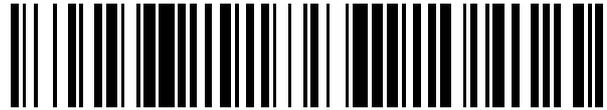


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 698**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/04**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2005 E 05792126 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 1789529**

54 Título: **Procedimiento para mejorar la conservación de lactococos**

30 Prioridad:

**20.08.2004 EP 04104001**  
**12.04.2005 EP 05102856**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.01.2014**

73 Titular/es:

**ACTOGENIX N.V. (100.0%)**  
**TECHNOLOGIEPARK 4**  
**9052 ZWIJNAARDE, BE**

72 Inventor/es:

**REMAUT, ERIK y**  
**ISERENTANT, DIRK**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 439 698 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

**Procedimiento para mejorar la conservación de lactococos**

La presente invención se refiere a cepas de *Lactococcus lactis* con características de conservación mejoradas y tolerancia mejorada a ácidos y sales biliares. Más específicamente, la invención se refiere a una cepa de *L. lactis* que comprende un gen de trehalosa-6-fosfato sintasa y/o un gen de trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogos, que da como resultado una acumulación de trehalosa en el citoplasma y/o en la membrana citoplasmática. Se refiere adicionalmente a una cepa de *L. lactis* en la que dicha acumulación de trehalosa da como resultado una concentración interna de trehalosa de al menos 10 mg por g de células (ph).

*Lactococcus lactis* es una bacteria acidoláctica fermentadora mesófila y microaerófila. Aparece comúnmente en la naturaleza, especialmente en material vegetal. La bacteria se usa extensamente en fermentaciones alimentarias, especialmente en la industria láctea. Además, existe un interés creciente por su uso en nutracéuticos, como medicación para tratar infecciones vaginales o como portador para el suministro de moléculas activas biológicas. En todos estos casos, existe la necesidad de cultivos iniciadores altamente viables o de formulaciones farmacéuticas que comprendan una alta proporción de bacterias viables. Sin embargo, uno de los inconvenientes principales de *L. lactis* es su rápida caída de viabilidad durante el almacenamiento, o durante el procesamiento para la formación de comprimidos. La caída de viabilidad es aún más drástica cuando la bacteria después de liofilización se somete a una tensión adicional tal como una alta acidez o la presencia de sales biliares.

Se han propuesto varios procedimientos para superar este problema. Los intentos de mejorar la viabilidad se realizan tanto al nivel de condiciones de cultivo de las bacterias como al nivel de procesamiento. Gaudu *et al.* (2002) dan a conocer que lactococos cultivados por respiración sobreviven notablemente mejor después de un largo tiempo de almacenamiento que las células fermentadoras. Este largo tiempo de supervivencia es probablemente debido a la inducción de citocromos que pueden proteger a las células del estrés oxidativo. Li *et al.* (2003) demostraron que la presencia de glutatión intracelular, que es también protector contra el estrés oxidativo, puede dar también como resultado una viabilidad mejorada tras el almacenamiento. Otro enfoque para mejorar la viabilidad de lactococos tras el almacenamiento se basa en la adaptación del proceso de secado por pulverización y en el uso de auxiliares de procesamiento tales como celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa acetato succinato o alginato de sodio, que pueden usarse para recubrir las partículas bacterianas.

Aunque estos procesos conducen ciertamente a una mejora del almacenamiento, ninguna de las soluciones es suficiente, y existe la necesidad adicional de procedimientos que puedan conducir a un almacenamiento mejorado de lactococos, especialmente en aquellos casos en que la bacteria se usa para el suministro de compuestos activos biológicos en aplicaciones médicas.

La trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-1,1- $\alpha$ -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor que aparece en una gran variedad de organismos, en el intervalo de bacterias a animales invertebrados. La trehalosa, a veces en combinación con dextrano, se usa a menudo como crioprotector añadido externamente. La trehalosa añadida externamente funciona como matriz de sacárido (Conrad *et al.*, 2000), y ejerce su efecto protector especialmente durante la liofilización, donde actúa como formador de cristal. Además, la trehalosa está bien reconocida como metabolito del estrés, y se ha estudiado extensamente en hongos, especialmente en *Saccharomyces cerevisiae*. Las altas concentraciones internas de trehalosa mejoran la capacidad de almacenamiento y dan como resultado una mayor viabilidad tras la crioprotección. Sin embargo, es importante observar que la trehalosa añadida externamente raramente conduce a una acumulación interna de trehalosa en microorganismos, porque no se capta o porque se metaboliza rápidamente después de la captación.

La trehalosa añadida externamente se ha usado, entre otros, para la conservación de lactobacilos durante la liofilización (Conrad *et al.*, 2000) y para la estabilización de lactococos durante la congelación (documento EP 1441027). Sin embargo, aunque el papel de la trehalosa interna en células eucarióticas está bien documentado, no existen datos disponibles sobre un papel positivo en la conservación de procariontas.

Padilla *et al.* (2004) han mostrado recientemente que puede obtenerse una sobreproducción de trehalosa en la bacteria grampositiva productora y secretora de trehalosa *Corynebacterium glutanicum* expresando los genes *otsA* y *otsB* de *Escherichia coli* en esta especie. Sin embargo, en este caso, la expresión de genes de *E. coli* conduce a un aumento de las actividades sintasa y fosfatasa endógenas y a un aumento de la producción de la trehalosa endógena existente. Además, el efecto de la sobreproducción de trehalosa sobre el almacenamiento de *C. glutanicum* es desconocido.

*Lactococcus lactis* es capaz de utilizar trehalosa (Andersson *et al.*, 2001), pero hasta ahora no se ha descrito una cepa de *Lactococcus lactis* sintetizadora de trehalosa. Es más, no se han identificado genes de trehalosa-6-fosfato sintasa ni trehalosa-6-fosfato fosfatasa, que son etapas esenciales en la producción de trehalosa a partir de glucosa-6-fosfato, un metabolito que está presente en *L. lactis*. Sorprendentemente, se ha encontrado que, mediante la transferencia y expresión en *L. lactis* de los genes *otsA* (trehalosa-6-fosfato sintasa) y *otsB* (trehalosa-6-fosfato fosfatasa) de *Escherichia coli*, puede obtenerse una acumulación significativa de trehalosa. Aún más sorprendentemente, esta acumulación de trehalosa conduce a una mejora importante de la viabilidad en condiciones

de estrés y durante el almacenamiento en varias condiciones de almacenamiento. Por lo tanto, la acumulación interna de trehalosa parece un procedimiento ideal para mejorar las características de almacenamiento y resistencia al estrés de *Lactococcus* sp en general y *L. lactis* en particular.

La presente invención proporciona un objeto como se expone en una cualquiera de (i) a (xiii) a continuación:

- 5 (i) Una cepa de *Lactococcus* sp. aislada que comprende:
- (a) un gen de trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogo, o
- (b) un gen de trehalosa-6-fosfato sintasa y un gen de trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogos,
- en la que la actividad trehalosa-6-fosfato fosforilasa está inactivada.
- 10 (ii) Una cepa de *Lactococcus* sp. aislada según (i), en la que uno o ambos genes de (a) o (b) están ligados operativamente al promotor de *L. lactis* inducible por nisina.
- (iii) Una cepa de *Lactococcus* sp. aislada según (i), en la que uno o ambos genes de (a) o (b) están ligados funcionalmente al promotor P1 constitutivo.
- 15 (iv) Una cepa de *Lactococcus* sp. aislada según cualquiera de (i)-(iii), en la que el gen de trehalosa-6-fosfato sintasa heterólogo es el gen OtsA de *Escherichia coli*.
- (v) Una cepa de *Lactococcus* sp. aislada según cualquiera de (i)-(iv), en la que el gen de trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogo es el gen OtsB de *Escherichia coli*.
- (vi) Una cepa de *Lactococcus* sp. aislada según cualquiera de (i)-(v) precedentes, en la que dicho *Lactococcus* sp. es *Lactococcus lactis*.
- 20 (vii) El uso de la acumulación de trehalosa en el citoplasma y/o la membrana citoplasmática de *Lactococcus* sp. para mejorar sus características de almacenamiento, para mejorar su resistencia a condiciones ácidas, para mejorar su resistencia a sales biliares o para mejorar su resistencia al estrés combinado, en el que dicha cepa de *Lactococcus* sp. aislada comprende:
- (a) un gen de trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogo, o
- 25 (b) un gen de trehalosa-6-fosfato sintasa y un gen de trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogos.
- (viii) El uso de la acumulación de trehalosa en el citoplasma y/o la membrana citoplasmática de *Lactococcus* sp. para mejorar la resistencia al estrés combinado según (vii), en el que dicho estrés combinado es una combinación de liofilización con condiciones ácidas y/o sales biliares.
- 30 (ix) El uso de la acumulación de trehalosa en el citoplasma y/o la membrana citoplasmática de *Lactococcus* sp. según cualquiera de (vii)-(viii), en el que la actividad trehalosa-6-fosfato fosforilasa está inactivada.
- (x) El uso de la acumulación de trehalosa en el citoplasma y/o la membrana citoplasmática de *Lactococcus* sp. según cualquiera de (vii)-(ix), en el que el gen de trehalosa-6-fosfato sintasa heterólogo es OtsA de *Escherichia coli*.
- 35 (xi) El uso de la acumulación de trehalosa en el citoplasma y/o la membrana citoplasmática de *Lactococcus* sp. según cualquiera de (vii)-(x), en el que el gen de trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogo es el gen OtsB de *Escherichia coli*.
- (xii) El uso de la acumulación de trehalosa en el citoplasma y/o la membrana citoplasmática de *Lactococcus* sp. según cualquiera de (vii)-(xi), en el que dicho *Lactococcus* sp es *L. lactis*.
- 40 (xiii) El uso de una cepa de *Lactococcus* aislada según cualquiera de (i)-(vi) para la preparación de un medicamento para el suministro de una molécula profiláctica y/o terapéutica.

El objeto proporcionado por la invención pertenece por tanto específicamente a la divulgación, descripción y enseñanzas de la presente invención.

- 45 Un primer aspecto de la memoria descriptiva describe una cepa aislada de *Lactococcus* sp., preferiblemente *L. lactis*, que comprende una concentración interna de trehalosa de al menos 10 mg de trehalosa, preferiblemente 30 mg de trehalosa, más preferiblemente 40 mg de trehalosa, lo más preferiblemente 50 mg de trehalosa, por g de peso húmedo de células (concretamente, 50 mg de trehalosa, preferiblemente 150 mg de trehalosa, más preferiblemente 200 mg de trehalosa, lo más preferiblemente 250 mg de trehalosa, por g de peso húmedo de células). La

concentración interna de trehalosa como se usa aquí significa que la trehalosa se sintetiza o capta por las bacterias, y está presente en el citoplasma y/o en la membrana citoplasmática de las bacterias. La trehalosa interna difiere claramente de la trehalosa exógena añadida al medio, que puede adherirse al exterior de la pared bacteriana pero no se incorpora a las bacterias. Preferiblemente, dicha trehalosa interna es trehalosa sintetizada endógenamente.

5 Un aspecto adicional de la memoria descriptiva describe una cepa aislada de *Lactococcus* sp, preferiblemente *L. lactis*, que comprende un gen de trehalosa-6-fosfato sintasa y/o trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogos. Un gen como se usa aquí es una secuencia de ADN que comprende al menos las secuencias de codificación de una proteína funcional. Preferiblemente, dichos genes están ligados operativamente con un promotor que es funcional en *L. lactis*. Ligado operativamente hace referencia a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos están  
10 en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia promotora "ligada operativamente" con una secuencia de codificación está ligada de tal modo que se consiga la expresión de la secuencia de codificación en condiciones compatibles con la secuencia promotora. Dicho promotor puede ser un promotor inducible o un promotor constitutivo. Ambos genes pueden ligarse operativamente con un solo promotor, como un operón, o pueden disponerse bajo el control de dos promotores, que pueden ser idénticos o diferentes. Un  
15 aspecto preferido es una cepa aislada de *Lactococcus* sp, preferiblemente una cepa de *L. lactis*, en el que dichos genes se disponen bajo el control del promotor de *L. lactis* inducible por nisina. Otro aspecto preferido es una cepa de *L. lactis* en la que dichos genes se disponen bajo el control del promotor constitutivo P1. Preferiblemente, dicho gen de trehalosa-6-fosfato sintasa es el gen *otsA* de *E. coli*, y el gen de trehalosa-6-fosfato fosfatasa es el gen *otsB* de *E. coli*. Son conocidos procedimientos para la transformación de *Lactococcus* sp por los especialistas en la materia e incluyen, pero sin limitación, electroporación. Los genes heterólogos pueden estar situados en un plásmido autorreplicante, o pueden integrarse en el genoma bacteriano.

Otro aspecto de la memoria descriptiva describe el uso de la acumulación interna de trehalosa en *Lactococcus* sp para mejorar las características de almacenamiento de lactococos. Preferiblemente, dicho *Lactococcus* sp. es *L. lactis*. Acumulación de trehalosa como se usa aquí significa una concentración interna de trehalosa de al menos 10  
25 mg de trehalosa, preferiblemente 30 mg de trehalosa, más preferiblemente 40 mg de trehalosa, lo más preferiblemente 50 mg de trehalosa, por g de peso húmedo de células. Preferiblemente, la acumulación interna de trehalosa se obtiene mediante la expresión de un gen de trehalosa-6-fosfato sintasa y/o trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogos, aún más preferiblemente mediante la expresión del gen *otsA* y/o *otsB* de *E. coli*.

Como alternativa, puede obtenerse mediante adición externa de trehalosa al medio de crecimiento, y reemplazando  
30 el gen de trehalosa-6-fosfato fosforilasa por uno de trehalosa-6-fosfato fosfatasa tal como *OtsB*, y mediante crecimiento de esta cepa en trehalosa y otra fuente de carbono, preferiblemente maltosa. Es más, el crecimiento en trehalosa como tal no conduce a la acumulación de trehalosa debido a la rápida metabolización después de la captación. Además, en *L. lactis*, la trehalosa se fosforila durante la captación proporcionando trehalosa-6-fosfato. Sin embargo, al permitir la captación de trehalosa con la fosforilación concomitante hasta trehalosa-6-fosfato, pero  
35 bloqueando el procesamiento posterior convirtiendo la trehalosa-6-fosfato en trehalosa, mientras se inactiva la actividad trehalosa-6-fosfato fosforilasa, se obtendrá una acumulación interna de trehalosa. Es aún otra posibilidad para la acumulación de trehalosa en *L. lactis* la transformación de la bacteria con un transportador de trehalosa no fosforilante heterólogo, tal como el transportador ABC de trehalosa de *Sinorhizobium meliloti* codificado por el operón *thuEFGK* (número de acceso a Genbank AF175299; Jensen *et al.*, 2002), preferiblemente combinado con la  
40 inactivación de la trehalosa fosfotransferasa y el crecimiento de la cepa transformada en trehalosa y otra fuente de carbono, preferiblemente lactosa. La mejoras de las características de almacenamiento como se usan aquí pueden ser de cualquier almacenamiento tal como, pero sin limitación, almacenamiento en medio de crecimiento, por congelación, liofilización o secado por pulverización. Preferiblemente dicho almacenamiento es por liofilización. La mejora del almacenamiento puede medirse cultivando la cepa de *L. lactis* en condiciones que den como resultado la  
45 acumulación interna de trehalosa, liofilizando la cepa y midiendo la evolución de la viabilidad de la cepa durante al menos 4 semanas durante almacenamiento a 4°C a 10% de HR. Aún otro aspecto de la memoria descriptiva describe el uso de la acumulación interna de trehalosa en *Lactococcus* sp. para mejorar la resistencia al estrés de *Lactococcus* sp. Preferiblemente, dicho *Lactococcus* sp es *L. lactis*. La resistencia al estrés como se usa aquí puede ser cualquier clase de estrés. Como ejemplo no limitante, puede ser estrés inducido por frío, estrés por congelación,  
50 estrés por secado por pulverización, estrés por liofilización, estrés por pH altamente ácido (por debajo de pH 3,5, preferiblemente por debajo de pH 3,2, aún más preferiblemente por debajo de pH 3,0), estrés por la presencia de sales biliares o una combinación de esos estreses, en paralelo o sucesivamente. Preferiblemente, dicho estrés es estrés por pH altamente ácido, aún más preferiblemente dicho estrés es estrés por la presencia de sales biliares, lo más preferiblemente dicho estrés es estrés por liofilización. Es un aspecto adicional el uso de la acumulación interna  
55 de trehalosa en *Lactococcus* sp. para mejorar la resistencia al estrés de *Lactococcus* sp. ante liofilización, seguido de estrés a ácido y/o a la presencia de sales biliares. Preferiblemente, dicho *Lactococcus* sp. es *L. lactis*. Estas condiciones de estrés imitan las condiciones que encontrarán las bacterias cuando se usen para suministro al intestino.

Aún otro aspecto de la memoria descriptiva describe el uso de una cepa aislada de *Lactococcus* sp, preferiblemente  
60 la cepa *L. lactis* según la invención, para el suministro de una molécula profiláctica y/o terapéutica. Preferiblemente, dicho uso es el uso de una cepa aislada de *Lactococcus* sp., preferiblemente *L. lactis*, para la preparación de un medicamento para el suministro de una molécula profiláctica y/o terapéutica. El suministro de polipéptidos activos biológicos se ha descrito en el documento WO97/14806. El uso de una cepa según la invención tiene la ventaja de

que la producción de la molécula profiláctica y/o terapéutica es significativamente mayor, tanto cuando se calcula por unidad formadora de colonias (ufc) como por ml de cultivo. Es un aspecto preferido el uso de una cepa aislada de *Lactococcus* sp., preferiblemente *L. lactis*, para la preparación de un medicamento para el suministro de una molécula profiláctica y/o terapéutica, en el que dicha cepa porta adicionalmente un rasgo autocontenido, tal como la mutación thyA, dado a conocer en el documento WO02/090551.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FIGURAS

**Figura 1:** Mapa del plásmido pNZ8048

**Figura 2:** Mapa del plásmido pNZEcTre1 en el que el operón *otsB/otsA* está ligado operativamente con el promotor de nisina.

10 **Figura 3:** Evaluación de la producción de proteína trehalosa-6-fosfato sintasa (marcada como 53,6 kDa) y trehalosa-6-fosfato fosfatasa (marcada como 29,1 kDa) en condiciones inducida (+N) y no inducida (-N).

**Figura 4:** Efecto de la nisina, usada para la inducción de promotor, sobre la velocidad de crecimiento de las transformantes y la cepa de control no transformada (+N: inducida, -N: no inducida).

**Figura 5:** Acumulación media de trehalosa después de la inducción de NZ9000 de *L. lactis* [pN-TRE].

15 **Figura 6:** Porcentaje de supervivencia de NZ9000 de *L. lactis* [pNZEcTre1] después de 0,5 h de exposición a bilis de buey. Se calcula este porcentaje como ufc después de tratamiento respecto a ufc iniciales.

**Figura 7:** Porcentaje de supervivencia de NZ9000 de *L. lactis* [pNZEcTre1] después de liofilización y 4 h de exposición a bilis de buey. Se calcula este porcentaje como ufc después del tratamiento respecto a ufc iniciales.

20 **Figura 8:** Porcentaje de supervivencia de NZ9000 de *L. lactis* [pNZEcTre1] después de 0,5 h de exposición a jugo gástrico. Este porcentaje se calcula como ufc después del tratamiento respecto a ufc iniciales.

**Figura 9:** Producción de IL-10 humana después de 8 h a 37°C, después de liofilización del cultivo y rehidratación, calculada por ml de cultivo, por NZ9000 de *L. lactis* [pNZEcTre1- hIL10aPxA] inducida (+nisina) y no inducida (-nisina), en comparación con el control no acumulador de trehalosa MG1363 [pT1hIL10aPxA].

25 **Figura 10:** Producción de IL-10 humana después de 8 horas a 37°C, después de liofilización del cultivo y rehidratación, calculada por ufc, por NZ9000 de *L. lactis* [pNZEcTre1- hIL10aPxA] inducida (+nisina) y no inducida (-nisina), en comparación con el control no acumulador de trehalosa MG1363 [pT1hIL10aPxA].

**Figura 11:** Mapa del plásmido pNZEcTre1-hIL10aPxA en el que el operón *otsB/otsA* está ligado operativamente con el promotor de nisina y el módulo de secreción de hIL-10 está ligado operativamente con el promotor P1 lactocócico.

## EJEMPLOS

30 **Ejemplo 1: Clonación de los genes de la biosíntesis de trehalosa de *Escherichia coli* en el plásmido de expresión lactocócica pNZ8048**

Se recuperan las secuencias de ADN que codifican los genes de la biosíntesis de trehalosa en *Escherichia coli* de GenBank (nº. acc. X69160) (Kaasen *et al.* 1994).

35 La cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (Woodcock *et al.*, 1989) sirve como fuente de los genes de la biosíntesis de trehalosa *otsA* y *otsB*, que codifican trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa, respectivamente. Se purifica el ADN genómico de 10<sup>9</sup> células con el kit comercialmente disponible Qiagen DNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del suministrador.

La secuencia de ADN que engloba *otsB-otsA* se amplifica por PCR con ADN polimerasa Vent® (New England Biolabs, Beverly, MA, EE.UU.) y las siguientes secuencias cebadoras:

40 cebador directo: 5'-GCCCATGGGTGACAGAACCCTTAACCGAAACC- 3', en que GTG es el codón iniciador del cistron *otsB* y la secuencia CCATGG es un sitio de restricción de *NcoI*;

cebador inverso: 5'-GCTCTAGACTACGCAAGCTTTGGAAAGGTAGC-3', en que CTA es el complemento del codón de terminación TAG del cistron *otsA* y la secuencia TCTAGA es un sitio de restricción de *XbaI*.

45 Se digiere el fragmento de ADN de 2216 pb amplificado con *NcoI* y *XbaI*, se liga en el vector pNZ8048 abierto con *NcoI-XbaI* (Ruyter *et al.*, 1996) (Fig. 1) y se transforma mediante electroporación en la cepa NZ9000 de *L. lactis* (Wells *et al.*, 1993). Se obtienen transformantes a 30°C en placas GM17 (véase a continuación) que contienen 5  $\mu$ g de cloranfenicol por ml. Se prepara ADN de plásmido a partir de los transformantes usando un procedimiento de lisis alcalina por SDS adaptado para *L. lactis*; antes de la producción de un lisado aclarado, se pretratan las células con lisozima (5 mg/ml) y mutanolisina (100 U/ml). La digestión con enzimas de restricción combinadas *BglII* y *XbaI* permite la identificación del plásmido recombinante deseado, designado pNZEcTre0. En esta construcción

50

plasmídica intermedia, se clonan los genes *otsB-otsA* en 3' del promotor  $P_{nis}$ , pero el gen *otsB* no se fusiona con la lectura correcta del codón iniciador ATG. La secuencia en esta región se lee: 5'-GGCACTCACCATGGGTGACAGAA-3', en que ACA codifica el 2<sup>a</sup> residuo aminoacídico de OtsB. Se obtiene la fusión correcta de ACA con **ATG** después de 3 etapas de amplificación por PCR consecutivas con ADN polimerasa Vent®.

### **Etapa 1.**

Cebador directo: 5'-GGCACTCACCATGACAGAACCGTTAACC-3'.

Cebador inverso: 5'-GCTCTAGACTACGCAAGCTTTGGAAAGGTAGC-3', en que **CTA** es el complemento del codón de terminación TAG del cistron *otsA* y la secuencia TCTAGA es un sitio de restricción de *XbaI*.

10 El fragmento de ADN de 2216 pb amplificado engloba la región de codificación de *otsB-otsA*.

### **Etapa 2.**

Cebador directo: 5'-GCGTCGACGGCAATAGTTACCCTTATTATCAAG-3', en que GTCGAC coincide con el sitio de restricción de *SaI* en pNZEcTre0.

15 Cebador inverso: 5'-GGTTAACGGTTCTGT**CAT**GGTGAGTGCC-3', en que **CAT** es el complemento del codón iniciador que precede a *otsB*.

El fragmento de ADN de 1256 pb amplificado engloba el gen de resistencia a cloranfenicol, el promotor  $P_{nis}$ , el sitio de unión a ribosoma *nisA* y el codón iniciador ATG fusionado con la región de codificación de *otsB*.

### **Etapa 3.**

20 Se mezclan el fragmento de ADN de 2216 pb de la etapa 1 y el fragmento de ADN de 1256 pb de la etapa 2 en cantidades equimolares y se someten a amplificación por PCR con ADN polimerasa Vent®, usando 5'-GCGTCGACGGCAATAGTTACCCTTATTATCAAG-3' y 5'-GCTCTAGACTACGCAAGCTTTGGAAAGGTAGC-3' como cebadores de codificación e inverso, respectivamente. Se digiere el fragmento de ADN de 3444 pb amplificado con *SaI* y *XbaI* y se liga con un fragmento *SaI-XbaI* que lleva el replicón de pNZ8048. Se obtienen transformantes en NZ9000 y se aíslan sus plásmidos como se describe anteriormente.

25 Se designa un plásmido representativo, cuya estructura puede identificarse mediante análisis por enzimas de restricción con *SaI*, *XbaI*, *BglII*, *NcoI* y combinaciones de las mismas, como pNZEcTre1 (Fig. 2). Finalmente, se verifica la secuencia de la región que engloba el promotor  $P_{nis}$ , el sitio de unión a ribosoma *nisA* y la conexión del ATG iniciador con la región de codificación de *otsB*.

### **Ejemplo 2: Inducción del operón de biosíntesis de trehalosa clonado en *L. lactis***

30 Se cultivan las cepas NZ9000 de *L. lactis* [pNZEcTre1] y NZ9000 de *L. lactis* como cultivos en reposo a 30°C durante una noche en medio M17 (Difco, Detroit, EE.UU.) suplementado con 0,5% de glucosa (=medio GM17). Se diluyen los cultivos 100 veces con medio reciente y se incuban durante otras 3 h a 30°C. Se recogen las células mediante centrifugación y se resuspenden en el volumen original de medio BM9G (medio M9 tamponado a pH 8,5 y que contiene 0,5% de glucosa; Schotte *et al.*, 2000). Se añade nisina (Aplin&Barrett) a una concentración final de 0,4

35  $\mu\text{g/ml}$  y se incuban los cultivos adicionalmente durante hasta 48 h. En varios puntos temporales, se toman muestras, se recogen las células mediante centrifugación y se lisan mediante la adición de lisozima (5 mg/ml) y mutanolisina (100 U/ml). La PAGE-SDS revela la inducción dependiente de nisina (Kuipers *et al.*, 1998) de dos bandas de proteínas adicionales en NZ9000 de *L. lactis* [pNZEcTre1]. Sus masas moleculares de 53,6 kDa y 29,1 kDa cuadran con la masa molecular de trehalosa-6-fosfato sintasa (OtsA) y trehalosa-6-fosfato fosfatasa (OtsB) de *E. coli*, respectivamente (Fig. 3). Están ausentes de NZ9000 de *L. lactis*, independientemente de la adición de nisina. La velocidad de crecimiento de NZ9000 [pNZEcTre1] inducida se rebaja en gran medida tan pronto como 3 h después de la adición de nisina (Fig. 4). La cepa NZ9000 no está afectada en su velocidad de crecimiento en presencia de nisina.

### **Ejemplo 3: Protocolo de inducción optimizada para la biosíntesis de trehalosa en *L. lactis***

45 Se cultiva la cepa NZ9000 [pNZEcTre1] hasta saturación como cultivo en reposo a 30°C en GM17Cm (= GM17 que contiene 5  $\mu\text{g}$  de cloranfenicol por ml) y se diluye 3 veces con medio reciente que contiene 0,4  $\mu\text{g}$  de nisina/ml. Se continúa la incubación a 30°C con agitación a 200 rpm durante 8 h. La velocidad de crecimiento del cultivo no está afectada por la adición de nisina. Se alcanza la saturación después de 3 h de incubación. La inducción de OtsA y OtsB puede identificarse claramente por PAGE-SDS. Se determina la concentración de trehalosa convirtiendo la

50 trehalosa en glucosa con trehalasa (cortesía de J. Thevelein, Dept. of Molecular Microbiology, VIB-K.U.Leuven, Bélgica), que se mide mediante un protocolo de ensayo de glucosa (Trinder, 1969).

Se lisan las células con lisozima y mutanolisina mediante incubación en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,25 M durante 1 hora a 37°C y durante 20 min a 95°C. Se retira el desecho celular mediante centrifugación a 13.200 rpm. Se añaden a un volumen

de sobrenadante 0,5 volúmenes de HAc 1 M y 0,5 volúmenes de tampón, consistente en NaAc 300 mM y CaCl<sub>2</sub> 30 mM, pH 5,5. Se incuba la mezcla durante 2 h a 37°C en presencia de trehalasa. Después de centrifugar a 13.200 rpm, se suplementa el sobrenadante con reactivo de Trinder (glucosa oxidasa, fenol y 4-aminofenazona; Dialab, Austria) y se incuba con agitación durante 15 min a 30°C, después de lo cual se registra automáticamente la DO<sub>505</sub> en un lector de microplacas ajustable de 96 pocillos VersaMax (Molecular Devices, USA). Se leen las concentraciones experimentales de trehalosa de una curva de calibración, obtenida con trehalosa pura (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, EE.UU.), mostrando una correlación lineal entre el valor de DO<sub>505</sub> y la concentración de trehalosa hasta trehalosa 10 mM. Se muestra en la Fig. 5 la acumulación de trehalosa en NZ9000 [pNZEcTre1] inducida con nisina como se describe anteriormente. Se alcanza la concentración máxima después de 3 h y coincide con el punto temporal en que el cultivo alcanza la saturación.

#### Ejemplo 4: Liofilización de cultivos de *L. lactis* y condiciones de almacenamiento

Se cultiva la cepa NZ9000 [pNZEcTre1] hasta saturación como cultivo en reposo a 30°C en GM17Cm y se diluye 3 veces con medio reciente con o sin nisina (0,4 µg/ml). Se continúa la incubación a 30°C con agitación a 200 rpm durante 3 h. Se recogen las células mediante centrifugación a 5000 rpm, se resuspenden en el volumen original de leche desnatada al 10% (p/v) (Difco, Becton Dickinson) y se mantienen en hielo hasta que están listas para liofilización.

Se efectuaron todas las tandas de liofilización por triplicado. Se rellenan con una muestra que contiene aproximadamente 2 g de células (peso húmedo) viales estériles (vidrio de tipo 1, Gaash Packaging, Mollem, Bélgica). Se cubren los viales con un terminador de liofilización (V9032 FM 257/2 SAF1, bromobutilo con silicato de magnesio como relleno, Helvoet Pharma, Alken, Bélgica). Se cargan los viales en la cámara de producción preenfriada (-25°C) del liofilizador (Leybold GT4, Finn-aqua, Santasalo, Sohlberg, Alemania) antes de enfriar a -45°C durante un periodo de 105 min a 100 kPa. Se efectúa el secado primario (12 h) a -15°C y a 0,08 a 0,1 kPa; el secado secundario (9 h) a 10°C y 0,01 a 0,02 kPa. Después de liofilizar, se cierran los viales a vacío.

Se almacenan los viales en diferentes condiciones: (a) 8°C y 10% de humedad relativa (HR), (b) 8°C y 60% de HR (c) 20°C y 10% de HR.

Se determina el contenido de agua del cultivo liofilizado usando un titulador Mettler DL35 Karl Fisher (Mettler-Toledo, Beersel, Bélgica). Se agitan las mezclas en el medio de reacción durante 60 s. Después de ello, se titula el agua con Hydranal® Composite 5 (Riedel-de Haën, Seelze, Alemania). Se efectúa el análisis por triplicado.

#### Ejemplo 5: Viabilidad de muestras liofilizadas de cultivos inducidos y no inducidos en diferentes condiciones de almacenamiento.

Para determinar la viabilidad en el polvo liofilizado, se disuelven 0,1 g de polvo en 1 ml de agua estéril. Se determina la viabilidad de las bacterias siguiendo el crecimiento en un Bioscreen (Labsystems). Con este fin, se realizan diluciones en serie de los cultivos, se inoculan a 1/100 en GM17c reciente y se cargan por triplicado en los pocillos del Bioscreen. Se registran automáticamente los valores de DO<sub>600</sub> a los intervalos dados durante un periodo de 21 h. Se calcula el tiempo necesario para alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) a mitad de camino entre la DO<sub>600</sub> mínima y máxima (50% del tiempo) basándose en la fase de crecimiento exponencial. Se representa este 50% del tiempo frente al logaritmo natural de la viabilidad y se calcula la ecuación de la curva patrón. Se determina la viabilidad de la muestra liofilizada basándose en la curva patrón del cultivo de partida y se expresa como porcentaje del teórico. Los valores de viabilidad de las muestras como se determinan por este procedimiento corresponden muy bien con los resultados obtenidos sembrando y contando colonias.

La Tabla 1 resume la viabilidad medida de cultivos de NZ9000 [pNZEcTre1] inducidos (que contienen trehalosa) o no inducidos (exentos de trehalosa), liofilizados y almacenados en diferentes condiciones de temperatura y humedad relativa. La viabilidad se expresa como el porcentaje de viabilidad del cultivo respectivo antes de la etapa de liofilización.

#### Ejemplo 6: La acumulación interna de trehalosa protege a *L. lactis* ante la exposición a bilis de buey

Se indujo con nisina (0,4 µg/ml) un cultivo de una noche saturado de NZ9000 de *L. lactis* [pNZEcTre1] durante 3 horas a 30°C y 200 rpm en un baño de agua agitada. Se usó el mismo cultivo, sin adición de nisina, como control. Se centrifugó el cultivo saturado y se resuspendió en agua estéril doblemente destilada con diferentes concentraciones fisiológicas de bilis de buey. Se incubaron las suspensiones durante un total de 4 horas a 37°C y se tomaron muestras después de 0, 0,5, 2 y 4 horas de incubación. Se sembraron las muestras en GM17Cm y se incubaron las placas durante 24 horas a 30°C. Se expresaron los resultados en unidades formadoras de colonia (ufc, tabla 2) o como porcentaje de colonias viables, respecto a la cantidad inicial de ufc (tabla 3). Se muestra en la Figura 6 una representación gráfica de los resultados después de 0,5 horas de exposición a bilis de buey. Se comprobó la acumulación de trehalosa en los cultivos inducidos con nisina, y alcanzó una concentración de 60 mg/g ph. Aunque la inducción con nisina da como resultado por su parte una reducción de las ufc en el cultivo inicial, la supervivencia en presencia de bilis de buey es claramente mejor en el caso de acumulación de trehalosa.

Los resultados son aún más notables si el cultivo se liofiliza antes de aplicar el estrés de bilis de buey. Se indujo con nisina un cultivo de una noche saturado de NZ9000 de *L. lactis* [pNZEcTre1] durante 3 h a 30°C y 200 rpm en un baño de agua agitada. Se usó el mismo cultivo, sin adición de nisina, como control. Se liofilizaron ambos conjuntos de cultivo y, después de liofilizar, se disolvió el polvo en agua estéril doblemente destilada y se añadieron diferentes concentraciones fisiológicas de bilis de buey. Se incubaron las suspensiones durante un total de 4 horas a 37°C y se tomaron muestras después de 0, 0,5, 2 y 4 horas de incubación. Se sembraron las muestras en GM17Cm y se incubaron las placas durante 24 horas a 30°C. Se expresaron los resultados en unidades formadoras de colonia (ufc, tabla 4) o como porcentaje de colonias viables, respecto a la cantidad inicial de ufc (tabla 5).

La acumulación de trehalosa en los cultivos inducidos con nisina era de 58 mg/g ph de células. Las células con acumulación interna de trehalosa mantienen mejor su viabilidad, tanto después de liofilización como tras exposición a bilis de buey (tablas 4 y 5). La Figura 7 muestra el resultado después de 4 horas de exposición a bilis de buey.

#### **Ejemplo 7: La acumulación interna de trehalosa protege a *L. lactis* ante la alta acidez en el medio**

Se indujo con nisina (0,4 µg/ml) un cultivo de una noche de NZ9000 de *L. lactis* [pNZEcTre1] durante 3 horas a 30°C y 200 rpm en un baño de agua agitada. Se usó el mismo cultivo, sin adición de nisina, como control. Se liofilizaron ambos conjuntos de cultivo y, después de liofilizar, se disolvió el polvo en agua estéril doblemente destilada y se añadieron diferentes concentraciones de jugo gástrico (postoperatorio, pH 2,95).

Se incubaron las suspensiones durante un total de 2 horas a 37°C y se tomaron muestras después de 0, 0,05, 1 y 2 horas de incubación. Se sembraron las muestras en GM17Cm y se incubaron las placas durante 24 horas a 30°C. Se expresaron los resultados en unidades de formación de colonia (ufc, tabla 6) o como porcentaje de colonias viables, respecto a la cantidad inicial de ufc (tabla 7). Se da en la Figura 8 una representación gráfica de los resultados relativos (% de ufc después del tratamiento calculado por las ufc iniciales) después de 0,5 h. La acumulación interna de trehalosa protege claramente a *L. lactis* ante la alta acidez del jugo gástrico.

#### **Ejemplo 8: La trehalosa interna asegura una mayor productividad de una molécula profiláctica y/o terapéutica después de liofilización**

##### **Construcción de pT1hIL10aPxA**

La construcción del plásmido pT1hIL10aPxA es análoga a la del plásmido que contiene IL-10 de murino (Schotte *et al.*, 2000). Contiene el gen de hIL-10 fusionado con la secuencia líder de secreción *usp45*, precedido del sitio de unión a ribosoma del gen 10 del colifago T7 y el promotor P1. La secuencia del gen de IL-10 es una sintética en la que se adaptó el uso de codón al uso de codón preferido en *L. lactis* y en la que se reemplazó el residuo de prolina, el primer aminoácido de la proteína madura en IL-10 humana nativa, por un residuo de alanina. Se transformó el plásmido en la cepa MG1363 de *L. lactis*, según Wells *et al.*, 1993.

##### **Construcción de pNZEcTre1-hIL10aPxA**

Se obtiene el plásmido pNZEcTre1-hIL10aPxA mediante amplificación por PCR con ADN polimerasa Vent® (NEB) del módulo de expresión de hIL-10 a partir del plásmido pT1hIL10aPxA y las siguientes secuencias cebadoras: 5'-GCACTAGTGAATTCGATTAAGTCATCTTACC-3' y 5'-CGACTAGTTAGTTTCGTATCTTCATTGTCATGTAG-3', en que ACTAGT es un sitio de restricción de *SpeI*. Se digiere el fragmento de ADN de 796 pb amplificado con *SpeI*, se liga con el plásmido pNZEcTre1 abierto con *XbaI* y se transforma mediante electroporación en la cepa NZ9000 de *L. lactis*. Se obtienen transformantes como se describe por Wells *et al.* (1993). Se verifica la dirección de la secuencia del módulo de expresión de hIL-10 clonado (Fig. 11).

Se indujo con nisina (0,4 µg/ml) un cultivo de una noche saturado de NZ9000 de *L. lactis* [pNZEcTre1-hIL10aPxA] durante 3 horas a 30°C y 200 rpm en un agitador orbital. Se usó el mismo cultivo sin nisina como control, así como un cultivo no inducido de MG1363 de *L. lactis* [pT1hIL10aPxA]. Se liofilizaron los cultivos como se describe en el ejemplo 4. Después de liofilizar, se redisolvió el polvo en el volumen original de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 50 mM que comprende 0,5% de glucosa. Se incubó esta solución a 37°C. Se tomaron muestras después de 0, 2, 4 y 6 horas y se determinó la cantidad de hIL-10 mediante un ensayo ELISA (se recubrieron placas Maxisorp F96 (Nunc) durante una noche con anticuerpo de rata anti-IL-10 humana (BD)). Se bloquearon las placas con una solución de caseína al 0,1% durante 2 horas. Se cargaron en las placas diluciones en serie y sobrenadantes de patrón de hIL-10 recombinante (BD). Se detectó la hIL-10 unida con anticuerpo de rata anti-IL-10 humana (BD) y estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano picante (BD). Se revelaron las placas con sustrato TMB (BD). Se detuvo la reacción después de 30 minutos con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. Se midió la absorbancia a 450 nm con 595 nm como longitud de onda de referencia, así como las ufc por siembra. Se muestran en la figura 9 y 10 los resultados de la producción de hIL-10 en función del volumen de cultivo y el número de ufc después de 8 horas de incubación. La producción de la cepa acumuladora de trehalosa es siempre mayor, independientemente del modo de calcular el rendimiento, indicando que no solo la supervivencia es mejor, sino también la capacidad de producción por ufc.

TABLAS

**Tabla 1:** Porcentajes de supervivencia de NZ9000 [pNZEcTre1] después de liofilización

Condiciones de almacenamiento	Periodo de almacenamiento	Inducida	No inducida
Directamente después de liofilización		96%	47%
8°C, 10% de HR	1 semana	100%	49%
	4 semanas	109%	37%
8°C, 60% de HR	1 semana	103%	15%
	4 semanas	86%	6%
20°C, 10% de HR	1 semana	67%	19%
	4 semanas	46%	8%

5

**Tabla 2:** Efecto de la acumulación de trehalosa en cultivos inducidos con nisina sobre la supervivencia a diferentes concentraciones de bilis de buey, expresado como unidades formadoras de colonia

ufc/ml	Después de 0 h		Después de 0,5 h		Después de 2 h		Después de 4 h	
	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina
Antes de AC	2,68x10 <sup>9</sup>	1,26x10 <sup>9</sup>	2,68x10 <sup>9</sup>	1,26x10 <sup>9</sup>	2,68x10 <sup>9</sup>	1,26x10 <sup>9</sup>	2,68x10 <sup>9</sup>	1,26x10 <sup>9</sup>
Después de AC	3,16x10 <sup>9</sup>	1,57x10 <sup>9</sup>	3,16x10 <sup>9</sup>	1,57x10 <sup>9</sup>	3,16x10 <sup>9</sup>	1,57x10 <sup>9</sup>	3,16x10 <sup>9</sup>	1,57x10 <sup>9</sup>
0% de bilis de buey	3,16x10 <sup>9</sup>	1,57x10 <sup>9</sup>	3,44x10 <sup>9</sup>	1,56x10 <sup>9</sup>	3,29x10 <sup>9</sup>	1,48x10 <sup>9</sup>	2,84x10 <sup>9</sup>	1,36x10 <sup>9</sup>
0,13% de bilis de buey	3,38x10 <sup>9</sup>	1,61x10 <sup>9</sup>	1,12x10 <sup>9</sup>	1,07x10 <sup>9</sup>	2,87x10 <sup>9</sup>	4,10x10 <sup>7</sup>	6,00x10 <sup>4</sup>	1,48x10 <sup>7</sup>
0,33% de bilis de buey	3,43x10 <sup>9</sup>	1,30x10 <sup>9</sup>	1,12x10 <sup>7</sup>	1,44x10 <sup>7</sup>	3,00x10 <sup>4</sup>	7,00x10 <sup>4</sup>	<1,00x10 <sup>3</sup>	<1,00x10 <sup>3</sup>
0,67% de bilis de buey	3,28x10 <sup>9</sup>	1,41x10 <sup>9</sup>	3,51x10 <sup>7</sup>	5,38x10 <sup>7</sup>	5,06x10 <sup>6</sup>	2,05x10 <sup>5</sup>	<1,00x10 <sup>3</sup>	<1,00x10 <sup>3</sup>

**Tabla 3:** Efecto de la acumulación de trehalosa en cultivos inducidos con nisina sobre la supervivencia a diferentes concentraciones de bilis de buey, expresado como porcentaje de la concentración inicial

%	Después de 0 h		Después de 0,5 h		Después de 2 h		Después de 4 h	
	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina
Antes de AC	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Después de AC	118%	124%	118%	124%	118%	124%	118%	124%
0% de bilis de buey	118%	124%	128%	123%	123%	118%	106%	108%
0,13% de bilis de buey	126%	128%	42%	85%	0%	3%	0%	1%
0,33% de bilis de buey	128%	103%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
0,67% de bilis de buey	122%	112%	1%	4%	0%	0%	0%	0%

**Tabla 4:** Efecto de la acumulación de trehalosa en cultivos inducidos con nisina sobre la supervivencia de cultivos liofilizados a diferentes concentraciones de bilis de buey, expresado como unidades formadoras de colonia

ufc/ml	Después de 0 h		Después de 0,5 h		Después de 2 h		Después de 4 h	
	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina
Antes de lio.	3,33x10 <sup>9</sup>	1,33x10 <sup>9</sup>						
Después de lio.	2,02x10 <sup>9</sup>	1,28x10 <sup>9</sup>						
0% de bilis de buey	2,02x10 <sup>9</sup>	1,28x10 <sup>9</sup>	2,16x10 <sup>9</sup>	1,23x10 <sup>9</sup>	1,72x10 <sup>9</sup>	1,20x10 <sup>9</sup>	1,73x10 <sup>9</sup>	1,10x10 <sup>9</sup>
0,13% de bilis de buey	1,71x10 <sup>9</sup>	1,13x10 <sup>9</sup>	2,04x10 <sup>9</sup>	1,09x10 <sup>9</sup>	1,59x10 <sup>9</sup>	1,21x10 <sup>9</sup>	1,65x10 <sup>9</sup>	1,07x10 <sup>9</sup>
0,33% de bilis de buey	1,93x10 <sup>9</sup>	1,11x10 <sup>9</sup>	1,54x10 <sup>9</sup>	1,08x10 <sup>9</sup>	1,31x10 <sup>9</sup>	1,06x10 <sup>9</sup>	9,15x10 <sup>8</sup>	9,05x10 <sup>8</sup>
0,67% de bilis de buey	1,29x10 <sup>9</sup>	1,07x10 <sup>9</sup>	1,14x10 <sup>9</sup>	1,11x10 <sup>9</sup>	1,04x10 <sup>9</sup>	7,53x10 <sup>8</sup>	8,35x10 <sup>8</sup>	8,41x10 <sup>8</sup>

5 **Tabla 5:** Efecto de la acumulación de trehalosa en cultivos inducidos con nisina sobre la supervivencia de cultivos liofilizados a diferentes concentraciones de bilis de buey, expresado como porcentaje de la concentración inicial

%	Después de 0 h		Después de 0,5 h		Después de 2 h		Después de 4 h	
	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina
Antes de lio.	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Después de lio.	61%	96%	61%	96%	61%	96%	61%	96%
0% de bilis de buey	61%	96%	65%	92%	52%	90%	52%	83%
0,13% de bilis de buey	51%	85%	61%	82%	48%	91%	50%	80%
0,33% de bilis de buey	58%	83%	46%	81%	39%	79%	27%	68%
0,67% de bilis de buey	39%	81%	34%	84%	31%	57%	25%	63%

**Tabla 6:** Efecto de la acumulación de trehalosa en cultivos inducidos con nisina sobre la supervivencia de cultivos liofilizados a diferentes concentraciones de jugo gástrico, expresado como unidades formadoras de colonia

Ufc/ml	Después de 0 h		Después de 0,5 h		Después de 2 h		Después de 4 h	
	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina
Antes de lio.	2,80x10 <sup>9</sup>	1,20x10 <sup>9</sup>						
Después de lio.	2,05x10 <sup>9</sup>	1,17x10 <sup>9</sup>						
0% de jugo gástrico	2,05x10 <sup>9</sup>	1,17x10 <sup>9</sup>	1,82x10 <sup>9</sup>	1,25x10 <sup>9</sup>	1,75x10 <sup>9</sup>	1,38x10 <sup>9</sup>	1,86x10 <sup>9</sup>	1,20x10 <sup>9</sup>
25% de jugo gástrico	2,06x10 <sup>9</sup>	8,54x10 <sup>8</sup>	1,55x10 <sup>8</sup>	7,14x10 <sup>8</sup>	1,03x10 <sup>8</sup>	6,77x10 <sup>7</sup>	6,07x10 <sup>7</sup>	1,58x10 <sup>7</sup>
50% de jugo gástrico	1,63x10 <sup>9</sup>	8,33x10 <sup>8</sup>	1,06x10 <sup>8</sup>	5,27x10 <sup>8</sup>	5,81x10 <sup>7</sup>	3,61x10 <sup>7</sup>	3,13x10 <sup>7</sup>	1,29x10 <sup>7</sup>
75% de jugo gástrico	2,10x10 <sup>9</sup>	9,54x10 <sup>8</sup>	1,26x10 <sup>7</sup>	2,41x10 <sup>7</sup>	9,00x10 <sup>6</sup>	1,37x10 <sup>6</sup>	4,81x10 <sup>6</sup>	9,18x10 <sup>6</sup>

**Tabla 7:** Efecto de la acumulación de trehalosa en cultivos inducidos por nisina sobre la supervivencia de cultivos liofilizados a diferentes concentraciones de jugo gástrico, expresado como porcentaje de concentración inicial

%	Después de 0 h		Después de 0,5 h		Después de 2 h		Después de 4 h	
	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina	-nisina	+nisina
Antes de lio.	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Después de lio.	73%	98%	73%	98%	73%	98%	73%	98%
0% de jugo gástrico	73%	98%	65%	104%	62%	115%	67%	101%
25% de jugo gástrico	74%	71%	6%	60%	4%	6%	2%	1%
50% de jugo gástrico	58%	70%	4%	44%	2%	3%	1%	1%
75% de jugo gástrico	75%	80%	0%	2%	0%	1%	0%	1%

REFERENCIAS

- Andersson, U., Levander, F. y Radström, P. (2001) "Trehalose-6-phosphate phosphorylase is part of a novel metabolic pathway for trehalose utilization in *Lactococcus lactis*". *J. Biol. Chem.*, 276, 42707-42713.
- 10 - Conrad, P.B., Miller, D.P., Cielenski, P.R. y de Pablo, J.J. (2000) "Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices". *Cryobiology* 41, 17-24.
- Gaudu, P., Vido, K., Cesselin, B., Kulakauskas, S., Tremblay, J., Rezaiki, L., Lambert, G., Sourice, S., Duwat, P y Gruss, A. (2002) "Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*". *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 263-269.
- 15 - Jensen, J.B., Peters, N.K. y Rhuvanawari, T.V. (2002) "Redundancy in periplasmic binding protein-dependent transport systems for trehalose, sucrose and maltose in *Sinorhizobium meliloti*". *J. Bacteriol.*, 184, 2978-2986.

- Kaasen, I., McDougall, J. y Strom, A.R. (1994) "Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex". Gene 145, 9-15.
- 5 – Kuipers, O., De Ruyter, P., Kleerebezem, M. y De Vos, W. (1998) "Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria". J. Biotechnol. 64, 15-21.
- Li, Y., Hugenholtz, J., Abee, T y Molenaar, D. (2003) "Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress". Appl. Environ. Microbiol., 69, 5739-5745.
- Padilla, L., Krämer, R., Stephanopoulos, G y Agosin, E. (2004) "Overproduction of trehalose: heterologous expression of *Escherichia coli* trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in *Corynebacterium glutamicum*". Appl. Environ. Microbiol., 70, 370-376.
- 10 – Ruyter, P., Kuipers, O. y De Vos, W. (1996) "Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin". Appl. Environ. Microbiol. 62, 3662-3667.
- Schotte, L., Steidler, L., Vandekerckhove, J. y Remaut, E. (2000) "Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*". Enzyme Microb. Technol. 27, 761-765.
- 15 – Trinder, P. (1969) "Determination of blood glucose using 4-aminophenazone as oxygen receptor". J. Clin. Pathol. 22, 246.
- Wells, J.M., Wilson, P.W. y Le Page, R.W. (1993) "Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*". J. Appl. Bacteriol. 74, 629-636.
- 20 – Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. y Graham, M.W. (1989) Nucl. Acids Res. 17, 3469-3478.

## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> VIB vzw
- <120> Procedimiento para mejorar la conservación de lactococos
- <130> ERE/tre/V188
- 25 <150> EP04104001.5
- <151> 20-08-2004
- <150> EP05102856.1
- <151> 12-04-2005
- <160> 11
- 30 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 32
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> cebador directo
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (9) .. (11)
- 40 <223> codón iniciador del cistrón *otsB*
- <220>

<221> misc\_feature  
 <222> (3) .. (8)  
 <223> sitio de restricción de *Nco*I  
 <400> 1  
 5 **gcccatgggt gacagaaccg ttaaccgaaa cc** 32  
 <210> 2  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> cebador inverso  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3) .. (8)  
 15 <223> sitio de restricción de *Xba*I  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9) .. (11)  
 <223> complemento del codón de terminación TAG del cistrón *otsA*  
 20 <400> 2  
**gctctagact acgcaagctt tggaaaggta gc** 32  
 <210> 3  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> plásmido recombinante  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (11) .. (13)  
 <223> el segundo residuo aminoacídico de *OtsB*  
 <400> 3  
**ggcactcacc atgggtgaca gaa** 23  
 <210> 4  
 35 <211> 28  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo  
 <400> 4  
 5 **ggcactcacc atgacagaac cgtaacc** 28  
 <210> 5  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> cebador inverso  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3) .. (8)  
 15 <223> un sitio de restricción de *Xba*I  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9) .. (11)  
 <223> complemento del codón de terminación TAG del cistrón *otsA*  
 20 <400> 5  
**gctctagact acgcaagctt tggaaaggta gc** 32  
 <210> 6  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (3) .. (8)  
 <223> coincide con el sitio de restricción de *Sa*I en pNZEcTre0  
 <400> 6  
**gcgtcgacgg caatagttac ccttattac aag** 33  
 <210> 7  
 35 <211> 28  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso  
 <220>  
 5 <221> misc\_feature  
 <222> (16) .. (18)  
 <223> CAT es el complemento del codón iniciador que precede a otsB  
 <400> 7  
  
**ggttaacggt tctgcatgg tgagtgcc 28**  
 10 <210> 8  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> cebador  
 <400> 8  
  
**gcgtcgacgg caatagttac ccttattac aag 33**  
 <210> 9  
 <211> 32  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 9  
  
**gctctagact acgcaagctt tggaaaggta gc 32**  
 25 <210> 10  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> cebador para la construcción de pNZEcTre1-hIL10aPxA  
 <400> 10  
  
**gcactagtga attcgattaa gtcattctac c 31**  
 <210> 11  
 35 <211> 35  
 <212> ADN

## ES 2 439 698 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para la construcción de pNZEcTre1-hIL10aPxA

<400> 11

5 cgactagta gttcgtatc ttcattgtca tgtag 35

**REIVINDICACIONES**

1. Una cepa aislada de *Lactococcus sp.* que comprende:
  - (a) un gen de trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogo, o
  - (b) un gen de trehalosa-6-fosfato sintasa y un gen de trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogos,
- 5 en los que la actividad trehalosa-6-fosfato fosforilasa está inactivada.
2. Una cepa aislada de *Lactococcus sp.* según la reivindicación 1, en la que uno o ambos genes de (a) o (b) están ligados operativamente con el promotor de *L. lactis* inducible por nisina.
3. Una cepa aislada de *Lactococcus sp.* según la reivindicación 1, en la que uno o ambos genes de (a) o (b) están ligados funcionalmente con el promotor constitutivo P1.
- 10 4. Una cepa aislada de *Lactococcus sp.* según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el gen de trehalosa-6-fosfato sintasa heterólogo es el gen OtsA de *Escherichia coli*.
5. Una cepa aislada de *Lactococcus sp.* según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el gen de trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogo es el gen OtsB de *Escherichia coli*.
- 15 6. Una cepa aislada de *Lactococcus sp.* según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho *Lactococcus sp.* es *Lactococcus lactis*.
7. El uso de la acumulación de trehalosa en el citoplasma y/o membrana citoplasmática de *Lactococcus sp.* para mejorar su resistencia a condiciones ácidas y/o para mejorar su resistencia a sales biliares, en el que dicha cepa aislada de *Lactococcus sp.* comprende:
  - (a) un gen de trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogo, o
  - 20 (b) un gen de trehalosa-6-fosfato sintasa y un gen de trehalosa-6-fosfato fosfatasa heterólogos.
8. El uso de la acumulación de trehalosa en el citoplasma y/o la membrana citoplasmática de *Lactococcus sp.* según la reivindicación 7 para mejorar la resistencia al estrés combinado, en el que dicho estrés combinado es una combinación de liofilización con condiciones ácidas y/o sales biliares.
9. El uso de la acumulación de trehalosa en el citoplasma y/o la membrana citoplasmática de *Lactococcus sp.* según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en el que la actividad trehalosa-6-fosfato fosforilasa está inactivada.
- 25 10. El uso de la acumulación de trehalosa en el citoplasma y/o la membrana citoplasmática de *Lactococcus sp.* según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que el gen de trehalosa-6-fosfato sintasa heterólogo es el gen OtsA de *Escherichia coli*.
11. El uso de la acumulación de trehalosa en el citoplasma y/o la membrana citoplasmática de *Lactococcus sp.* según cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que el gen de trehalosa-6-fosfato sintasa heterólogo es el gen OtsB de *Escherichia coli*.
- 30 12. El uso de la acumulación de trehalosa en el citoplasma y/o la membrana citoplasmática de *Lactococcus sp.* según cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en el que dicho *Lactococcus sp.* es *L. Lactis*.
13. El uso de una cepa aislada de *Lactococcus* según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la preparación de un medicamento para el suministro de una molécula profiláctica y/o terapéutica.
- 35

Fig. 1

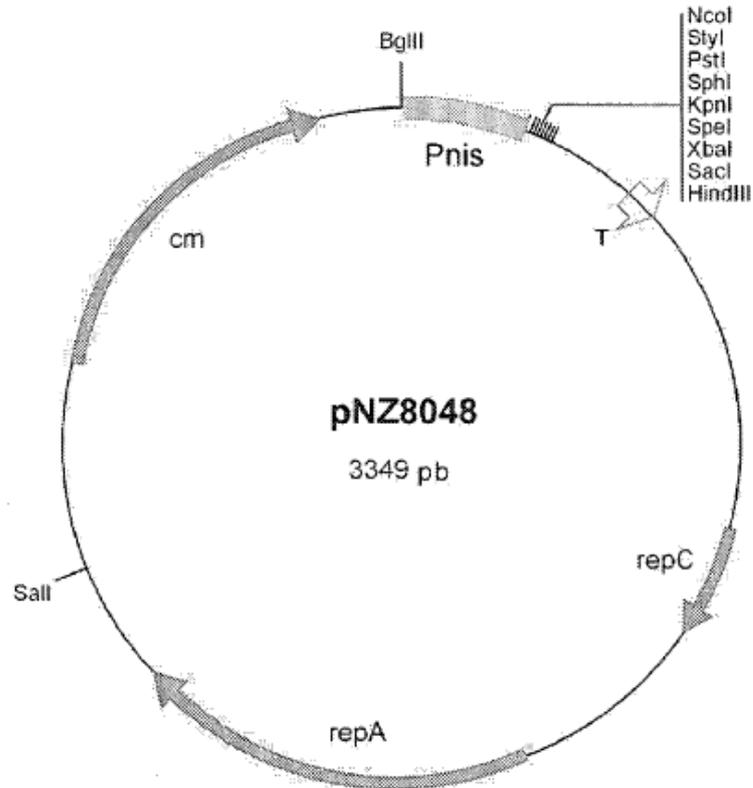


Fig. 2

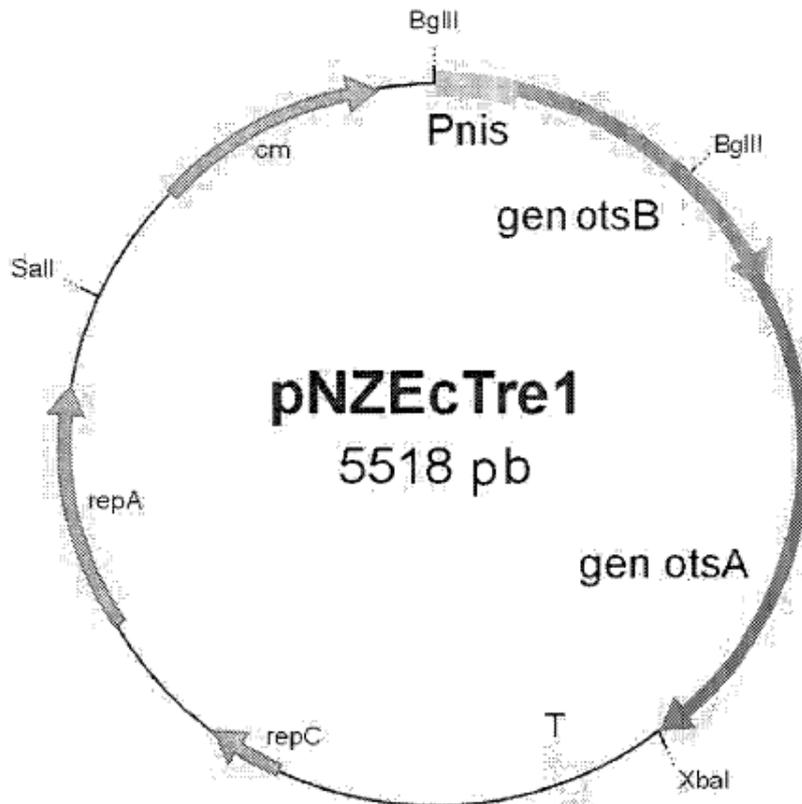


Fig. 3:

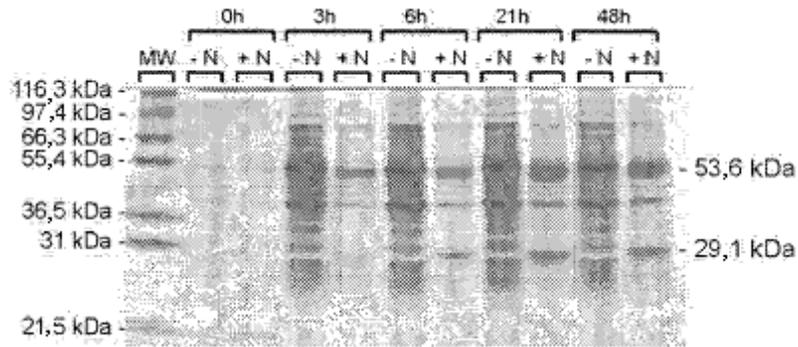


Fig. 4:

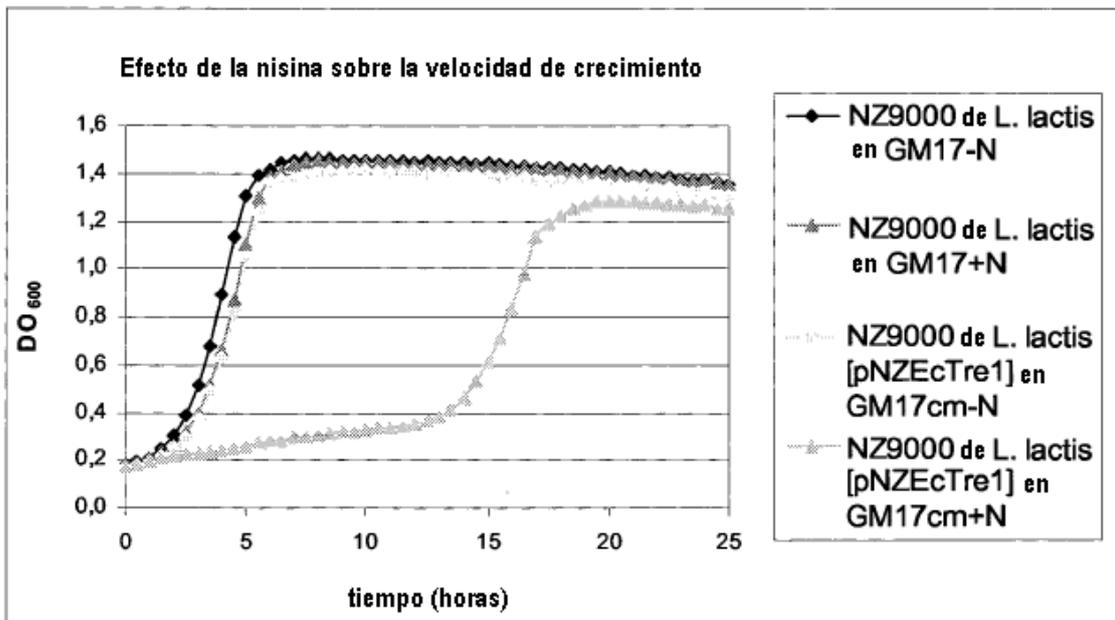


Fig. 5:

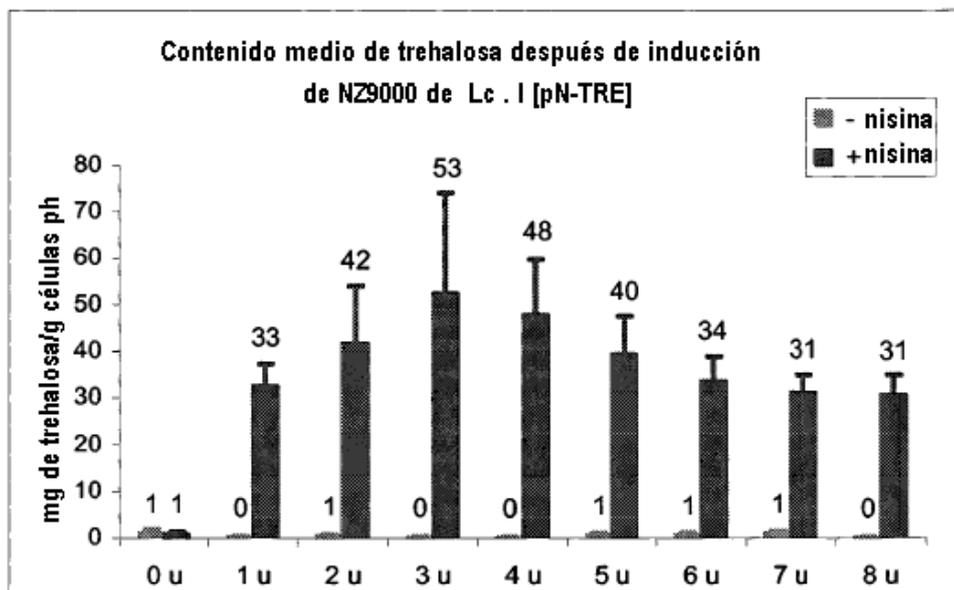


Fig. 6:

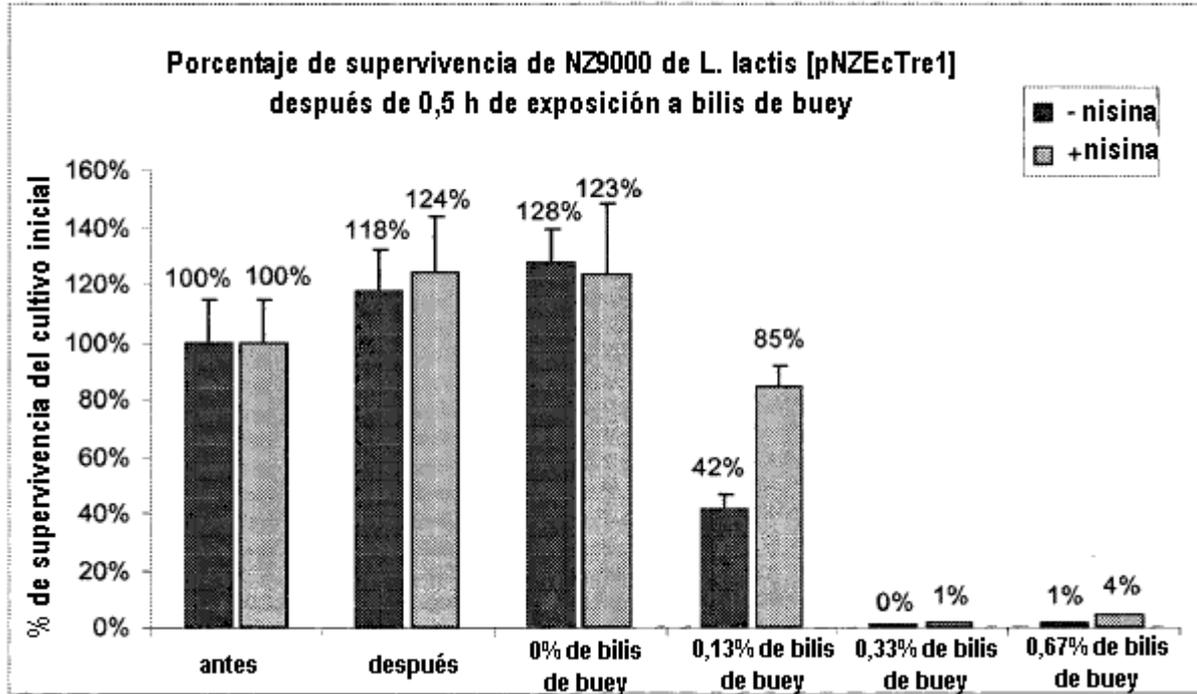


Fig. 7:

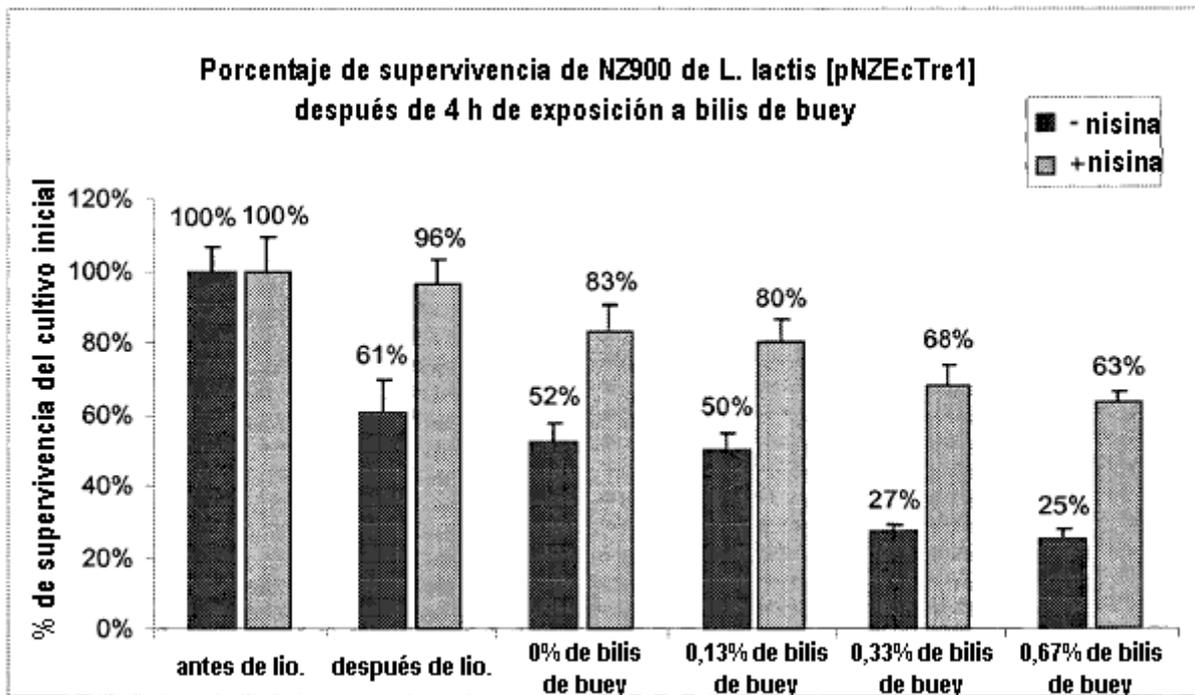


Fig. 8:

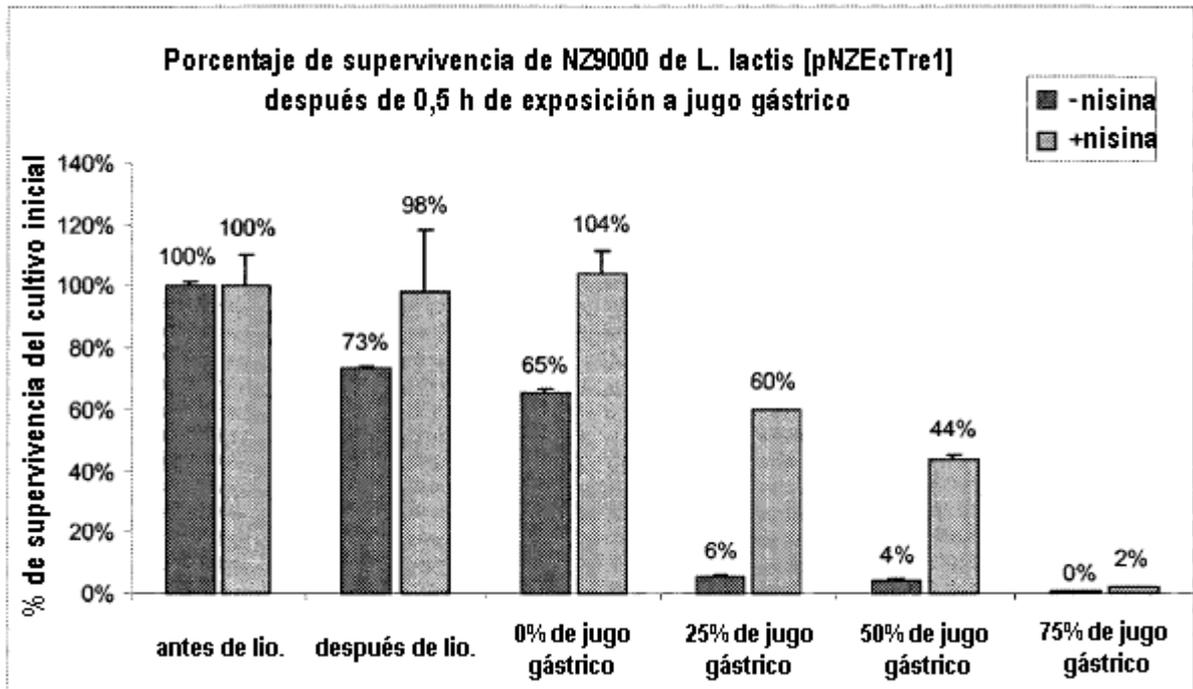


Fig. 9:

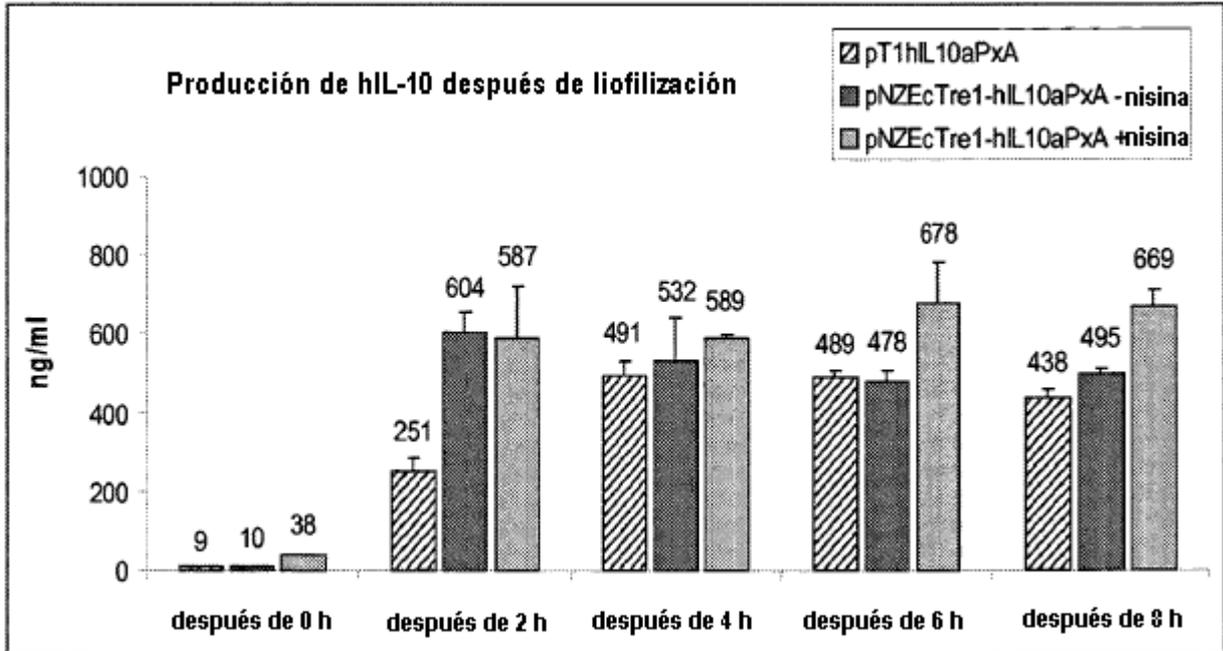


Fig. 10:

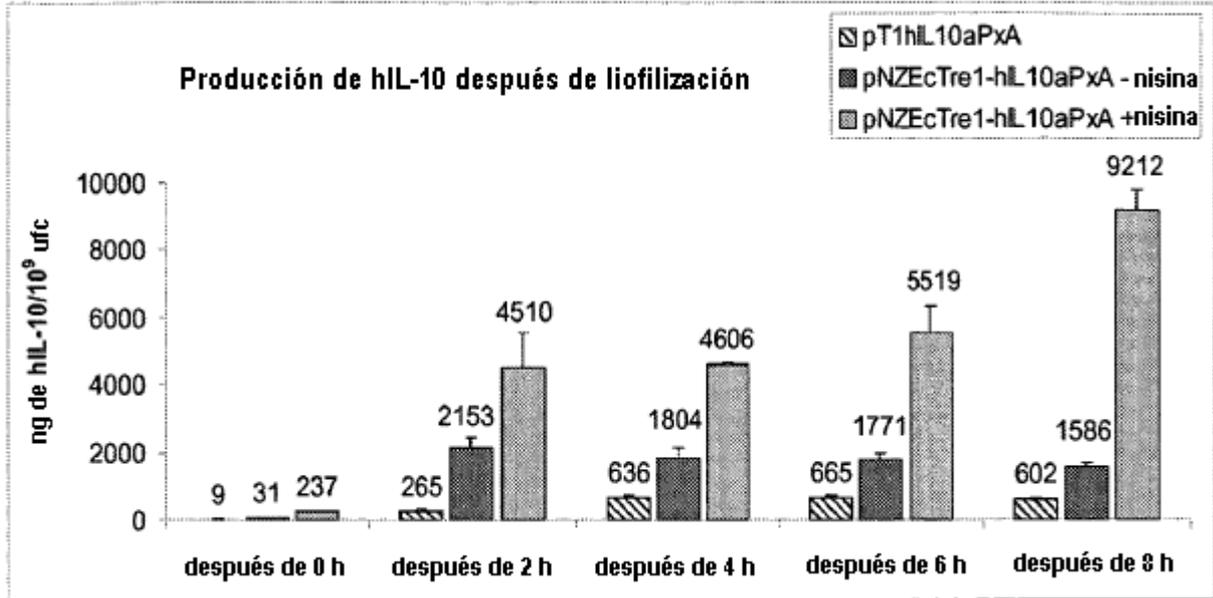


Fig. 11:

