

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 589**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2006 E 06715778 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 1859022**

54 Título: **Nueva Lactobacillus sakei Probio-65 ácido tolerante con capacidad para suprimir el crecimiento de microorganismos patógenos y con efecto antialérgico**

30 Prioridad:

29.01.2005 KR 20050008382

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

10.12.2014

73 Titular/es:

**PROBIONIC INC. (100.0%)
Korea Research Institute of Bioscience and
Biotechnology 52, Oun-dong, Yusong-ku
Taejon, 305-333, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, YONG HA;
LEE, IN-SEON;
KIM, HONG-IK y
KANG, KOOK-HEE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 524 589 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

Nueva *Lactobacillus sakei* Probio-65 ácido tolerante con capacidad para suprimir el crecimiento de microorganismos patógenos y con efecto antialérgico

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una nueva bacteria ácido láctica, *Lactobacillus sakei* Probio-65, y a composiciones que la comprenden.

Más particularmente, la presente invención se refiere a *Lactobacillus sakei* Probio-65, que tiene tolerancia a ácidos, a ácidos biliares y resistencia a antibióticos e inhibe eficazmente el crecimiento de microorganismos patógenos nocivos y que tiene actividad antialérgica, así como a composiciones farmacéuticas, de piensos, de alimentos y
10 cosméticas, que comprenden el microorganismo o un cultivo del mismo.

Técnica antecedente

La dermatitis atópica es una enfermedad inflamatoria de la piel que se caracteriza por picor intenso y lesiones cutáneas eczematosas y afecta principalmente a los bebés y a los niños. En particular, en casos crónicos, la dermatitis atópica a menudo reaparece en el invierno. Con frecuencia dicha dermatitis atópica desarrollada
15 evoluciona a asma bronquial o a rinitis alérgica, y ocasionalmente reaparece en adultos. El picor intenso que padecen los pacientes con dermatitis atópica puede hacer que disminuya la capacidad de adaptación a nuevos entornos, la actividad física y eficacia en el trabajo, puede producir insomnio y trastornos emocionales. Las lesiones cutáneas eczematosas acompañadas por pigmentación dan lugar a un aspecto desagradable, que puede obstaculizar las reacciones personales y las actividades sociales habituales. Además, la piel irritante, sensible y seca
20 a menudo desarrolla dermatitis de contacto irritativa, que puede ser un factor limitante en la búsqueda de un empleo. En los últimos años, la frecuencia de la dermatitis atópica está aumentando en todo el mundo, y también está aumentado en Corea del Sur, junto con el rápido aumento de enfermedades alérgicas. De acuerdo con una encuesta realizada por la Academia Coreana de Enfermedades Alérgicas y Respiratorias con un total de 43.045 estudiantes de enseñanza primaria y secundaria en todo el país en el año 2000, el 24,9 % de los estudiantes de
25 primaria y el 12,8 % de los estudiantes de secundaria fueron diagnosticados con dermatitis atópica. En Corea del Sur la frecuencia de la dermatitis atópica se ha incrementado un 50 % durante los últimos diez años, siendo esta tasa de aumento mucho más alta entre las personas mayores. Es decir, la dermatitis atópica se observó a una alta frecuencia de aproximadamente el 17 % en los adultos.

Se cree que la dermatitis atópica es el resultado de una interacción entre factores genéticos, inmunológicos y
30 ambientales. Los factores genéticos son los genes asociados a la atopia, que son principalmente genes inmunológicos. Los genes asociados a la atopia hasta ahora identificados incluyen moléculas de antígenos leucocitarios humanos (HLA) y el cromosoma 6p, receptores de linfocitos T (TCR) y el cromosoma 7p, receptores de alta afinidad de IgE (Fc ϵ RI- β) y el cromosoma 11q e IL-4 y el cromosoma 5q. Los factores ambientales pueden ser ácaros domésticos, polvo doméstico, hongos, sustancias nocivas, tales como formalina y metilbenceno, liberadas de
35 los materiales de construcción o pintura en el aire, o sustancias químicas que se utilizan como aditivos alimentarios o el propio alimento.

Como un factor ambiental, *Staphylococcus aureus* es una causa secundaria del empeoramiento de la dermatitis atópica. La colonización de *S. aureus* se encuentra en el 80-100 % de las lesiones eczematosas de pacientes con dermatitis atópica. Esto es mucho más elevado que su aparición en aproximadamente el 5-30 % en la piel sana. *S. aureus* hace que empeoren las lesiones cutáneas por dermatitis atópica, por ejemplo, aumentando el impétigo, y extendiéndose a otros individuos, lo que las hace susceptibles a las infecciones que conducen a la dermatitis atópica. Ha habido pruebas que confirman la idea de que las exotoxinas producidas por *S. aureus* actúan como superantígenos en el empeoramiento de la dermatitis atópica. Dichas exotoxinas incluyen enterotoxinas estafilocócicas A-D (SEA-D) y la toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST-1), que aumentan la producción de
45 IgE sobre ocho veces.

Los pacientes con dermatitis atópica se han tratado habitualmente usando terapia con antibióticos, terapia con antihistamínicos, terapia con esteroides, terapia inmunológica y similar. La terapia con antibióticos se usa para bloquear las infecciones microbianas secundarias tales como las de dicha *S. aureus*, como se describe anteriormente. Sin embargo, la terapia con antibióticos es problemática porque los antibióticos se administran de
50 manera inadecuada y las cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos recientemente han tendido a aumentar. Las principales cepas resistentes a antibióticos en todo el mundo incluyen *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM), y *Staphylococcus aureus* negativa a coagulasa resistente a metilicina (SNCRM). Por tanto, debido a una tendencia mundial para evitar el abuso de antibióticos, los efectos secundarios de los antibióticos y la aparición de cepas resistentes, hay una urgente necesidad de desarrollar materiales que sustituyan a los antibióticos y a otros fármacos.
55

Además, una diversidad de microorganismos, conocidos como microflora intestinal, reside en el intestino de seres humanos y de animales. Se sabe que algunos microorganismos, tales como las bacterias ácido lácticas, son beneficiosos para animales hospedadores, y que otros microorganismos, tales como *E. coli*, *Salmonella* o

Staphylococcus, tienen efectos nocivos directos o posibles sobre hospedadores. En seres humanos y animales, el aumento del estrés, la infección por bacterias nocivas y los cambios en el medio externo pueden destruir el equilibrio de la microflora intestinal, conduciendo a un rápido crecimiento de microorganismos nocivos. En este caso, los estados de salud de los animales hospedadores empeoran. Dicho cambio en la microflora intestinal conlleva a enfermedades alérgicas. Como se ha descrito anteriormente, la terapia con administración de antibióticos durante un largo periodo de tiempo confiere resistencia a los antibióticos a los microorganismos nocivos, haciendo por tanto que sea imposible un tratamiento eficaz.

Como un régimen alternativo de dicha terapia con antibióticos, los probióticos están obteniendo actualmente un creciente interés. Los probióticos se preparan aislando microorganismos beneficiosos que residen en el intestino de seres humanos o de animales y formulándolos en una forma de dosificación. Se usan bacterias aerobias, anaerobias, ácido lácticas y levaduras, usándose principalmente las bacterias ácido lácticas. Las bacterias ácido lácticas tienen diversas aplicaciones en la fermentación y en el procesamiento tradicional de los alimentos. También se sabe que las bacterias ácido lácticas son inocuas durante un largo periodo de tiempo y algunas cepas de las mismas aparecen en la lista de la FDA Americana como “generalmente reconocidas como seguras (GRAS)”. Por tanto, los probióticos preparados con bacterias ácido lácticas tienen diversas ventajas como las siguientes. No tienen efectos secundarios causados por el abuso de antibióticos y mantienen estable la flora intestinal inhibiendo la fermentación anómala de microorganismos intestinales nocivos. Además, los probióticos reducen enfermedades causadas por infección con microorganismos nocivos e impiden o tratan enfermedades alérgicas potenciando el sistema inmunitario. Entre las bacterias ácido lácticas, las especies de *Lactobacillus*, que son lactobacilos portadores de fermentación homoláctica o heteroláctica, se encuentran de manera natural en el tracto intestinal de animales, incluyendo seres humanos, y durante la fermentación de productos lácteos y vegetales. Las especies de *Lactobacillus* crean un entorno ácido en el intestino, que ayuda a inhibir la proliferación de bacterias nocivas, tales como *E. coli* o *Clostridium*, a mitigar la diarrea y el estreñimiento, y, además, ofrecen otros beneficios para la salud, incluyendo la potenciación del sistema inmunitario, la síntesis de vitaminas, la protección contra el cáncer, y la reducción del nivel de colesterol en suero. Se ha descubierto que la acidofilina producida por los lactobacilos, inhiben el crecimiento de microorganismos nocivos, tales como *Shigella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, y *E. coli*. Así mismo, la acidofilina actúa deteniendo la diarrea inhibiendo la proliferación de bacterias causantes de diarrea y normalizando la flora intestinal.

Recientemente, se han realizado investigaciones de forma activa para desarrollar probióticos y piensos para animales usando las características mencionadas anteriormente de las especies de *Lactobacillus*. La diarrea bacteriana produce un aumento reducido de peso corporal y la muerte de animales domésticos y de granja. Para impedir la diarrea bacteriana y aumentar la productividad de los animales de granja, los piensos para animales se han complementado típicamente con sustancias antibióticas. Sin embargo, debido a la aparición de bacterias resistentes a antibióticos y de antibióticos residuales en los productos pecuarios, las regulaciones actuales en muchos países limitan el uso de antibióticos en los piensos para animales, y han destacado los programas de piensos orgánicos. Actualmente se recomienda encarecidamente el uso de probióticos como un método sustitutivo para el uso de antibióticos. La Patente Europea N° 0861905 desvela una nueva cepa de *Lactobacillus* sp., y una composición farmacéutica y un producto lácteo para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, que comprende la nueva cepa. La Publicación de Patente Internacional N° WO99/29833 desvela *Lactobacillus paracasei*, que es una cepa bacteriana útil como probiótico en alimentos y medicinas naturopáticas. La Publicación de Patente Coreana abierta a inspección pública N° 1998-78353 desvela un nuevo microorganismo ácido tolerante que pertenece al género *Lactobacillus*, que tiene actividad inhibidora sobre microorganismos nocivos, y un probiótico para el ganado que comprende el nuevo microorganismo.

El documento US 2003/0175305 A1 desvela el uso de *Lactobacillus sake* para el tratamiento o la prevención de infecciones intestinales patógenas en un rumiante, seleccionándose preferentemente el patógeno de *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*.

Sobrinó y col. (International Journal of Food Microbiology, Elsevier Science Publishers, vol. 13, no. 1, 1.05.1991, p. 1-10) describen la actividad inhibidora del crecimiento de aislados específicos de *Lactobacillus sakei*, en particular contra *Staphylococcus aureus*. Los aislados de *Lactobacillus sakei* carecen de actividad antimicrobiana contra bacterias gram negativas incluyendo *Enterobacter cloacae* y *Salmonella typhimurium*. Además, la actividad inhibidora de estos aislados contra *Staphylococcus aureus* es débil.

Divulgación de la invención

Los presentes inventores exploraron un microorganismo probiótico, que puede inhibir más eficazmente los microorganismos nocivos que los probióticos convencionales y que tiene tolerancia a ácidos y a ácido biliar. Como resultado, los autores de la presente invención aislaron del Kimchi e identificaron al *Lactobacillus sakei* Probio-65, depositado en la Colección Coreana de Cultivos Tipo con el número de acceso KCTC 10755BP, que es capaz de inhibir eficazmente la proliferación de *Staphylococcus aureus*, que es un factor agravante de trastornos atópicos. Se descubrió que el presente microorganismo no era tóxico para los seres humanos y animales y por tanto muy seguro, que mostraba resistencia a diversos antibióticos y mostraba efectos de inhibición del crecimiento de un amplio espectro de microorganismos patógenos, incluyendo la bacteria patógena *Staphylococcus aureus*, regulando la fermentación intestinal anómala, y potenciando el sistema inmunitario. Por tanto, el presente microorganismo es

posiblemente útil en composiciones farmacéuticas, de piensos, de alimentos y de cosmética.

Por lo tanto es un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo microorganismo, *Lactobacillus sakei* Probio-65.

5 Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos nocivos, que comprende el nuevo microorganismo o un cultivo del mismo.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar una composición para prevenir y tratar la fermentación anómala en el intestino, que comprende el nuevo microorganismo o un cultivo del mismo.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar una composición para prevenir y tratar trastornos asociados con la alergia, que comprende el nuevo microorganismo o un cultivo del mismo.

10 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición para piensos que comprende el nuevo microorganismo o un cultivo del mismo.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar una composición para alimentos que comprende el nuevo microorganismo o un cultivo del mismo.

15 Es otro objeto más de la presente invención proporcionar una composición cosmética que comprende un cultivo del nuevo microorganismo.

Breve descripción de los dibujos

Lo objetos anteriores y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada en conjunto con los dibujos adjuntos, en los que:

20 La Figura 1 es un gráfico que muestra el efecto de *Lactobacillus sakei* Probio-65 sobre concentraciones de IgE en suero de ratones sensibilizados con DNCB para inducir la dermatitis de contacto;

La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto de *Lactobacillus sakei* Probio-65 sobre concentraciones de IgE en suero de ratones sensibilizados con TDI para inducir la dermatitis de contacto;

25 La Figura 3 es un gráfico que muestra el efecto de *Lactobacillus sakei* Probio-65 sobre concentraciones de IL-4 de ratones sensibilizados con DNCB para inducir la dermatitis de contacto;

La Figura 4 es un gráfico que muestra el efecto de *Lactobacillus sakei* Probio-65 sobre concentraciones de IL-4 de ratones sensibilizados con TDI para inducir la dermatitis de contacto;

La Figura 5 es una fotografía que muestra el efecto inhibitorio del crecimiento de *Lactobacillus sakei* Probio-65 sobre *Staphylococcus aureus*, en el que se forma una zona clara; y

La Figura 6 es una observación por microscopía electrónica de *Lactobacillus sakei* Probio-65.

Mejor modo para realizar la invención

30 En un aspecto, la presente invención proporciona un nuevo microorganismo que pertenece al género *Lactobacillus*. La cepa de *Lactobacillus* sp. de acuerdo con la presente invención es *Lactobacillus sakei* Probio-65, depositada en la Colección Coreana de Cultivos Tipo con el número de acceso KCTC 10755BP que tiene las excelentes propiedades de ser ácido tolerante, ácido tolerante a ácidos biliares, inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos nocivos, especialmente *Staphylococcus aureus*, que es un factor agravante de trastornos atópicos, regulando la fermentación intestinal anómala y potenciando el sistema inmunitario.

35 Las especies de *Lactobacillus* están ampliamente distribuidas en la naturaleza, y metabolizan de manera anaerobia carbohidratos para producir ácido láctico. Típicamente, se sabe que cuando las bacterias ácido lácticas, tales como especies de *Lactobacillus*, se añaden directa o indirectamente a los productos alimentarios, su metabolito, el ácido láctico, mejora la estabilidad del almacenamiento, el sabor y la textura de los productos alimentarios. Además, cuando las bacterias ácido lácticas se ingieren junto con alimentos fermentados, estas entran en el intestino y se adhieren a las células epiteliales intestinales, potenciando la función inmunitaria, reduciendo la frecuencia del cáncer y reduciendo las enzimas carcinogénicas, en animales hospedadores. Por tanto, las bacterias ácido lácticas, en países tanto orientales como occidentales, se usan como componentes auxiliares en el procesamiento de productos lácteos, productos cárnicos, legumbres encurtidas y diversos mariscos encurtidos y fermentados, y también se usan como probióticos. Para usar las bacterias ácido lácticas como probióticos, las bacterias ácido lácticas deben cumplir los siguientes requisitos: deben tener resistencia al ácido gástrico o ácido biliar de tal manera que lleguen al intestino a una alta densidad; deben adherirse a las células epiteliales intestinales o a las membranas mucosas y establecerse en su interior; deben segregar preferentemente sustancias antimicrobianas para inhibir bacterias nocivas, estabilizando de este modo el intestino e impidiendo el establecimiento de bacterias nocivas en el intestino, y

40

45

50

La presente cepa de *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus sakei* Probio-65, es un nuevo microorganismo que cumple todos los requisitos mencionados anteriormente.

La cepa de *Lactobacillus sakei* Probio-65 de la presente invención, que es un nuevo microorganismo probiótico, puede adherirse a las células intestinales y posee las siguientes propiedades probióticas.

En primer lugar, el presente microorganismo tiene la capacidad de sobrevivir en un medio aerobio o anaerobio a diversos valores de pH. Esta propiedad permite al presente microorganismo adaptarse bien a condiciones fisiológicas y patológicas que varían en el tracto gastrointestinal.

5 En segundo lugar, el presente microorganismo tiene tolerancia al ácido gástrico y al ácido biliar y posee actividad probiótica cuando se liofiliza.

10 En tercer lugar, el presente microorganismo tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos nocivos. Los microorganismos nocivos incluyen, pero sin limitación, *E. coli* KCTC 2441, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, *Shigella flexneri* KCTC 2008, *Salmonella gallinarum*, *Enterobacter cloacea* KCTC 2361, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii* KCTC 2006, y *Methylosinus trichosporium* KCTC 2591. En particular, los presentes microorganismos inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, que es una causa principal de empeoramiento de la dermatitis atópica.

En cuarto lugar, el presente microorganismo tiene excelente resistencia a antibióticos. Como ejemplos de dichos antibióticos se incluyen ampicilina, carbenicilina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, lincomicina, minociclina, neomicina, penicilina G, estreptomycin, sulfisoxazol, y tetraciclina.

15 En quinto lugar, el presente microorganismo es seguro para los seres humanos y no tiene efectos secundarios tales como toxicidad biológica.

20 La cepa de *Lactobacillus* sp. de acuerdo con la presente invención se aisló e identificó de acuerdo con el siguiente procedimiento. En primer lugar, zumo de Kimchi (fermentado) se diluyó en serie y se incubó en un medio de selección para bacterias ácido lácticas para aislar únicamente las bacterias ácido lácticas. Se seleccionaron micrococcos y bacilos y se cultivaron en medio MRS. Finalmente, se aisló un microorganismo que inhibía la proliferación de *Staphylococcus aureus*, que es un factor agravante de la dermatitis atópica.

25 El aislado de *Lactobacillus sakei* Probio-65 de Kimchi de acuerdo con la presente invención tiene las siguientes características morfológicas, físicas y bioquímicas. La bacteria *Lactobacillus sakei* Probio-65 es una bacteria Gram positiva, que crece en condiciones aerobias y anaerobias, no forma esporas, y no es móvil, y es un tipo de bacilo. La temperatura óptima de la cepa varía de 30 °C a 37 °C. El presente microorganismo no genera gas ni indol, no presenta propiedades lífticas y no reduce el ácido nítrico.

30 Los análisis filogenéticos basados en ADNr 16S dieron como resultado el descubrimiento de que el presente microorganismo tiene la secuencia de ADNr 16S de la SEC ID N° 1. El presente microorganismo, que pertenecen al género *Lactobacillus*, se identificó como una cepa que mostraba la relación filogenética más estrecha con una cepa convencional de *Lactobacillus sakei*, con un 99,6 % de homología de secuencia con el ADNr 16S.

Basándose en los resultados, el presente microorganismo se identificó como una nueva cepa de *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus sakei* Probio-65, y se depositó en la KCTC (Colección Coreana de Cultivos Tipo; Genetic Resources Center, KRIBB, 52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon, Corea) el 23 de diciembre del 2004, y se la asignó el número de referencia KCTC 10755BP.

35 El presente microorganismo puede cultivarse a gran escala de acuerdo con un procedimiento habitual para cultivar especies de *Lactobacillus*. Como medio de cultivo puede usarse un medio compuesto por una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales. Como ejemplos de medio de cultivo pueden incluirse el caldo de MRS (caldo de Man-Rogosa-Sharp) y caldo complementado con leche. El cultivo microbiano puede realizarse en condiciones de cultivo habituales de bacterias ácido lácticas, por ejemplo, a una temperatura que varía de 15 °C a 45 °C durante un periodo que varía de 10 horas a 40 horas. Si se desea, los expertos en la técnica pueden realizar centrifugación o filtración para retirar el medio de cultivo del cultivo resultante y recoger las células cultivadas en un estado concentrado. La masa celular concentrada puede congelarse o liofilizarse de acuerdo con un procedimiento habitual para conservar las células sin perder la actividad. Preferentemente, el presente microorganismo se mezcla con glicerol y se conserva a -80 °C, o se suspende en leche desnatada estéril al 10 % y se liofiliza, de tal manera que se preserve de manera estable durante un largo periodo de tiempo.

Será obvio para los expertos en la técnica que el presente microorganismo pueda mejorarse o modificarse mediante mutagénesis fisicoquímica habitual de tal manera que tenga una excelente estabilidad o una actividad antimicrobiana superior, al mismo tiempo que se conserva la misma actividad.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos nocivos, que comprende *Lactobacillus sakei* Probio-65 o un cultivo del mismo.

55 El término "probiótico", como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo vivo o a un cultivo del mismo, que afecta de manera beneficiosa a animales hospedadores incluyendo seres humanos mejorando su equilibrio microbiano intestinal en el tracto gastrointestinal de animales hospedadores, y además puede significar un microorganismo o un cultivo del mismo, que puede mejorar un equilibrio microbiano *in vivo* o *in vitro* así como el tracto gastrointestinal. El término "cultivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo recogido del fluido de cultivo del mismo, o una sustancia extraída del fluido de cultivo que contiene el

microorganismo usando un disolvente de extracción. Un microorganismo puede recogerse de su fluido de cultivo por centrifugación, por tratamiento con disolventes orgánicos y similares. Los componentes activos útiles pueden extraerse sometiendo las células a ultrasonidos o tratando las células con un disolvente, tal como metanol y acetona, y concentrando el lisado celular.

- 5 Para determinar si la bacteria *Lactobacillus sakei* Probio-65 de la presente invención tiene actividad inhibidora del crecimiento frente a microorganismos patógenos nocivos, los autores de la presente invención examinaron los efectos inhibidores del crecimiento de los microorganismos aislados en primer lugar contra microorganismos nocivos de acuerdo con un procedimiento de placa cilíndrica que es una modificación del procedimiento de Kuroiwa (Kuroiwa y col., Journal of Infections, 64, 257, 1990) (Ejemplo 3). En este ensayo, la temperatura óptima de *Lactobacillus sakei* Probio-65 para inhibir microorganismos nocivos varía preferentemente de 30°C a 37 °C. Se midió el diámetro de las zonas claras de inhibición del crecimiento, que aparecían después del cultivo, y se comparó entre sí la actividad inhibidora del crecimiento contra los microorganismos patógenos de las cepas aisladas en primer lugar. Se obtuvieron diez microorganismos nocivos usados en la evaluación de la actividad antibiótica del Instituto de Investigación Coreano de Biociencia y Biotecnología (KRIBB) y fueron los siguientes: *E. coli* KCTC 2441, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, *Shigella flexneri*, KCTC 2008, *Salmonella gallinarum*, *Enterobacter cloacea* KCTC 2361, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii* KCTC 2006, y *Methylosinus trichosporium* KCTC 2591. Los microorganismos nocivos se cultivaron individualmente en caldo nutriente (NB, Nutrient Broth) a 37 °C durante 18 horas. Se dispersaron 0,1 ml de cada fluido de cultivo sobre placas de agar nutriente (AN) y se secaron al aire, y sobre cada placa se colocó un cilindro de 8 mm. Por separado, los microorganismos aislados en primer lugar se cultivaron individualmente en caldo MRS en condiciones aerobias a 37 °C durante 18 horas. Para extraer las sustancias antimicrobianas producidas por los microorganismos aislados, cada fluido de cultivo de los microorganismos aislados se mezcló con el mismo volumen de acetona previamente enfriada y se dejó reaccionar durante 24 horas. Las mezclas de reacción se centrifugaron después y los sobrenadantes se concentraron a presión para su uso en la siguiente evaluación de la actividad antimicrobiana de los microorganismos. Después, 30 µl de cada concentrado se inocularon sobre el cilindro de 8 mm de diámetro colocado en la placa de AN, seguido de incubación a 37 °C durante 24 horas. Se midió el diámetro de las zonas claras formadas de la inhibición del crecimiento y se comparó con un control. Se seleccionó la cepa que mostraba la mayor actividad inhibidora del crecimiento frente a microorganismos patógenos nocivos y se denominó "Probio-65".
- 30 La cepa *Lactobacillus sakei* Probio-65 de la presente invención formó zonas claras de inhibición de crecimiento contra los microorganismos nocivos y el diámetro de las zonas claras fue el siguiente: 27 mm contra *E. coli* KCTC 2441, 41 mm contra *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, 28 mm contra *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, 24 mm contra *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, 31 mm contra *Salmonella gallinarum*, 28 mm contra *Enterobacter cloacea* KCTC 2361, 28 mm contra *Salmonella typhimurium*, 28 mm contra *Citrobacter freundii* KCTC 2006, 26 mm contra *Shigella flexneri* KCTC 2008, y 16 mm contra *Methylosinus, trichosporium* KCTC 2591 (Tabla 3).

En particular, el presente microorganismo, *Lactobacillus sakei* Probio-65, como se define anteriormente, mostró un excelente efecto inhibidor del crecimiento sobre *Staphylococcus aureus*, que se sabe que es un factor agravante de la dermatitis atópica, y por tanto es posiblemente útil en la preparación de una composición para la prevención y el tratamiento de la dermatitis atópica.

- 40 Además, se descubrió que la presente cepa *Lactobacillus sakei* Probio-65 tenía resistencia a antibióticos y por tanto puede administrarse a seres humanos o a animales en solitario como un sustituto de antibióticos convencionales o en combinación con antibióticos convencionales para inhibir el crecimiento de microorganismos intestinales nocivos.

- La cepa *Lactobacillus sakei* Probio-65 se ensayó con detalle, con respecto a su sensibilidad a antibióticos contra catorce antibióticos de acuerdo con un procedimiento descrito en Microbiology Procedures Handbook vol.1 (Henry D. Isenberg, ASM) y en la Publicación de Patente Coreana N° 91-4366. En la siguiente Tabla 1 se ofrecen los resultados.

TABLA 1

Antibióticos	Conc. (µg)	Resistencia (mm)	Diámetro (mm)	Resultados
Ampicilina	10	<28	19	R
Carbencilina	100	<19	24	S
Clindamicina	2	<14	20	S
Doxiciclina	30	<16	22	S
Eritromicina	15	<21	19	R
Gentamicina	10	<15	9	R
Kanamicina	30	<18	0	R
Lincomicina	2	<24	11	R

(continuación)

Antibióticos	Conc. (µg)	Resistencia (mm)	Diámetro (mm)	Resultados
Minociclina	30	<14	26	S
Neomicina	30	<12	9	R
Penicilina G	10	<19	20	RS
Estreptomina	10	<14	0	R
Sulfisoxazol	250	<24	0	R
Tetraciclina	30	<19	20	R

(R; Resistente, S; Susceptible)

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición para la prevención y el tratamiento de la fermentación anómala en el intestino, que comprende *Lactobacillus sakei* Probio-65 o un cultivo de la misma.

5 La presente composición tiene el efecto de tratar y mejorar los síntomas causados por una fermentación anómala de la flora bacteriana intestinal. Cuando el presente microorganismo se administra a seres humanos y a animales, este se localiza y se establece en la pared del tracto digestivo del intestino para impedir que las bacterias nocivas se establezcan en su interior y producir ácido láctico, que disminuye el pH intestinal, inhibiendo de este modo la proliferación de bacterias nocivas. Los presentes microorganismos también producen bacteriocinas y peróxidos para
10 inhibir la proliferación de bacterias patógenas.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición para el tratamiento o la prevención de trastornos asociados con alergias, que comprende *Lactobacillus sakei* Probio-65 o un cultivo de la misma.

15 La presente composición potencia la función inmunitaria y, en particular, inhibe trastornos alérgicos. Los autores de la presente invención inducen la dermatitis de contacto alérgica en ratones utilizando un alérgeno de contacto, 1-cloro 2,4- dinitrobencono (DNCB), y un alérgeno respiratorio, disocianato de tolueno (TDI), que actúa a través de un mecanismo similar al del cloruro de picrilo (1-cloro-2,4,6-trinitrobencono), que sirve como un hapteno y el presente microorganismo se evaluó con respecto a sus efectos terapéuticos sobre la dermatitis de contacto alérgica inducida (Ejemplo 4). En ratones sensibilizados con DNCB o TDI para inducir la dermatitis de contacto, se midieron las concentraciones de IgE e IL-4 en suero en esplenocitos para determinar si el presente microorganismo tenía el
20 efecto de reducir los niveles de IgE e IL-4.

La anterior composición de la presente invención puede formularse y administrarse en diversas formas de dosificación. Por ejemplo, la composición puede prepararse mezclando una cantidad eficaz de *Lactobacillus sakei* Probio-65 con un vehículo normalmente usado en el campo farmacéutico. La cantidad eficaz de *Lactobacillus sakei* Probio-65 es preferentemente mayor de 10^7 células/g. Como ejemplos de transportadores pueden incluirse
25 aglutinantes, lubricantes, disgregantes, excipientes, solubilizantes, agentes dispersantes, estabilizantes, agentes de suspensión, colorantes y perfumes. La presente composición puede formularse en comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, polvos, gránulos y pomadas. La presente composición puede administrarse por vía oral y por vía parenteral, es decir, por administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, utópica, sublingual, intranasal o intraperitoneal. Se prefiere la administración oral. La dosificación de la presente composición puede determinarse adecuadamente dependiendo de la absorción *in vivo* y de las tasas de inactivación y tasas de excreción de los principios activos, de la edad del paciente, sexo y estado de salud y de la gravedad de la dolencia a
30 tratar.

En otro aspecto aún, la presente invención proporciona una composición de pienso que comprende *Lactobacillus sakei* Probio-65 o un cultivo de la misma.

35 La composición de pienso de la presente invención, que es útil como un sustituto de antibióticos convencionales, inhibe los microorganismos nocivos en el intestino y mantiene estable la flora intestinal, manteniendo de este modo a los animales en buen estado de salud y mejorando el aumento de peso corporal y la calidad de la carne, aumentando la producción de la leche y potenciando la inmunidad del ganado. La composición de pienso de la presente invención puede prepararse en forma de pienso fermentado, fórmula fermentada, gránulos y ensilaje. *Lactobacillus sakei* Probio-65 está incluido en una cantidad eficaz de más de 10^7 células/g y preferentemente más
40 de 10^5 células/g, en la composición de pienso. El pienso fermentado puede prepararse añadiendo diversas poblaciones de microorganismos o enzimas a la materia orgánica y fermentando la materia orgánica. La fórmula de pienso puede prepararse mezclando diversos tipos de pienso general con el *Lactobacillus sakei* de la presente invención. Pueden prepararse piensos en gránulos aplicando calor y temperatura a la fórmula de pienso en un granulador. Puede prepararse ensilaje fermentando plantas forrajeras verdes usando la bacteria ácido láctica de acuerdo con la presente invención. Entre estas, el pienso fermentado, después de haber fermentado, tiene un valor de pH de aproximadamente 4,0, en el que se inhibe la proliferación de diferentes tipos de microorganismos nocivos y por tanto tiene estabilidad mejorada durante un periodo de tiempo prolongado. El pienso fermentado también tiene una preferencia de pienso mejorado porque contiene proteínas vegetales así como proteínas de bacterias ácido
45

láticas y levaduras. El pienso fermentado puede prepararse mediante un procedimiento de fermentación en húmedo y un procedimiento de fermentación en seco. El pienso fermentado en húmedo puede prepararse recogiendo y transportando materia orgánica, tal como restos de alimentos, mezclando la materia orgánica con un agente de absorción formador de volumen para la esterilización y el control del contenido acuoso en una proporción predeterminada, realizando la fermentación de 50 °C a 60 °C durante 24 horas o más, y ajustando el contenido acuoso a aproximadamente 70 %. El pienso seco fermentado puede prepararse añadiendo cantidades adecuadas de fuentes de energía, proteínas, materiales fibrosos y un microorganismo a la materia orgánica tal como residuo de alimentos, realizando la fermentación a aproximadamente 60 °C durante 24 horas o más, secando los materiales fermentados y ajustando el contenido acuoso de aproximadamente 30 % a 40 %.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición de alimento (o alimento sano funcional) que comprende *Lactobacillus sakei* Probio-65 o un cultivo de la misma.

Las bacterias ácido lácticas son beneficiosas para los seres humanos porque producen ácido láctico como un producto final de la fermentación de azúcares, impidiendo de este modo la descomposición del alimento, y segregan sustancias antimicrobianas tales como bacteriocinas, inhibiendo de este modo a las bacterias intoxicantes de alimentos y reduciendo el pH intestinal de seres humanos, inhibiendo de este modo la proliferación de bacterias descomponedoras en el intestino. Los productos alimenticios preparados por fermentación usando bacterias ácido lácticas incluyen queso, suero de mantequilla, yogur y suero lácteo. Recientemente, se ha comercializado ampliamente yogur funcional preparado por la fermentación de bacterias ácido lácticas. Además, los productos de fermentación con bacterias ácido lácticas se formulan en comprimidos, gránulos y similares y se comercializan como composiciones de alimentos, medicamentos y similares, aplicables como probióticos.

La composición de alimento de la presente invención, además de con el presente microorganismo o con un cultivo del mismo, puede mezclarse con vehículos y excipientes o ingredientes eficaces auxiliares, y puede formularse en forma de polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas o líquidos (por ejemplo, en forma bebible). Es decir, la composición de alimento de la presente invención puede formularse en forma de polvos y gránulos mediante un procedimiento conocido, tal como liofilización, utilizando vehículos convencionales, y también puede formularse en comprimidos y cápsulas utilizando procedimientos de formación de comprimidos y de encapsulación habituales. Además, la composición de alimento de la presente invención puede tener un recubrimiento entérico usando un procedimiento conocido para atravesar el tracto gastrointestinal para llegar al intestino delgado y liberar rápidamente los principios activos al intestino. Vehículos, excipientes y diluyentes adecuados para su uso en la formulación de la composición de alimento de la presente invención incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica, fosfato de calcio, alginato, goma de tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, metil y propil-hidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. Para la comercialización, la composición de alimento de la presente invención puede incluir lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de suspensión, antisépticos, edulcorantes o perfumes adicionales.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición cosmética que comprende un cultivo de *Lactobacillus sakei* Probio-65.

Generalmente, se sabe que cuando la leche fermentada con bacterias ácido lácticas se aplica a la piel, hace que la piel se vuelva blanca e impide que se deshidrate. Las células de la piel humana contienen factores hidratantes naturales (por ejemplo, aminoácidos, lactato sódico, PCA sódico, urea, etc.), que regulan la hidratación de la piel. Dichos factores hidratantes naturales regulan la hidratación de la piel para que sea adecuada (hidratación del 15 % al 25 %) y también controlan el pH de la piel. Cuando dichos factores hidratantes naturales son insuficientes en la piel, ésta no puede mantener el estado hidratado normal en un ambiente seco o en un estado gravemente envejecido. Recientemente, con frecuencia se han usado fluidos de fermentación o bacterias ácido lácticas en cosméticos líquidos que tienen efectos nutricionales e hidratantes sobre la piel ya que están compuestos de casi los mismos componentes que los factores hidratantes naturales de la piel. Este uso cosmético se basa en el hecho de que los efectos nutricionales e hidratantes de los fluidos de fermentación de las bacterias ácido lácticas son el resultado del ácido láctico, lactosa, proteospeptona y otros componentes. Por tanto, el cultivo del presente microorganismo, *Lactobacillus sakei* Probio-65, puede usarse en la preparación de cosméticos que tienen efectos nutricionales e hidratantes excelentes.

En un aspecto preferido, las composiciones farmacéuticas, de piensos, de alimentos y cosméticas que comprenden *Lactobacillus sakei* Probio-65 o un cultivo de la misma de acuerdo con la presente invención, además de *Lactobacillus sakei* Probio-65, puede incluir dos o más de otros microorganismos beneficiosos.

Preferentemente, los otros microorganismos que pueden utilizarse junto con el presente microorganismo son aquellos que son adecuados para ingerir por seres humanos o animales y que tienen actividad probiótica, inhibiendo de este modo los microorganismos patógenos nocivos o mejorando el equilibrio microbiano intestinal en el intestino de mamíferos cuando se ingieren. Como ejemplos de dichos microorganismos probióticos se incluyen levaduras, tales como *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, y *Torulopsis*; hongos tales como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, y *Penicillium*; y bacterias, tales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Leuconostoc*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*,

Pediococcus, y *Micrococcus*. Como ejemplos específicos de microorganismos probióticos adecuados se incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sake*, *Lactococcus lactis*, *Micrococcus varians*, *Pediococcus acidilactici*, y *Staphylococcus xylosus*.

A través de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, y no limitar la presente invención, puede obtenerse un mejor entendimiento de la misma.

10 **Ejemplo 1: Aislamiento de cepas de *Lactobacillus* sp.**

Se diluyó zumo de Kimchi preparado en el laboratorio (fermentado), se esparció sobre medio sólido BCP (Eiken Chemical, Japón) y se cultivó a 37 °C durante 48 horas. Después de aparecer, las colonias se observaron al microscopio, se seleccionó un total de 480 micrococcos y bacilos, se cultivaron en medio MRS (Difco) y conservaron a -80 °C. Finalmente, se seleccionó un microorganismo que inhibía la proliferación de *Staphylococcus aureus* KCTC1621, que es un factor de agravante de enfermedades atópicas, y se denominó *Lactobacillus sakei* Probio-65 (Fig. 6).

Ejemplo 2: identificación de la cepa *Lactobacillus sakei* Probio-65 aislada

La cepa Probio-65 aislada en el Ejemplo 1 se cultivó en medio MRS (Difco) a 37 °C. Para identificar la cepa Probio-65, se determinaron las características morfológicas y fisiológicas de la cepa Probio-65 utilizando un procedimiento descrito en la bibliografía: Yoon y col., Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 904, 1997 usando los sistemas API 32A y API CHL (BioMerieux). Se determinó la secuencia de nucleótidos del gen de ADNr 16S y se analizó usando un procedimiento descrito en Yoon y col., Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 933, 1997.

Se descubrió que la cepa Probio-65 era una bacteria Gram positiva. La cepa bacteriana creció en condiciones tanto aerobias como anaerobias, no formaba esporas, no se movía y era un tipo de bacilo. La temperatura óptima para el crecimiento de la cepa variaba de 30 °C a 37 °C. La cepa Probio-65 no generaba gas ni indol, no presentaba propiedades lífticas y no reducía el ácido nítrico. Además, la cepa bacteriana mostró resistencia al ácido biliar al 0,5 %.

TABLA 2

Características morfológicas, fisiológicas y de crecimiento de <i>L. sakei</i> Probio-65	
Características	Resultados
Tinción Gram	+
Crecimiento anaerobio	+
Crecimiento aerobio	+
Formación de esporas	-
Movilidad	-
Forma	tipo bacilo
Generación de gas	-
Generación de indol	-
Hemólisis	-
Reducción de ácido nítrico	-

30 **Ejemplo 3: Evaluación de los efectos inhibidores del microorganismo aislado sobre microorganismos nocivos**

Los microorganismos principalmente aislados se evaluaron para determinar la actividad inhibidora del crecimiento frente a microorganismos patógenos nocivos usando un procedimiento descrito por Kuroiwa (Kuroiwa y col., Journal of Infections, 64, 257, 1990). En esta evaluación de la actividad antibiótica, se utilizaron diez cepas microbianas: *E. coli* KCTC 2441, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, *Shigella flexneri*, KCTC 2008, *Salmonella gallinarum*, *Enterobacter cloacea* KCTC 2361, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii* KCTC 2006, y *Methylosinus trichosporium* KCTC 2591.

Los microorganismos patógenos nocivos se cultivaron individualmente en caldo nutriente (NB) a 37 °C durante 18 horas. 0,1 ml de cada fluido de cultivo se esparció sobre placas de agar nutriente (AN) y se secaron al aire, y en cada placa se colocó un cilindro de 8 mm. Por separado, los microorganismos principalmente aislados se cultivaron

individualmente en caldo MRS en condiciones aerobias a 37 °C durante 18 horas. Para extraer las sustancias antimicrobianas producidas por los microorganismos aislados, el fluido de cada cultivo de los microorganismos aislados se mezcló con un mismo volumen de acetona pre-enfriada a 4° C y se dejó reaccionar durante 24 horas. Después, las mezclas de reacción se centrifugaron y los sobrenadantes se concentraron a presión para su uso en la siguiente evaluación de la actividad antimicrobiana de los microorganismos. Después, 30 µl de cada concentrado se inoculó sobre el cilindro de 8 mm de diámetro colocado en la placa de AN, seguido de incubación a 37 °C durante 24 horas. Se midió el diámetro de zonas claras de inhibición del crecimiento formadas y se comparó con un control. A continuación, en la Tabla 3, se resume la actividad inhibidora del microorganismo finalmente aislado, *L. sakei* Probio-65, frente a microorganismos patógenos nocivos.

TABLA 3

Actividad inhibidora de <i>L. sakei</i> Probio-65 frente a microorganismos patógenos nocivos	
Microorganismos patógenos nocivos	Zonas claras (mm)
<i>E. coli</i> KCTC 2441	27
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2208	41
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	28
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	24
<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2008	26
<i>Salmonella gallinarum</i>)	31
<i>Enterobacter cloacea</i> KCTC 2361	28
<i>Salmonella typhimurium</i>	28
<i>Citrobacter freundii</i> KCTC 2006	28
<i>Methylosinus trichosporium</i> KCTC 2591	16

Como se muestra en la Tabla 3, se descubrió que la cepa *Lactobacillus sakei* Probio-65 tenía excelente actividad inhibidora del crecimiento frente a los diez microorganismos patógenos nocivos ensayados. Estos resultados indican que la presente cepa es un microorganismo muy útil.

15 **Ejemplo 4: Evaluación de los efectos terapéuticos del microorganismo aislado sobre la dermatitis de contacto inducida por sensibilización de la piel.**

Se adquirieron ratones CD-1 (ICR) hembra de 4 semanas de vida en Orientbio Co. Ltd., Corea, consistiendo cada grupo de ensayo en seis ratones. El ensayo se repitió tres veces. Los ratones se sensibilizaron con un alérgeno, 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (DNCB) o diisocianato de tolueno (TDI) para inducir la dermatitis de contacto. El Día 7, se realizó una evaluación sensorial y en todos los ratones se indujo dermatitis de contacto de una puntuación de 10 o mayor. El DNCB indujo eritema, edema y escoriación grave y erosión, y el TDI indujo prurito conspicuo, piel deshidratada y liquenificación. Cuando los ratones sensibilizados se trataron con el microorganismo aislado, *L. sakei* Probio-65, no se observó edema en ninguno de los casos y por tanto los ratones tuvieron una puntuación de 12 tras una evaluación sensorial. En el dorso de los ratones sensibilizados con los alérgenos no creció pelo. Se consideró que esto se producía por la queratinización de la piel debido a la dermatitis inducida.

25 **Ejemplo 4-1: Efecto reductor de los niveles de IgE en suero de ratones con piel sensibilizada**

La actividad inmunopotenciadora de la cepa aislada *Lactobacillus sakei* Probio-65 se evaluó midiendo los niveles de IgE en suero en muestras sanguíneas de ratones sensibilizados.

Antes de sensibilizar con un alérgeno, los cinco grupos ensayados, grupo de tratamiento con control negativo, con control positivo (+DNCB), con control positivo (+TDI), con Probio-65 (+DNCB) y con Probio-65 (+TDI), presentaron niveles de IgE menores de 0,1 µg/ml, que eran más bajos que el nivel típico de 0,2 µg/ml. Inmediatamente después de sensibilizarse con DNCB, en comparación con los ratones de control negativos, los ratones de control positivos presentaron niveles de IgE 1175 veces más altos, y los ratones tratados con *L. sakei* Probio-65 presentaron niveles de IgE 1092 veces más altos. Después de sensibilizarse con un alérgeno, los ratones (grupos de tratamiento con Probio-65) ingirieron *L. sakei* Probio-65 junto con el pienso, y además, durante dos veces al día, se aplicó una pomada en forma de crema, preparada formulando sustancias inmunoactivas extraídas de *L. sakei* Probio-65, a lesiones cutáneas. Después de un periodo de ensayo, se prepararon muestras de suero y se evaluaron los niveles de IgE. Todos los grupos de control positivo y los grupos de tratamiento con Probio-65 mostraron una reducción en

los niveles de IgE en suero. Los grupos de control positivo mostraron una reducción del 46,4 % de 34,079 $\mu\text{g/ml}$ a 18,266 $\mu\text{g/ml}$. Por otro lado, los grupos de tratamiento con *L. sakei* Probio-65 presentaron una reducción del 70,75 % de 31,687 $\mu\text{g/ml}$ a 9,266 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados indican que *L. sakei* Probio-65 tenía el efecto reductor de los niveles de IgE en suero.

5

TABLA 4

Efecto reductor del nivel de IgE en suero de <i>L. sakei</i> Probio-65 después de la sensibilización de la piel con DNCB				
	A	B	C	I.D. (%)
Control (-)	0,065	0,029	0,043	
Control (+)	0,018	34,079 \pm 10,05	18,266 \pm 2,97	46,4
Probio-65	0,039	31,687 \pm 15,78	9,266 \pm 4,29	70,75

Unidad: $\mu\text{g/ml}$
 A: antes de la sensibilización con el alérgeno
 B: entre la sensibilización con el alérgeno y la aplicación de la pomada
 C: después de la aplicación de la pomada
 I.D.: índice de disminución (%)

TABLA 5

Efecto reductor del nivel de IgE en suero de <i>L. sakei</i> Probio-65 después de la sensibilización de la piel con TDI				
	A	B	C	I.D. (%)
Control (-)	0,065	0,029	0,043	
Control (+)	0,037	49,1 \pm 20,17	28,689 \pm 6,29	41,57
Probio-65	0,045	67,5 \pm 26,27	24,895 \pm 4,32	63,12

Unidad: $\mu\text{g/ml}$
 A: antes de la sensibilización con el alérgeno
 B: entre la sensibilización con el alérgeno y la aplicación de la pomada
 C: después de la aplicación de la pomada
 I.D.: índice de disminución (%)

Ejemplo 4-2: Efecto reductor de los niveles de IL-4 en esplenocitos de ratones con piel sensibilizada

- 10 Ratones sensibilizados se sacrificaron por luxación cervical y los bazos se extrajeron de los ratones de un modo aséptico. Se retiró el tejido adiposo y conectivo de los bazos extraídos. Se prepararon suspensiones de células sencillas y se centrifugaron. Después, los sobrenadantes se desecharon, y los eritrocitos se alteraron. Los esplenocitos así aislados se cultivaron y los sobrenadantes se recuperaron del cultivo y se evaluaron los niveles de interleucina-4 (IL-4) para determinar el efecto inmunológico de *L. sakei* Probio-65.
- 15 Los sobrenadantes del cultivo se obtuvieron del cultivo de esplenocitos a una densidad de 1×10^6 células/ml. Un control negativo mostró un nivel de IL-4 de 4,523 pg/ml. Los controles positivos sensibilizados con DNCB y TDI presentaron niveles de IL-4 de 5,007 pg/ml y 5,643 pg/ml, respectivamente, que aumentaron de 0,5 a 1,0 pg/ml en comparación con el control negativo.
- 20 Cuando los ratones sensibilizados con alérgeno se trataron con un cultivo de *L. sakei* Probio-65 y con la pomada, presentaron niveles de IL-4 de 4,352 pg/ml cuando sensibilizaron con DNCB y de 4,614 pg/ml cuando sensibilizaron con TDI. Estos niveles de IL-4 eran similares a los del control negativo.

Aplicabilidad industrial

- 25 La nueva cepa de *Lactobacillus sakei* Probio-65 de acuerdo con la presente invención tiene tolerancia a ácidos y tolerancia a ácidos biliares, inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos nocivos y tiene actividad inmunopotenciadora. En particular, la presente cepa tiene un excelente efecto inhibitor del crecimiento sobre *Staphylococcus aureus*, que es un factor agravante de la dermatitis atópica. Por tanto, la presente cepa es útil para la prevención y el tratamiento de la dermatitis atópica y para trastornos relacionados con alergias. Además, dado que la presente cepa estabiliza la microflora intestinal, esta resulta útil para la prevención y el tratamiento de la fermentación intestinal anómala. El presente microorganismo o un cultivo del mismo es útil en composiciones

ES 2 524 589 T3

farmacéuticas, de piensos, de alimentos y cosméticas.

<110> PROBIONIC.INC

5 <120> Nuevo Lactobacillus sakei Probio-65 ácido tolerante con capacidad para suprimir el crecimiento de microorganismos patógenos y el efecto antialérgico

<160> 1

10 <170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1487

<212> ADN

15 <213> Lactobacillus sakei Probio-65

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1487)

20 <223> Secuencia de ARNr 16S

<400> 1

```

gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg aacgcactct cgtttagatt gaaggagctt      60
gctcctgatt gataaacatt tgagtgagtg ggggacgggt gagtaacacg tgggtaacct      120
gccctaaagt gggggataac atttggaac agatgctaatac accgcataaa acctaacacc      180
gcatggtgta gggttgaaag atggtttcgg ctatcacttt aggatggacc cgcggtgcat      240
tagttagttg gtgaggtaaa ggctcaccaa gaccgtgatg catagccgac ctgagagggt      300
aatcggccac actgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtagggaa      360
tcttcacaa tggacgaaag tctgatggag caacgccgcg tgagtgaaga aggttttcgg      420
atcgtaaac tctgtttgtg gagaagaatg tatctgatag taactgatca ggtagtgacg      480
gtatccaacc agaaagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggtgg      540
caagcgttgt ccgatttat tgggcgtaaa gcgagcgcag gcggtttctt aagtctgatg      600
tgaaagcctt cgctcaacc gaagaagtgc atcggaaact gggaaacttg agtgcagaag      660

```

ES 2 524 589 T3

aggacagtgg aactccatgt gtagcggatga aatgcgtaga tatatggaag aacaccagtg	720
gggaaggcgg ctgtctggic tgtaactgac gctgaggctc gaaagcatgg gtagcaaaca	780
ggattanata ccctggtagt ccatgccgta aacgatgagt gctaggigtg ggagggtttc	840
cgcccttcag tgccgcagct aacgcattaa gcactccgcc tggggagtac gaccgcaagg	900
ttgaaactca aaggaattga cgggggcccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg	960
aagcaacgcg aagaacctta ccaggtcttg acatcctttg accactctag agatagagct	1020
ttcccttcgg ggacaaagtg acagggtggg catggttgc gtcagctcgt gtcgtgagat	1080
gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc cttattacta gttgccagca tttagttggg	1140
cactctagtg agactgccgg tgacaaaccg gaggaagggt gggacgacgt caaatcatca	1200
tgccccttat gacctgggct acacacgtgc tacaatggat ggtacaacga gttgcgagac	1260
cgcgagggtt agctaattct ttaaaacctat tctcagttcg gattgtaggc tgcaactcgc	1320
ctacatgaag ccggaatcgc tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc	1380
gggccttgta cacaccgccc gtcacacat gagagttgt aacacccaaa gccggtgagg	1440
taacccttcg gggagccagc cgtctaaggt gggacagatg attaggg	1487

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo aislado, *Lactobacillus sakei* Probio-65, depositado en la Colección Coreana de Cultivos Tipo con el número de acceso KCTC 10755BP.
- 5 2. Composición que comprende un microorganismo *de la reivindicación 1* para el tratamiento de infecciones de microorganismos patógenos nocivos.
3. Composición que comprende un microorganismo *de la reivindicación 1* para el tratamiento de la dermatitis atópica.
4. Composición que comprende un microorganismo *de la reivindicación 1* para el tratamiento de la fermentación intestinal anómala.
- 10 5. Composición que comprende un microorganismo *de la reivindicación 1* para el tratamiento de alergias.
6. Una composición de pienso que comprende un microorganismo *de la reivindicación 1*.
7. Una composición alimenticia que comprende un microorganismo *de la reivindicación 1*.
8. Una composición cosmética que comprende un microorganismo *de la reivindicación 1*.

Fig. 1

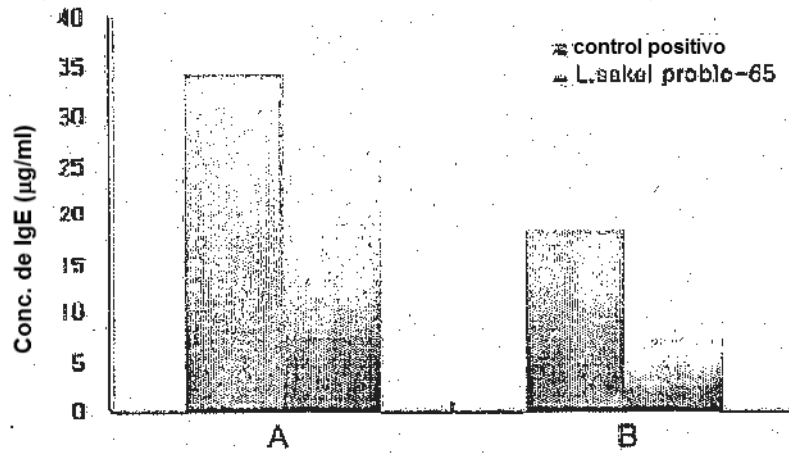


Fig. 2

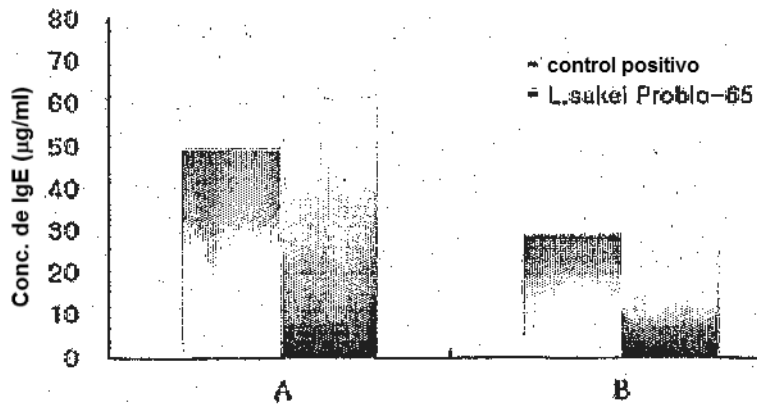


Fig. 3

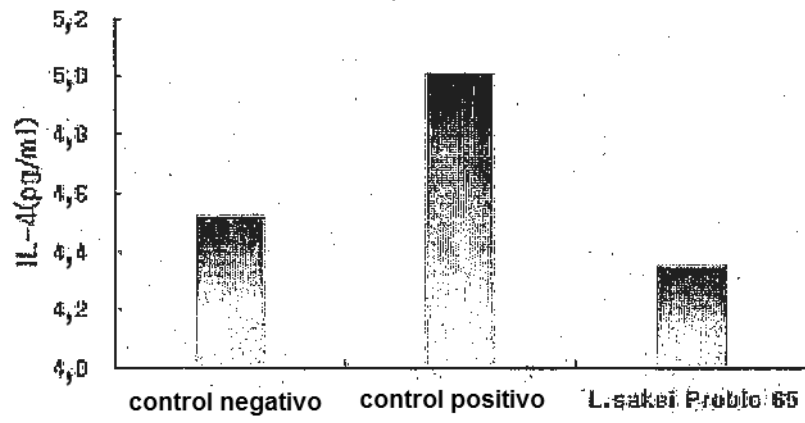


Fig. 4

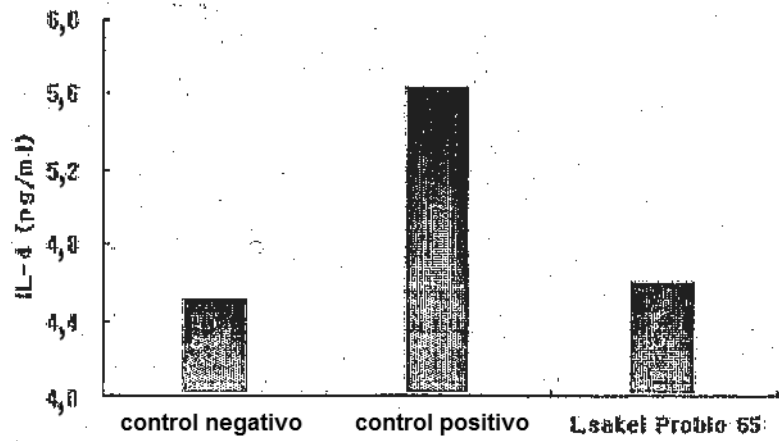


Fig. 5

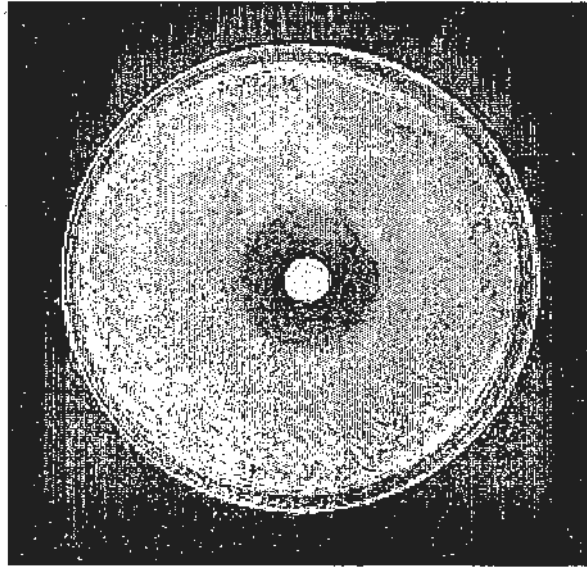


Fig. 6

