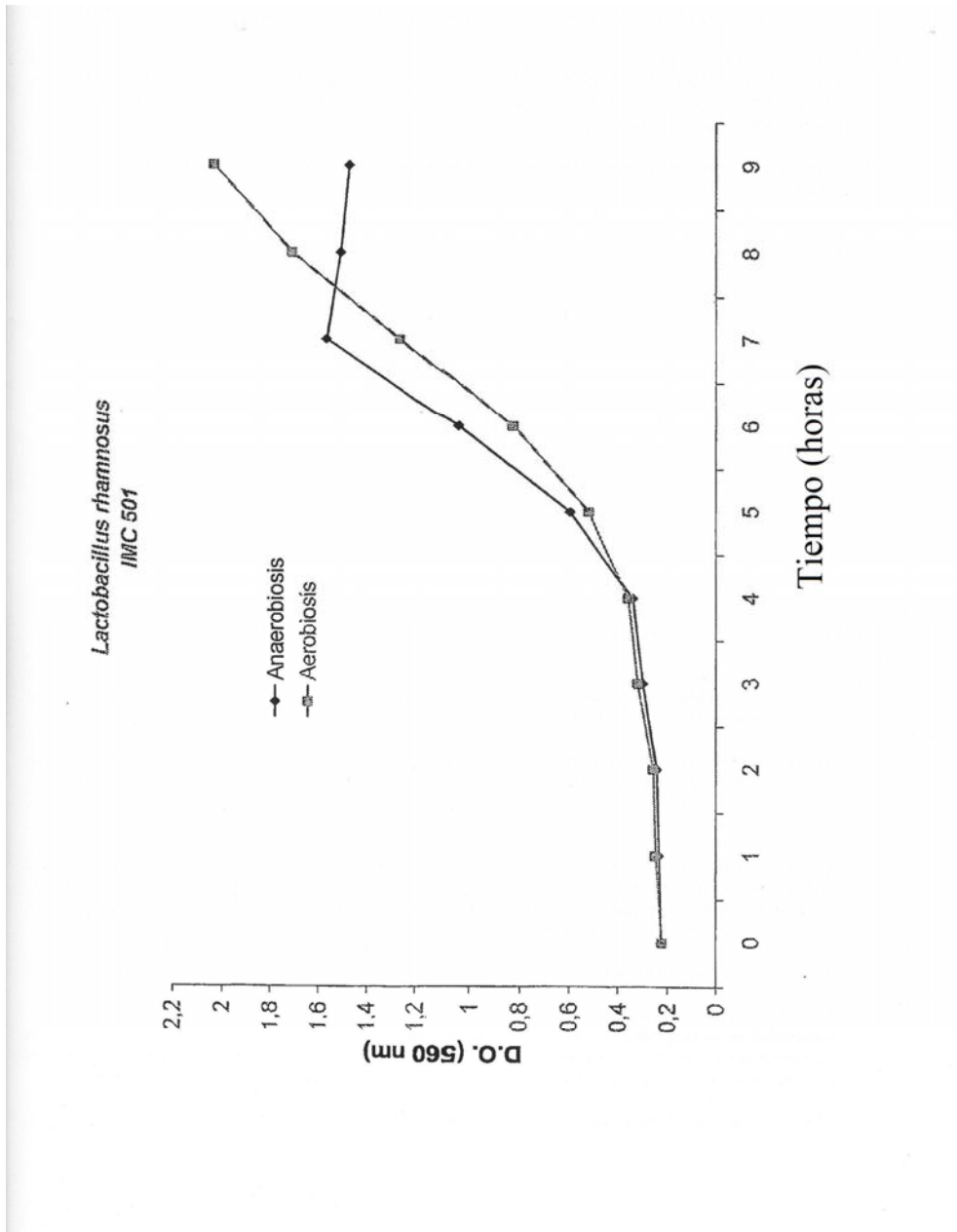
30 Secuenciación de cepas probióticas

Para determinar la secuencia del 16S rDNA de las cepas probióticas, se efectuó una extracción de ADN empleando el kit del tejido Dnasa (Qiagen) ; a continuación, se preparó una reacción de PCR, utilizando los cebadores P0 y P6 correspondientes a las posiciones 27f (hacia adelante) y 1495r (inversa) de *Escherichia coli* 16S rDNA. Después de la determinación de la amplificación producida, mediante electroforesis, los productos de la PCR se purificaron mediante el kit de Qiagen y a continuación se secuenciaron. Las secuencias obtenidas de este modo se utilizan, con los programas y sistemas estándar, para la construcción de cebadores específicos de especies, los cuales pueden ser empleados en la trazabilidad de las cepas de probióticos deseados, así como en productos funcionales y en el estudio sobre seres humanos.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepas bacterianas de ácido láctico adecuadas para la restauración de la microflora intestinal humana o animal, las cuales tienen in vitro unos valores de adhesión iguales o mayores que los valores máximos conocidos para cada especie correspondiente y teniendo un valor de co-adhesión total no inferior a la suma de los valores de adhesión de cada cepa a las células del epitelio intestinal detectadas para cada una de las cepas ensayadas individualmente, caracterizadas porque, se seleccionan de las cepas que tienen el número de depósito DSM 16104 y el número de depósito DSM 16105.
- 10 2. Las cepas bacterianas de acuerdo con la reivindicación 1, en forma liofilizada.
3. Las cepas bacterianas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para emplear como medicamento.
- 15 4. Una composición farmacéutica o veterinaria que contiene las cepas bacterianas de acuerdo con la reivindicación 3, y los excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, cepas bacterianas adicionales y/o principios activos.
- 20 5. Un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica o veterinaria de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque, se mezclan las cepas bacterianas de acuerdo con la reivindicación 3, con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, con cepas bacterianas adicionales y/o principios activos.
- 25 6. Un alimento probiótico o un suplemento alimenticio, en forma líquida, en forma líquida espesada, en forma semisólida, en forma sólida o en forma de polvo, la cual comprende las cepas bacterianas de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, ingredientes alimenticios adecuados, y, opcionalmente, conservantes, acidificantes, antioxidantes, cepas bacterianas probióticas adicionales, suplementos alimenticios y/o excipientes.
- 30 7. El alimento o el suplemento alimenticio de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque, está basado en un producto lácteo.
- 35 8. Un procedimiento para la preparación de un alimento probiótico o un suplemento alimenticio, de acuerdo con las reivindicaciones 6 ó 7, caracterizado porque, se mezclan las cepas bacterianas de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, con ingredientes alimenticios adecuados y, opcionalmente, con conservantes, acidificantes, antioxidantes, cepas bacterianas probióticas adicionales, suplementos alimenticios y/o excipientes.
- 40 9. Empleo de las cepas bacterianas de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, para la preparación de alimentos probióticos.



Lactobacillus paracasei
IMC 502

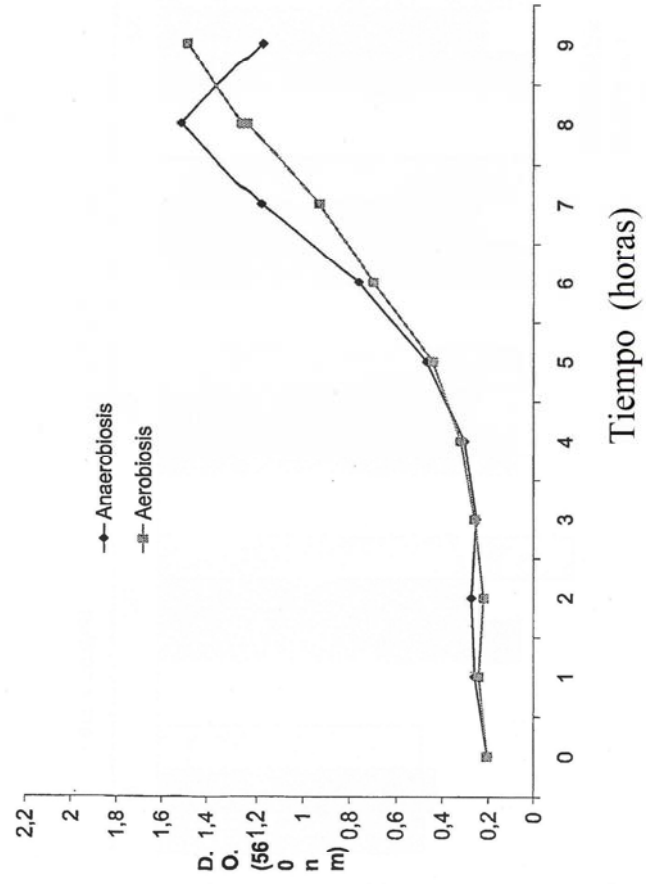


FIG. 1B

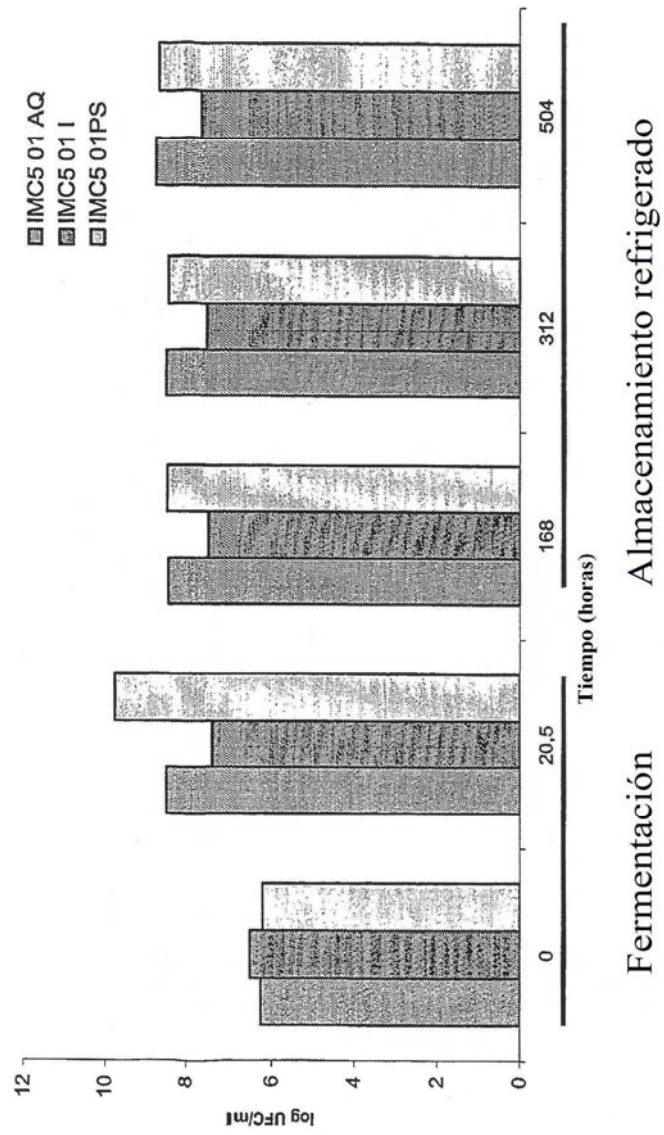


FIG. 2A

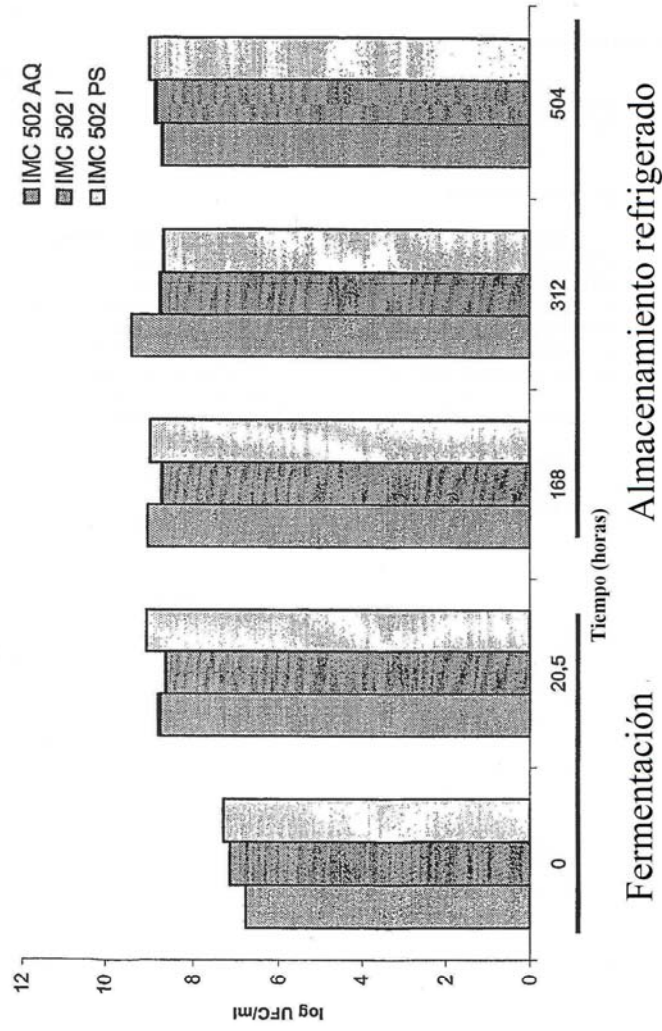


FIG. 2B