

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 095**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>A23C 9/12</b>	(2006.01)
<b>A23L 1/29</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/225</b>	(2006.01)
<b>A23L 1/30</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/01</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/74</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2010 E 10750390 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2407532**

54 Título: **Aislamiento, identificación y caracterización de cepas con actividad probiótica a partir de heces de lactantes alimentados exclusivamente con leche materna**

30 Prioridad:

**10.03.2009 WO PCT/ES2009/000130**

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

**24.03.2015**

73 Titular/es:

**HERO AG (100.0%)  
Karl Roth-Strasse 8  
5600 Lenzburg, CH**

72 Inventor/es:

**VIEITES FERNÁNDEZ, JOSÉ MARÍA;  
MUÑOZ QUEZADA, SERGIO;  
LLAMAS COMPANY, INMACULADA;  
MALDONADO LOZANO, JOSÉ;  
ROMERO BRAQUEHAIS, FERNANDO;  
SUÁREZ GARCÍA, ANTONIO FRANCISCO;  
GIL HERNÁNDEZ, ÁNGEL;  
GÓMEZ LLORENTE, CAROLINA y  
BERMÚDEZ BRITO, MIRIAM**

74 Agente/Representante:

**ARIZTI ACHA, Monica**

ES 2 532 095 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**

Aislamiento, identificación y caracterización de cepas con actividad probiótica a partir de heces de lactantes alimentados exclusivamente con leche materna.

5            Sector técnico de la invención

El objetivo general de este estudio es aislar microorganismos probióticos para un posterior uso en la industria alimenticia y farmacéutica, especialmente para utilizarlos en fórmulas lácteas para la infancia. Dichos microorganismos presentan valores elevados de resistencia a pH, sales biliares y adhesión a células intestinales, por lo que son especialmente indicados para ser empleados en las industrias anteriormente mencionadas.

10           Antecedentes de la invención

La nutrición ha tenido un desarrollo muy importante en estas últimas décadas, lo cual ha hecho cambiar su concepto. Antes se consideraba que la dieta tenía el papel de aportar los nutrientes necesarios para mantener el estado de salud, mientras que hoy en día este concepto ha evolucionado a la idea de que la dieta puede contener alimentos que además de nutrir, promueven la salud. Razón por la cual, la industria alimentaria ha comenzado a desarrollar una gran cantidad de productos que promueven la salud y el bienestar. En esta área la línea de alimentos funcionales ha tenido un desarrollo muy importante, donde el consumo de probióticos por parte de la población aumenta día a día. El reto actual es ampliar el conocimiento de estos alimentos, entre ellos los que contienen probióticos poseen un especial interés.

15           Existen antecedentes muy antiguos donde se relacionan efectos beneficiosos derivados del consumo de alimentos con alto contenido de bacterias. Como en la versión del viejo testamento donde se dice que Abraham atribuye su longevidad al consumo de leche, o el historiador romano Plinius que en el año 76 A.C. recomendó el uso de productos de fermentados de leche para el tratamiento de gastroenteritis (Senmier y De Vrese 2001).

25           A comienzos del siglo pasado, el microbiólogo Ruso Elie Metchnikoff (1845-1916) sugirió que el consumo de leche fermentada modulaba la microbiota intestinal produciendo un efecto positivo en la salud humana (Metchnikoff 1908). Fijó su atención en el hecho de que en Bulgaria existía un increíble número de personas centenarias, a pesar de ser uno de los países europeos más pobres. Observó que los búlgaros consumían grandes cantidades de yogur. Metchnikoff logró aislar la bacteria responsable de la producción del yogur y la utilizó en sus investigaciones. Era el inicio del estudio de los probióticos. Metchnikoff se volvió un firme defensor del concepto que la dieta puede proteger el cuerpo de la invasión de patógenos y en consecuencia mejorar y prolongar la calidad de vida. Fue además la primera persona en desarrollar un preparado utilizando lactobacilos en forma de cápsula para ingerir oralmente, denominado Lactobacillin.

30           En la misma época, el microbiólogo francés Tissier observó que la microbiota fecal de recién nacidos amamantados al pecho presentaban más bacterias del género *Bifidobacterium* que la microbiota fecal de niños que habían recibido leche artificial y reconoció el papel benéfico de este microorganismo.

35           Más tarde, en 1940, apareció la Leche Bifidus, para paliar las deficiencias nutritivas de los niños durante la 1ª Guerra Mundial. En 1950, la fabrica Degusta, elabora el Biogur y el Bio-garde. En 1989, en Suiza aumenta el consumo y la producción de leches fermentadas. En 1993, dos investigadores, Modler y Vila-García, desarrollan el primer yogur bio, de baja acidez.

40           En 1965 Lilly y Stillwell utilizaron por primera vez el término “probiótico”, para nombrar a los productos de la fermentación gástrica. Pero la definición de probiótico más válida y usada será la enunciada más tarde por Fuller (Fuller 1992, Fuller 1989). Los define como: “suplementos de microorganismos vivos que añadidos a los alimentos, ejercen efectos beneficiosos en la salud del receptor como consecuencia de condicionar una mejora en su balance microbiano intestinal”. Para el ser humano adulto incluye tanto productos derivados de leches fermentadas como preparados liofilizados con estas bacterias.

45           En 1998 el International Life Science Institute (ILSI) en Bruselas definió a los probióticos como microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, lo que va más allá de los efectos nutricionales convencionales. Afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo. Proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de enfermedad. Pueden ser funcionales para la población en general o para grupos particulares de la misma.

50           Actualmente existen criterios para la definición de microorganismos probióticos:

1.           Ser de origen humano.
2.           Ser de naturaleza no patogénica.
3.           Ser resistente a la destrucción por procesos técnicos.

4. Ser resistente a la destrucción por el ácido gástrico y bilis.
5. Adherirse al epitelio intestinal.
6. Ser capaz de colonizar el tracto gastrointestinal.
7. Producir sustancias antimicrobianas.
- 5 8. Modular la respuesta inmune.
9. Influenciar las actividades metabólicas humanas (asimilación de colesterol, producción de vitaminas, etc).

Las bacterias probióticas pueden influenciar a todas las células del intestino y los mecanismos de acción de estas incluyen efectos sobre la microbiota (Backhed y Ley 2005), la modulación de la función inmune (Picard *et al.* 2004; Kalliomaki 2004) y el aumento de la función de la barrera epitelial (Madsen *et al.* 2001; Isolauri & Salminen 2005).

- 10 Dentro de las bacterias con actividad probiótica, las del género *Bifidobacterium* son las más abundantes en el intestino, con el 25% de bacterias en el colon adulto y 95% en el recién nacido con lactancia materna. Actualmente, se pueden encontrar muchos productos alimenticios (yogur y leches) que son suplementados con este tipo de bacterias. Otras cepas que también tiene actividad probiótica son las del género *Lactobacillus*, que según estudios "in vitro" inhiben la adhesión de otras bacterias anaeróbicas como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*,  
 15 *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterobacteriaceas* (Silva *et al.* 1987).

El uso de probióticos como herramienta médica en algunas patologías está muy aceptado y la evidencia de su eficacia es fuerte, principalmente como resultado de los estudios clínicos y meta-análisis, para malabsorción de lactosa, (Adolfsson *et al.* 2004; Piaia *et al.* 2003) infecciones gastrointestinales (Brownlee *et al.* 2003) y diarrea asociada al uso de antibióticos (D'Souza *et al.* 2002). Además, el uso de bacterias probióticas ya sean  
 20 Bifidobacterias, Lactobacilos y/o una mezcla de ellas han mostrado efectos beneficiosos sobre algunas enfermedades digestivas. La evidencia en la literatura sobre los efectos beneficiosos es muy amplia.

La comprensión de la relación existente entre los componentes de la microbiota intestinal es muy compleja, así como la interacción con el huésped. La genómica facilita el análisis de la respuesta de bacterias aisladas a las condiciones intestinales, revelando en parte la capacidad metabólica de las cepas, sin embargo, las condiciones en  
 25 las cuales se pueden expresar estas capacidades, así como las condiciones para poder aislar la mayor parte de las cepas que componen la microbiota intestinal, es aún poco conocido, pudiendo ser solo identificadas mediante herramientas moleculares que identifican parte o totalmente su genoma. Es por esta razón el desarrollo en el área de los probióticos y de alimentos funcionales está en pleno desarrollo.

Así, teniendo en cuenta que existen diferentes efectos entre las cepas de probióticos y que variedades de bacterias pertenecientes a la misma especie pueden presentar características fisiológicas diferentes, que les otorguen propiedades probióticas diferentes o mejoradas frente a otras bacterias, la identificación y caracterización de los efectos de nuevas cepas prebióticas, es de alta importancia a la vista de su interés en la salud e industrial.  
 30

El objetivo general de este estudio es aislar microorganismos probióticos con mejores propiedades probióticas resistencia a pH ácido, resistencia a sales biliares y de adhesión a células intestinales, para un posterior uso en la industria alimenticia o farmacéutica, especialmente para utilizarlos en fórmulas lácteas para la infancia.  
 35

La presente invención proporciona y caracteriza microorganismos probióticos, aislados de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna.

La mayor resistencia al pH y a las sales biliares, de las cepas objeto de la invención, confiere al microorganismo probiótico una mayor capacidad de supervivencia a su paso por el estómago e intestino y de esta forma aumenta su efecto colonizador y, por consiguiente, su efecto antagónico frente a otras bacterias potencialmente patogénicas. Por otra parte, la mayor adherencia a las células intestinales humanas de la cepa de probiótico, que constituye el objeto de la invención, posibilita una mayor acción sobre todo de modulación del sistema inmunológico.  
 40

#### Objeto de la invención

La presente invención proporciona microorganismos probióticos aislados de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna. Dichos microorganismos, dadas sus mejores propiedades probióticas que confieren efectos beneficiosos en la salud de quienes los ingieren, son de aplicación en la industria alimenticia o farmacéutica, especialmente para su uso en fórmulas lácteas para la infancia.  
 45

Para el aislamiento de dichos microorganismos probióticos, la presente invención se plantea los siguientes objetivos específicos: a) aislar cepas bacterianas ácido lácticas, obtenidas a partir de heces de niños alimentados exclusivamente al pecho; b) evaluar la resistencia al pH y a sales biliares; y c) evaluar la adherencia a células epiteliales intestinales.  
 50

Es habitual buscar bacterias probióticas en las heces de los bebés. Además, hay cierta tradición de recomendar que los probióticos deben ser de origen humano, supuestamente porque se implantarían mejor en nuestro intestino. Sin embargo, muchas de las cepas aisladas no cumplen con la condición de probiótico ya que su resistencia a los jugos digestivos es escasa o nula y muchas de ellas no se adhieren al epitelio intestinal. En la presente invención seleccionamos lactantes alimentados con leche materna exclusivamente para asegurar que no son bacterias comerciales las que se aíslan. Además, se ha visto que la microbiota intestinal de los bebés alimentados con leche materna es muy rica en bifidobacterias y lactobacilos.

En relación a los probióticos, un probiótico efectivo debe caracterizarse por:

1. Su capacidad para ejercer un efecto beneficioso sobre el hospedador Ej. Resistencia a enfermedades.
2. No provocar patogenicidad o toxicidad.
3. Capacidad de sobrevivir al paso por el tracto intestinal. Ej. Resistencia al ácido gástrico y a ácidos biliares.
4. Capacidad para mantener la adherencia a las células de la pared intestinal.
5. Tiempo de generación breve, estable y capaz de mantenerse viable durante largos periodos bajo condiciones de almacenamiento.
6. Ser de origen humano.
7. Producción de sustancias antimicrobianas ante patógenos, propiedades antineoplásicas.
8. Tener la habilidad de influir en la actividad metabólica.

Entre las ventajas para la salud que se asocian a la ingesta de probióticos, se encuentran:

1. Alivio de los síntomas derivados de la mala absorción de lactosa.
2. Incremento de la resistencia natural a enfermedades infecciosas del tracto intestinal.
3. Reducción de la concentración sérica de colesterol.
4. Mejora de la digestión.
5. Estimulación de la inmunidad gastrointestinal.
6. Desarrollo de inmunotolerancia a los antígenos alimentarios y disminución del riesgo de alergias

Así, la presente invención se refiere a un nuevo microorganismo probiótico aislado de heces de bebés. Específicamente la invención se refiere al microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A (CNCM I-4036). Dicho microorganismo presenta mejores propiedades probióticas frente a microorganismos de la misma especie.

Formulación se refiere a las composiciones o conjunto de uno o varios ingredientes, esto es, clase y número de los elementos presentes en una sustancia compleja (producto alimenticio o forma farmacéutica, entre otros) y proporción en que se encuentren.

Por "carrier" se entiende cualquier tipo de sustancia que permite el crecimiento, transporte y/o administración de la cepa de la presente invención. En función del destino y/o uso al que se vaya a destinar dicha cepa, los "carriers" podrán ser de distinta naturaleza. La presente invención se refiere a "carriers" farmacéuticamente aceptables como aquellos habitualmente asociados a cápsulas, tabletas o polvo, así como a "carriers" constituidos por ingredientes o productos alimenticios.

Los productos alimenticios destinados a una alimentación especial son productos alimenticios que, por su composición particular o por el particular proceso de su fabricación, se distinguen claramente de los productos alimenticios de consumo corriente, que son apropiados para el objetivo nutritivo indicado y que se comercializan indicando que responden a dicho objetivo. (DIRECTIVA 89/398/CEE del Consejo, de 3 de mayo de 1989, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los productos alimenticios destinados a una alimentación especial (DO serie L núm. 186 de 30 de junio)).

Por alimentación especial se entiende aquella que debe satisfacer las necesidades nutritivas particulares de:

- i) determinadas clases de personas que tienen el proceso de asimilación o de metabolismo trastornado, o
- ii) determinadas clases de personas que se encuentran en condiciones fisiológicas particulares y que, por ello, obtienen beneficios especiales de una ingestión controlada de determinadas sustancias de los alimentos, o
- iii) los lactantes o los niños de corta edad, con buena salud.

- Complemento alimenticio se refiere a aquellos productos alimenticios cuyo fin sea complementar la dieta normal y consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada, es decir cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras y otras formas similares, bolsitas de polvos, ampollas de líquido, botellas con cuentagotas y otras formas similares de líquidos y polvos que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias; (Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 10 de junio de 2002 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios).
- 5 Probiótico se refiere a aquellos preparados celulares microbianos o células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud y el bienestar del huésped.
- 10 Por prebiótico se entiende “un ingrediente de la dieta que no es digerible y el cual beneficia y estimula el crecimiento de bacterias intestinales que mejoran el balance intestinal del huésped”. Dentro de los prebióticos utilizados están: inulina, oligofructosacáridos, galactooligosacáridos, oligosacáridos procedentes de la hidrólisis de pectinas y otras gomas y mucílagos, y almidones y maltodextrinas resistentes, así como nucleótidos.
- 15 Un objeto de la presente invención se refiere a la cepa de microorganismo probiótico aislada de heces de niños alimentados exclusivamente de leche materna caracterizada por consistir en *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A (CNCM I-4036).
- En una realización, la cepa descrita anteriormente se presenta en forma de cultivo biológico puro. En otra realización la cepa es aislada.
- 20 En una realización la cepa de microorganismo anteriormente descrita se presenta en forma de células viables; en otra realización la cepa se presenta en forma de células no viables.
- Otro objeto de invención se refiere a la formulación que comprende una cepa de microorganismo según se ha descrito anteriormente. En una realización particular, dicha formulación comprende otro material probiótico, en otra realización, adicionalmente comprende material prebiótico.
- 25 En otra realización particular la formulación descrita comprende un carrier apto para su ingesta. Dicho carrier es farmacéuticamente aceptable, como aquellos habitualmente asociados a cápsulas, tabletas o polvo.
- En otra realización particular dicho carrier es un producto alimenticio. Dicho producto alimenticio se selecciona entre el grupo de leches y productos lácteos derivados, especialmente leches fermentadas y quesos; cereales y derivados, incluidas masas panarias; sopas y otros productos similares en forma deshidratada; productos cárnicos fermentados; derivados de frutas, zumos y bebidas refrescantes; alimentos para usos nutricionales específicos.
- 30 Otro objeto de invención se refiere a la cepa de microorganismo probiótico o formulación anteriormente descritas para su uso en alimentación. En una realización, dicha alimentación se refiere a alimentación infantil y/o adulta y/o especial.
- En otra realización la cepa de microorganismo probiótico o formulación anteriormente descritas son usadas para la elaboración de fórmulas lácteas para la infancia. En una realización particular, dichas fórmulas consisten en leches infantiles y/o cereales infantiles, y/o alimentos infantiles listos para comer.
- 35 En otra realización, la cepa de microorganismo probiótico o formulación anteriormente descritas son empleadas para la elaboración de complementos alimenticios.
- En otra realización, la cepa de microorganismo probiótico o formulación anteriormente descritas son empleadas para la elaboración de fórmulas especiales para nutrición oral y/o enteral.
- 40 En otra realización la cepa de microorganismo probiótico o formulación anteriormente descritas son empleadas para la elaboración para aplicación farmacéutica/ aplicable como medicamento/ para su uso en la elaboración de un producto farmacéutico.
- En otra realización la cepa de microorganismo probiótico o formulación anteriormente descritas son aplicables en la estimulación del sistema inmune y/o en la prevención/tratamiento del asma y/o en la prevención/tratamiento de los trastornos gastrointestinales, y/o en la eliminación/modulación de los principales patógenos digestivos, y/o en la prevención/tratamiento de la obesidad y de sus comorbilidades incluido el síndrome metabólico y la diabetes y/o en las enfermedades propias asociadas al envejecimiento.
- 45 Dichos trastornos gastrointestinales comprenden alteraciones del tránsito intestinal, como estreñimiento y alteraciones de la biodisponibilidad de minerales, infecciones y síndromes malabsortivos.
- 50 Dichos síndromes malabsortivos comprenden trastornos que afectan a la anatomía del intestino, como el síndrome del intestino corto, y trastornos que afectan a la fisiología del intestino como fibrosis quística del páncreas, malabsorción de azúcares, especialmente lactosa, alteraciones de la absorción de lípidos, alergias alimentarias, y enfermedades inflamatorias intestinales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

Descripción de las figuras

**Figura 1:** A través de una tabla, dicha figura muestra la influencia del pH sobre la supervivencia de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, comparado con dos cepas comercializadas. En concreto, dicha tabla muestra los valores de viabilidad (en unidades formadoras de colonias en % de los estudios de resistencia a pH de las cepas aisladas *Lactobacillus rhamnosus* 22A (CNCM I-4036), *Lactobacillus paracasei* 7 (CNCM I-4034) y sus respectivos controles comerciales. Dichos valores son mostrados como % de supervivencia por comparación del número de bacterias presentes en el control frente al número de bacterias presentes a los distintos pH ensayados. Los resultados son expresados en unidades de porcentaje en la columna %. Puede observarse que a pH 3 las cepas 7 y 22 A presentan una resistencia similar o ligeramente superior a las cepas comerciales ensayadas. No obstante, a pH 2 la cepa 22A presenta una viabilidad muy elevada comparada con el resto de las cepas que no sobreviven a este pH.

**Figura 2.** A través de una tabla, dicha figura muestra la influencia de las sales biliares (Oxgall) sobre la supervivencia de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, comparado con dos cepas comercializadas. Así, dicha tabla muestra los valores de viabilidad de los estudios de resistencia frente a sales biliares de las cepas aisladas *Lactobacillus rhamnosus* 22A (CNCM I-4036), *Lactobacillus paracasei* 7 (CNCM I-4034) y sus respectivos controles comerciales. Dichos valores son mostrados como % de supervivencia por comparación del número de bacterias presentes en el control frente al número de bacterias presentes a las distintas concentraciones de sales biliares ensayadas. Los resultados son expresados en unidades de porcentaje en la columna %. Según se desprende de los resultados, ambas cepas 7 y 22A muestran un porcentaje de supervivencia muy superior a las cepas comerciales ensayadas, alrededor del doble, tanto a concentraciones de 0,3% y 0,7% de sales biliares. Ambas cepas tienen una supervivencia superior al 100% lo que indica que incluso pueden reproducirse en presencia de estas sales. Esto indica un elevado potencial colonizador de las cepas, unido a su elevada resistencia al pH.

**Figura 3.** A través de una tabla, dicha figura muestra la adhesión a células intestinales humanas HT-29 de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, comparado con dos cepas comercializadas. Dicha capacidad es mostrada a través de los valores de viabilidad de los estudios de adhesión a células epiteliales intestinales de las cepas aisladas *Lactobacillus rhamnosus* 22A (CNCM I-4036), *Lactobacillus paracasei* 7 (CNCM I-4034) y sus respectivos controles comerciales. Dichos valores son mostrados como % de bacterias adheridas por comparación con el número de bacterias presentes en el control. Ambas cepas presentan unos porcentajes de adhesión a las células intestinales humanas HT-29 muy superiores a los de las cepas comerciales ensayadas, lo que indica su potencial acción en la modulación de actividades celulares del intestino incluida la inmunomodulación.

**Figura 4.** A través de una tabla, dicha figura muestra la influencia del pH sobre la supervivencia de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, comparado con dos cepas comercializadas. Dicha influencia es mostrada a través de los valores de viabilidad de los estudios de resistencia a pH, de dicha cepa frente a sus respectivos controles comerciales. Dichos valores son mostrados como % de supervivencia por comparación del número de bacterias presentes en el control frente al número de bacterias presentes a los distintos pH ensayados. Los resultados son expresados en unidades de porcentaje en la columna %. Puede observarse que a pH 3 la cepa 15B muestra una resistencia significativamente muy superior a la de las otras dos bifidobacterias ensayadas, siendo su viabilidad superior al 100% lo que indica que incluso la bacteria puede reproducirse a ese pH.

**Figura 5.** A través de una tabla, dicha figura muestra la influencia de las sales biliares (Oxgall) sobre la supervivencia de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, comparado con dos cepas comercializadas. Esta influencia es mostrada mediante estudios de resistencia a sales biliares de la cepa aislada *Bifidobacterium breve* 15B (CNCM I-4035) y sus respectivos controles comerciales. Dichos valores son mostrados como % de supervivencia por comparación del número de bacterias presentes en el control frente al número de bacterias presentes a las distintas concentraciones de sales biliares ensayadas. Los resultados son expresados en unidades de porcentaje en la columna %. Los valores de supervivencia en presencia de sales biliares a concentraciones bajas es similar a las de las otras dos bifidobacterias. Sin embargo, la cepa 15B muestra una mayor supervivencia a concentraciones más elevadas.

**Figura 6.** A través de una tabla, dicha figura muestra la adhesión a células intestinales humanas de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, comparado con dos cepas comercializadas. Dicha capacidad es mostrada a través de los valores de viabilidad de los estudios de adhesión a células epiteliales intestinales de la cepa aislada *Bifidobacterium breve* 15B (CNCM I-4035) y sus respectivos controles comerciales. Dichos valores son mostrados como % de bacterias adheridas por comparación con el número de bacterias presentes en el control. La cepa presenta un porcentaje de adhesión a las células intestinales humanas HT-29 muy superior a la de las cepas comerciales ensayadas, lo que indica su potencial acción en la modulación de actividades celulares del intestino incluida la inmunomodulación.

**Figura 7** Dicha figura muestra las actividades enzimáticas (en unidades de: Unidades/ml de medio de cultivo) de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 (*Bifidobacterium breve* 15B), comparado con dos cepas comercializadas (sus controles). Los resultados están expresados como se describe en el ejemplo 11. Los resultados obtenidos

permiten concluir que la actividad fermentativa de CNCM I-4035 coincide con la de una especie del género *Bifidobacterium*, permitiendo clasificar a CNCM I-4035 dentro de dicho género

**Figura 8.** Dicha figura muestra las actividades enzimáticas de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (*Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A) y *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 (*Lactobacillus paracasei* HERO 7), comparado con dos cepas comercializadas (controles). Los resultados están expresados como se describe en el ejemplo 11. Los resultados obtenidos permiten concluir que la actividad fermentativa de HERO 7 y HERO 22A coincide con la de las especies del género *Lactobacillus paracasei* y *rhamnosus*, permitiendo clasificar a CNCM I-4036 y CNCM I-4034 dentro de dichos géneros y especies respectivas.

**Figura 9.** Las figuras 9A y 9B muestran los resultados de actividades fermentativas de hidratos de carbono y de otros sustratos (API 50 CHL) de las cepas CNCM I-4034 (*Lactobacillus paracasei* HERO 7) y CNCM I-4036 (*Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A) seleccionadas y sus controles. Los resultados están expresados como se describe en el ejemplo 11. Los resultados obtenidos permiten concluir que la actividad fermentativa de HERO 7 (CNCM I-4034) y HERO 22A (CNCM I-4036), coincide con la de las especies del género *Lactobacillus paracasei* y *rhamnosus*, permitiendo clasificar a CNCM I-4036 y CNCM I-4034 dentro de dichos géneros.

**Figura 10.** Las figuras 10A, 10B y 10C muestran los resultados del efecto ejercido sobre *L. monocytogenes* CECT 4031 y *S. sonnei* CECT 457 de las bacterias probióticas de la presente invención. (A) efecto ejercido sobre *L. monocytogenes* CECT 4031 a partir de sobrenadante concentrado 10x obtenido tras 17h de crecimiento de *L. paracasei* CNCM I-4034. (B) efecto ejercido sobre *L. monocytogenes* CECT 4031 a partir de sobrenadante concentrado 10x obtenido tras 24h de crecimiento de *B. breve* CNCM I-4035. (C) efecto ejercido sobre *S. sonnei* CECT 457 a partir de sobrenadante concentrado 10x obtenido tras 24 h de crecimiento de *L. rhamnosus* CNCM I-4036.

**Figura 11.** La figura 11 muestra los resultados de los efectos inhibitorios del sobrenadante *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, a 17 y 24h de tiempo de cultivo, neutralizado y sin neutralizar, al 1% y 4% para las bacterias *Salmonella typhi* CECT 725, *Salmonella typhimurium* CECT 443 y *Salmonella typhimurium* CECT 4594. (A) efecto inhibitorio de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, a 17h de tiempo de cultivo sin neutralizar para las bacterias *Salmonella typhimurium* CECT 443. (B) efecto inhibitorio de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, a 24h de tiempo de cultivo sin neutralizar para las bacterias *Salmonella typhimurium* CECT 4594. (C) efecto inhibitorio de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, a 24h de tiempo de cultivo sin neutralizar para las bacterias *Salmonella typhi* CECT 725. (D) efecto inhibitorio de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, a 24h de tiempo de cultivo neutralizado para las bacterias *Salmonella typhi* CECT 725. (E) efecto inhibitorio de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, a 17h de tiempo de cultivo sin neutralizar para las bacterias *Salmonella typhi* CECT 725

**Figura 12.** La figura 12 muestra los efectos inhibitorios del sobrenadante *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, a 17 y 24h de tiempo de cultivo, neutralizado y sin neutralizar, al 1% y 4% para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725. (A) efectos inhibitorios del sobrenadante *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, a 17h de tiempo de cultivo, sin neutralizar, al 1% y 4% para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725. (B) efectos inhibitorios del sobrenadante *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, a 17h de tiempo de cultivo, neutralizado, al 1% y 4% para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725. (C) efectos inhibitorios del sobrenadante *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, a 24h de tiempo de cultivo, sin neutralizar, al 1% y 4% para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725. (D) efectos inhibitorios del sobrenadante *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, a 24h de tiempo de cultivo, neutralizado, al 1% y 4% para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725.

**Figura 13.** La figura muestra los efectos inhibitorios del sobrenadante *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, a 17 y 24h de tiempo de cultivo, neutralizado y sin neutralizar, al 1% y 4% para las bacterias *Salmonella typhi* CECT 725, *Salmonella typhimurium* CECT 4594, *Escherichia coli* ETEC CECT 501, *Escherichia coli* ETEC CECT 515, *Escherichia coli* EPEC CECT 729 y *Escherichia coli* EPEC CECT 742. (A) efectos inhibitorios del sobrenadante *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, a 17h de tiempo de cultivo, sin neutralizar, al 1% y 4% para las bacterias *Salmonella typhi* CECT 725. (B) efectos inhibitorios del sobrenadante *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, a 24h de tiempo de cultivo, sin neutralizar, al 1% y 4% para las bacterias *Salmonella typhi* CECT 725. (C) efectos inhibitorios del sobrenadante *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, a 24h de tiempo de cultivo, neutralizado, al 1% y 4% para las bacterias *Salmonella typhimurium* CECT 4594. (D) efectos inhibitorios del sobrenadante *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, a 17h de tiempo de cultivo, sin neutralizar, al 1% y 4% para las bacterias *Escherichia coli* ETEC CECT 501. (E) efectos inhibitorios del sobrenadante *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, a 24h de tiempo de cultivo, sin neutralizar, al 1% y 4% para las bacterias *Escherichia coli* ETEC CECT 501. (F) efectos inhibitorios del sobrenadante *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, a 17h de tiempo de cultivo, sin neutralizar, al 1% y 4% para las bacterias *Escherichia coli* ETEC CECT 515. (G) efectos inhibitorios del sobrenadante *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, a 17h de tiempo de cultivo, sin neutralizar, al 1% y 4% para las bacterias *Escherichia coli* EPEC CECT 729. (H) efectos inhibitorios del sobrenadante *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, a 24h de tiempo de cultivo, neutralizado, al 1% y 4% para las bacterias *Escherichia coli* EPEC CECT 742.

**Figura 14.** La figura 14 muestra la reducción de focos de infección obtenidos en los virus Ito, Wa y VA70 sobre la línea HT-29 a partir de sobrenadantes concentrados 1x de las cepas de la presente invención tras (A) 17h de crecimiento y (B) 24h de crecimiento.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un microorganismo probiótico con mejores propiedades probióticas de resistencia a pH, sales biliares y adhesión. En concreto, la presente invención aísla y caracteriza las bacterias *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A (CNCM I-4036), aisladas de heces de lactantes.

Se sabe que las superficies de las mucosas están colonizadas por una gran cantidad y diversidad de microorganismos. En el adulto numéricamente existen más células procarióticas que eucarióticas, de hecho se estima que el 90% de nuestras células son microbianas, mientras que solo el 10% corresponden a eucarióticas (Savage 1977). La influencia de esta comunidad microbiana sobre nuestra fisiología probablemente es más pronunciada en el intestino, debido a que este órgano contiene la mayoría de estos organismos. La densidad en el intestino delgado proximal y medio es relativamente baja, pero existe un aumento considerable en el intestino delgado distal, la cual puede alcanzar  $10^8$  cfu/ml del contenido luminal, y en el colon llega a  $10^{11}$ - $10^{12}$ /g.

Durante los primeros días de vida, existe el mayor cambio en la composición de la microbiota intestinal. En el nacimiento el intestino se encuentra estéril y dentro de las primeras horas de vida las bacterias comienzan a aparecer en las deposiciones. El tracto gastrointestinal es colonizado primero por la flora bacteriana vaginal y fecal de la madre. Los primeros en colonizar el intestino son los que tienen un alto potencial reductor, que incluye especies como enterobacterias, estreptococos y estafilococos. Gradualmente el consumo de oxígeno por parte de estas bacterias cambia el medioambiente intestinal, permitiendo el crecimiento de anaerobios incluyendo lactobacilos y bifidobacterias. Estas bacterias que colonizan al recién nacido son principalmente de la madre y del medioambiente, siendo el tipo de parto uno de los principales determinantes de la microbiota intestinal (Bezirtzoglou 1997).

El ecosistema intestinal está formado por la interacción entre la microbiota, el epitelio intestinal, sistema inmune mucoso, y sistema nervioso entérico (Gordon *et al.* 1997). La comparación de ratas normales y ratas con intestino libre de gérmenes ha revelado una serie de diferencias anatómicas, bioquímicas y fisiológicas. Por ejemplo, la presencia de la microbiota aumenta el intercambio epitelial, también conjuga y deshidroxila los ácidos biliares, metaboliza la bilirrubina y reduce el colesterol a coprostanol.

Por lo cual, la relación entre intestino y microbiota es muy estrecha y puede ser vista como una relación simbiótica, ya que por ejemplo, la microbiota puede degradar carbohidratos que el intestino no puede debido a la falta de maquinaria enzimática. Los productos generados por esta degradación son principalmente utilizados como nutrientes para el epitelio intestinal, como sucede con los ácidos grasos de cadena corta. Además, la presencia de esta microbiota tiene un efecto de inmuno-modulación, ya que la principal característica fisiológica de la mucosa intestinal es la capacidad de montar una respuesta enérgica contra patógenos invasivos que pueden colonizar el epitelio intestinal, y al mismo tiempo presentar una nula respuesta a bacterias contenidas en alimentos o frente a la microbiota residente. Esta falta de respuesta es un proceso activo de varios mecanismos, llamado tolerancia oral. Este proceso es esencial para que el huésped no desarrolle una respuesta inflamatoria frente a la presencia de cualquier microorganismo y de esta forma puede presentar diferentes respuestas frente a distintos microorganismos, ayudando así, a la estabilidad de la flora intestinal. Razón por la cual, tener una microbiota de composición normal puede ayudar al huésped al desarrollo fisiológico, inmune y metabólico. Este ecosistema se mantiene en equilibrio, y cualquier causa que rompa este equilibrio puede desencadenar alguna patología (diarreas, enfermedades inflamatorias).

Es de interés entender la importancia de este ecosistema, la función de cepas no patológicas o "bacterias buenas". Sobre esta idea se ha desarrollado el concepto de probióticos como mediadores de la salud humana. Dentro de las diferentes áreas estudiadas, la influencia de los probióticos sobre la modulación de la expresión génica en diferentes situaciones, es una de las más interesantes.

Como ya se indicó anteriormente, la presente invención aísla bacterias ácido lácticas y bifidobacterias con mejores propiedades probióticas a partir de heces de niños alimentados exclusivamente al pecho. Para esto, a las bacterias aisladas se les evaluó la resistencia a pH, sales biliares y capacidad de adhesión a células epiteliales intestinales. Los resultados fundamentales de la presente invención indican que en las heces de estos lactantes existen bacterias altamente resistentes a pH gástrico, a las sales biliares y con capacidad de adhesión a células epiteliales del intestino, que pueden ser usadas como probióticos.

Para comprobar la actividad probiótica de las bacterias, éstas deben ser inicialmente sometidas a una serie de ensayos *in vitro* que simulen las condiciones a las que dichas bacterias se verán sometidas en el organismo, debiendo mantenerse viables en dichas condiciones, y conservando por tanto sus propiedades beneficiosas para la salud. En la presente invención, las bacterias controles empleadas (Ejemplo 12), frente a las cuales las bacterias de la invención muestran sus mejores propiedades probióticas son, para Bifidobacterias: *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum*, suministrado por Hero España S.A., y para Lactobacilos, se utilizan 2 lactobacilos comerciales: *Lactobacillus casei* (Danone®) y *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) (VALIO®).

Teniendo en cuenta el interés de las bacterias que constituyen esta invención en la estimulación del sistema inmune y en su actuación sobre los principales patógenos digestivos, estas bacterias control han sido seleccionadas porque están actualmente comercializadas a nivel internacional en forma de leches fermentadas y otras formas farmacéuticas y existen varias publicaciones sobre sus efectos probióticos especialmente en la prevención de la diarrea aguda en niños y la modulación del sistema inmunológico tanto en animales como en humanos

Así, los ensayos *in vitro* indicados se refieren a:

#### Resistencia a la acidez gástrica

Antes de alcanzar el tracto intestinal, las bacterias probióticas deben sobrevivir a su paso a través del estómago (Henriksson *et al.* 1999). La secreción de ácido gástrico en el estómago constituye un primer mecanismo de defensa frente a la mayoría de la carga de microorganismos que entran vía oral. Por ello, la supervivencia de las cepas bacterianas en ácido gástrico es la más certera indicación de su habilidad para pasar a través del estómago. *The University College of Cork-based Probiotic Research Group* aisló con éxito e identificó bacterias ácido lácticas que mostraban rasgos de probiótico ideal (Dunne *et al.* 1999). Llevaron a cabo unos experimentos preliminares para determinar el grado de resistencia inicial que presentaban cepas de lactobacilos y bifidobacterias aisladas del íleon humano. El jugo gástrico humano fue obtenido de individuos sanos por aspiración a través de un tubo nasogástrico. Dado que el pH en el estómago es fluctuante (puede llegar a 1,5), se midió antes de usarlo. Este ácido fue añadido al medio MRS (*Medium Rogosa Sharpe*). La supervivencia inicial de las cepas se valoró en 108% y 106% para *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* respectivamente, en medio MRS (De Man *et al* 1960) con HCl que corrige el valor de pH entre 2,0 y 3,4. Los resultados mostraban una mayor sensibilidad a la acidez por parte de *Bifidobacterium* (Thornton 1996). Así, la cepa que constituye la presente invención, presenta unos valores de resistencia mayores que los de las cepas estudiadas en dichos experimentos, es decir presenta mayor resistencia a la acidez (figuras 1 y 4).

#### Resistencia a las sales biliares

Como anteriormente se ha expuesto, para caracterizar un potencial probiótico, este debe también ser capaz de resistir las sales biliares (Lee y Salminen 1995). Los ácidos biliares son sintetizados en el hígado a partir de colesterol y son secretados desde la vesícula biliar al duodeno en forma de conjugados (500-700 mL/día) estos ácidos experimentan más modificaciones químicas (desconjugación, deshidrolización, deshidrogenación, y desglucuronidación) en el colon casi sólo como resultado de la actividad microbiana. Ambos ácidos conjugados y desconjugados, presentan actividad antibacteriana inhibiendo el crecimiento de cepas *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, y *Enterococcus sp in vitro* (Lewis *et al* 1972; Stewart *et al* 1986). Las formas desconjugadas son más inhibitorias y las Gram positivas más sensibles que las Gram negativas (Floch *et al.* 1972; Percy-Robb 1972). El grupo de Dunne (Dunne *et al.* 1999) para evaluar la resistencia a sales biliares de las cepas que seleccionaron, en un primer ensayo, usaron un medio sólido de crecimiento suplementado con ácido biliar de origen bovino, porcino, y humano hasta una concentración final de 0,3% y 7,5%. Tras dejar crecer lactobacilos y bifidobacterias, el resultado fue, que exhibían resistencia al ácido biliar de origen bovino y que el de origen porcino resultaba mucho más inhibitorio para ambos grupos bacterianos (Thornton 1996). Así, en relación a la búsqueda del posible probiótico para el consumo humano, el resultado más relevante es su capacidad para crecer en la bilis de origen humano. Teniendo en cuenta que la bilis humana no está estandarizada y que su contenido en ácidos biliares varía mucho de un individuo a otro, es práctica habitual en el estado de la técnica el uso de bilis de origen bovino, estandarizada en su contenido en ácidos biliares (OXGALL), como sustitutivo de la bilis humana, permitiendo protocolizar ensayos reproducibles. Este ha sido el método seguido en la presente invención para el estudio de la resistencia a sales biliares de las bacterias que constituyen la presente invención. Los resultados obtenidos, muestran que dichas bacterias presentan mayor resistencia a sales biliares que sus controles comerciales (figuras 2 y 5).

#### Adherencia epitelio intestinal de cepas probióticas

La adhesión de las cepas adheridas al tejido epitelial del intestino y la habilidad para colonizar el tracto gastrointestinal debe ser también valorada en la selección. La importancia de este hecho reside en que después de seleccionados muchos de los probióticos más tarde no son capaces de colonizar a su hospedador diana. De hecho, de los actualmente disponibles parece que solo *L. rhamnosus* GG permanece dentro del tracto gastrointestinal un período significativo de tiempo (Berg *et al.* 1998; Goldin *et al.* 1992). *L. rhamnosus* GG se adhiere a células Caco-2. Las células HT-29 y Caco-2 pertenecen a líneas celulares intestinales humanas, expresan las características morfológicas y fisiológicas de un colonocito normal humano y son usadas para probar los mecanismos mediadores de la adhesión de enteropatógenos (Bernet 1994). En estudios recientes se han utilizado para la selección que manejamos, y de esta forma valorar a las posibles bacterias ácido lácticas o bifidobacterias en base a su capacidad de adhesión (Coconnier *et al* 1992; Bernet *et al.* 1993; Greene & Klaenhammer 1994; Crociani *et al* 1995; Sarem *et al.* 1996; Tuomola & Salminen 1998).

De los estudios realizados con estas líneas celulares se infiere que la adherencia de las cepas de lactobacilos de la presente invención, en comparación con la bien caracterizada cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG, que es del orden del 9% sobre células Caco-2 y del orden del 5% sobre células HT-29 (Tuomola *et al.* 1998; Dunne *et al.* 2001; Botes *et al.* 2008) es muy superior (7,5% para *L.rhamnosus* CNCM I4036 y 15,5 % para *L.paracasei* CNCM I-4034 (figura

3). El estado de la técnica contempla que la adhesión de las bifidobacterias es pequeña en comparación con los lactobacilos, con independencia de la especie que se trate (Dunne et al, 2001). Sin embargo, las cepas de *Bifidobacterium bifidum* y *B.longum* utilizadas por la firma HERO España, que se han considerado como controles en la presente invención, se adhieren a células HT-29 con valores cercanos al 9%. Asimismo, la bifidobacteria objeto de la presente invención se adhiere a dichas células con un valor muy superior del 16,7% (figura 6).

Selección de las bacterias

Así, en la presente invención, la selección de las bacterias se llevó a cabo empleando medios de cultivo específicos (Ejemplo 4) tanto para bifidobacterias como para lactobacilos. Durante el aislamiento se utilizaron tres nuevos medios de cultivos descritos como específicos para bifidobacterias, estos son: BFM (Nebra y Blanch 1999), Columbia y Beerens modificado (Beerens 1991, ejemplos 4.1, 4.2 y 4.3), con los que se obtuvo mejores resultados en la obtención de colonias de bifidobacterias. Para la selección de lactobacilos, el medio de cultivo empleado fue medio Rogosa Agar (ejemplo 4.4).

En la presente invención, las colonias de bacterias de los diferentes niños que fueron incubadas y sometidas a las pruebas de selección fueron 4680 colonias. Tras el primer ensayo de resistencia de pH 3,0 y a sales biliares, con una viabilidad de 90%, quedaron 758, tras las pruebas de adhesión a las células epiteliales intestinales quedan sólo 90 colonias (Ejemplos 5, 6 y 7)

Estas colonias se separaron en lactobacilos y bifidobacterias según el medio de cultivo de procedencia. Se procedió directamente a su identificación molecular (Ejemplo 10) mediante amplificación del gen 16S rRNA de cada colonia, para su posterior secuenciación y búsqueda de homología en la base de datos del NCBI (BLAST).

Finalmente, fueron 29 cepas bacterianas aisladas del medio de Beerens, 13 del medio de Rogosa y 10 del medio Columbia modificado, las que lograron superar la selección. Dado el número de colonias seleccionadas, como hemos expuesto, se procedió directamente a su identificación molecular mediante amplificación del gen 16S rRNA de cada colonia, para su posterior secuenciación y búsqueda de homología en la base de datos del NCBI (BLAST).

Las cepas clasificadas como lactobacilos se secuenciaron y estas secuencias fueron alineadas entre ellas para saber si existían bacterias que presentaran el mismo gen rADN 16s, y se encontró que las 41 bacterias se pueden separar en 2 grupos:

Un grupo que presentaba una homología del 99% del gen rADN 16s de un fragmento de 1474 bp con:

*Lactobacillus rhamnosus* strain R-11

*Lactobacillus rhamnosus* strain La

*Lactobacillus rhamnosus*, strain: MNFLM01

*Lactobacillus rhamnosus* strain IDCC 3201

*Lactobacillus rhamnosus* strain: YIT 0105 (= ATCC 7469)

*Lactobacillus rhamnosus* strain Lcr35 16S

Con estos resultados, se seleccionó una bacteria con los mejores valores de las pruebas de resistencia del grupo (ejemplos 7 y 9) y se llamó *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A, (ulteriormente numerada por el Instituto Pasteur [CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes INSTITUT PASTEUR 25, Rue du Docteur Roux F-75724 Paris] como *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, donde fue depositada el 2 de Julio de 2008).

El otro grupo que presentaba una homología del 100% del gen rADN 16s de un fragmento de 1276 bp con:

*Lactobacillus paracasei*, strain: T11-9

*Lactobacillus paracasei*, strain: T7-10

*Lactobacillus casei* strain KLDS 1.0720

*Lactobacillus casei* strain L5

*Lactobacillus casei*, strain: YIT 0209 (= NCDO 151)

*Lactobacillus casei*, strain: YIT 0180 (= ATCC 334)

*Lactobacillus paracasei* strain IMPC 2.1  
*Lactobacillus paracasei*, strain: NRIC 1944  
*Lactobacillus paracasei*, strain: NRIC 1942  
*Lactobacillus paracasei*, strain: NRIC 1938  
*Lactobacillus paracasei*, strain: NRIC 1934  
*Lactobacillus paracasei*, strain: NRIC 0638  
*Lactobacillus casei* ATCC 334  
*Lactobacillus paracasei* strain DJ1  
*Lactobacillus casei* strain Ru2-2i  
*Lactobacillus paracasei* isolate 3C  
*Lactobacillus paracasei* isolate 2C  
*Lactobacillus paracasei*  
*Lactobacillus casei* strain MCRF-284  
*Lactobacillus* sp. L02  
*Lactobacillus paracasei*  
*Lactobacillus paracasei*, strain SM20  
*Lactobacillus casei* strain BL23  
*Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei*  
*Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei*  
*Lactobacillus casei*  
*Lactobacillus paracasei* subsp. *Tolerans*

5 Con estos resultados, se selecciono una bacteria con los mejores valores de las pruebas de resistencia (ejemplos 7 y 9) de este segundo grupo y se denominó inicialmente como *Lactobacillus paracasei* HERO 7, (ulteriormente numerada por el Instituto Pasteur [CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes INSTITUT PASTEUR 25, Rue du Docteur Roux F-75724 Paris] como *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, donde fue depositada el 2 de Julio de 2008).

Posteriormente, se efectuó lo mismo con el grupo de las bifidobacterias, encontrándose un solo grupo, que presentaba una homología del 100% del gen rADN 16s de un fragmento de 1136 bp con:

Uncultured bacterium clone rRNA235

*Bifidobacterium breve*, strain: ATCC 15700

10 Con estos resultados, se seleccionó una bacteria del grupo de bifidobacterias con los mejores resultados de resistencia (139,6% a pH 2,5) (ejemplos 7 y 9) y se denominó inicialmente *Bifidobacterium breve* HERO 15B, (posteriormente denominada por el Instituto Pasteur [CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes INSTITUT PASTEUR 25, Rue du Docteur Roux F-75724 Paris] *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, donde fue depositada el 2 de Julio de 2008).

Así, estas bacterias clasificadas como:

*Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A

*Lactobacillus paracasei* HERO 7

*Bifidobacterium breve* HERO 15B.

y fueron enviadas al Instituto Pasteur para su depósito, donde fueron reconocidas como únicas y se les asignó la siguiente denominación final:

Denominación Inicial:	Denominación final:
<i>Lactobacillus paracasei</i> HERO 7	CNCM I-4034
<i>Bifidobacterium breve</i> HERO 15B	CNCM I-4035
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HERO 22A	CNCM I-4036

## 5 Resultados de resistencia a pH, sales biliares y adhesión celular

Como se ha indicado anteriormente, para que las cepas probióticas ejerzan un efecto beneficioso en el intestino, deberían sobrevivir al paso a través del estómago, resistiendo su acidez (pH 2,5-3,5) (Holzapfel *et al.* 1998) y por otro lado, deben ser resistentes a las sales biliares presentes en el intestino delgado, para alcanzar el colon (Otlés *et al.* 2003).

10 En el presente estudio, se incubaron las bacterias a pH 3,0 durante 3 horas, aunque se ha descrito que 90 minutos debieran ser suficientes para reproducir el tiempo que transcurre entre la entrada y la salida del estómago (Jin *et al.* 1998). En este caso, las cepas aisladas y los controles presentaron una viabilidad cercana al 100%, (ejemplo 12/ figuras 1 y 4) pero la exposición a pH 2,5 mostró ser muy selectiva, ya que ningún control presentó viabilidad y sólo lo hizo la cepa *Lactobacillus rhamnosus* 22A (CNCM I-4036). Es decir la cepa de la invención *Lactobacillus*  
15 *rhamnosus* 22A es considerablemente más resistente al ácido que las bacterias controles por lo que su paso al tracto gastrointestinal y la subsiguiente colonización están facilitados. Por otra parte, la cepa *L.rhamnosus* 7A presenta una mayor viabilidad a pH 3,0 que las cepas utilizadas como controles (Ejemplo 12, figuras 1, 4), lo que presupone un mayor paso al intestino delgado.

20 La viabilidad de cultivos probióticos a pH 3,0 durante 2 horas y en medios que contengan 500-1000 mg (0,05-0,1%) de ácidos biliares por litro, son consideradas pruebas estándares de tolerancia al ácido y a sales biliares (Snelling 2005), aunque concentraciones de 0,3% de sales biliares sería adecuada para seleccionar probióticos. Nuestras pruebas de sales biliares efectuadas a diferentes concentraciones (0,3% y 0,7%), presentaron valores superiores al 100% en todos los casos para las bacterias y superiores a las bacterias comerciales utilizadas como controles (ejemplo 12, figuras 2 y 5). En conclusión las cepas de lactobacilos de la invención son más resistentes al pH y a las  
25 sales biliares que otras bacterias utilizadas como probióticos actualmente.

Se ha descrito que los lactobacilos en general presentan una mayor resistencia a las condiciones gastrointestinales, especialmente frente a la acidez y a sales biliares (Ross *et al* 2005). Los resultados encontrados concuerdan con esta descripción, ya que los valores de resistencia a las condiciones gastrointestinales son levemente mayores en lactobacilos que en bifidobacterias.

30 Como también se ha indicado anteriormente, otro aspecto que es muy importante para la entrada de los probióticos en la microbiota intestinal es la capacidad de adhesión sobre las células epiteliales intestinales, ya que evitan que las cepas probióticas sean eliminadas debido a los movimientos peristálticos y a otras bacterias que componen la microbiota intestinal. Además, la adhesión es el primer paso para la colonización y es probablemente un pre-requisito para la exclusión competitiva de enteropatógenos (Forestier *et al* 2001; Lee *et al* 2003) y para la  
35 inmunomodulación del huésped (Ouwehand *et al.* 1999; Plant y Conway 2002).

En la presente invención, las propiedades de adhesión de las diferentes cepas, se estudiaron utilizando las células HT-29 como un modelo *in vitro* de epitelio intestinal (ejemplo 12, figuras 3 y 6). El patrón de adhesión mostró ser específico para cada cepa, ya que siendo de la misma especie presentaron valores muy diferentes. Esto se puede comprender comparando la capacidad de adhesión de diferentes probióticos descritos, por ejemplo, el *Lactobacillus*  
40 *casei* (Fyos®) presenta una adhesión de un 14,4 %, mientras que *Lactobacillus casei* (Lactophilus®) posee un 2,6% de adhesión (Morata De Ambrosini *et al.*, 1999). Como se ha indicado anteriormente, la adherencia de las cepas de lactobacilos de la presente invención es muy superior (7,5% para *L.rhamnosus* CNCM I4036 y 15,5 % para *L.paracasei* CNCM I-4034) a la de otras bacterias como *Lactobacillus rhamnosus* GG, que es del orden del 5% sobre células HT-29 (Dunne *et al*, 2001) (Tabla 3). Así mismo, la bifidobacteria, *B. breve* CNCM I-4035, se adhiere a  
45 dichas células con un valor muy superior del 16,7% (figura 5) comparado con el 9% de las bacterias utilizadas como controles.

Estos datos confirman los resultados de la presente invención, que muestran la variabilidad existente en las diferentes cepas probióticas. En este caso concreto, los controles de lactobacilos presentan una adhesión (4%) que corresponde a la mitad de la que presentan los controles para bifidobacterias (8%), sin embargo, las cepas aisladas

en la presente invención presentan una adhesión mayor que sus controles, debido a que en el momento de alinear los 16s rARN de los diferentes grupos se seleccionó los que presentaban mejores valores para la adhesión epitelial.

- 5 Así, en el caso de los lactobacilos se seleccionaron las cepas que presentaban adhesión del orden 7,48 y 11,55% frente al 4,80 y 4,09% de sus controles (figura 3), y en el caso de las bifidobacterias se seleccionaron aquellas que presentaban adhesión del 16,7%, frente al 8,8 y 9,1% de sus controles (figura 6). Es decir, las bacterias que constituyen los diferentes objetos de la presente invención, presentan mayor capacidad de colonización y permanencia en el intestino y por lo tanto, darán lugar a un mayor efecto probiótico.

#### Resultados de caracterización de las bacterias aisladas

##### Estudio del 16s RNA

- 10 Diferentes técnicas moleculares han comenzado a estar disponibles para la identificación, composición y enumeración del total de la comunidad bacteriana del intestino, la mayoría se basan en el estudio del gen 16s ribosómico ARN (rARN), ya que durante la última década, el gen 16s rARN ha revolucionado la manera de como los taxonomistas han clasificado e identificado las bacterias. El gen 16s rARN comprende desde regiones altamente variables a altamente conservadas, y la diferencia de secuencias son usadas para determinar las relaciones filogenéticas y distinguir bacterias desde especies a cepas. Existen bases de datos disponibles con más de 200.000 genes 16s rARN, como por ejemplo NCBI/BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ribosomal database project-RPD (<http://rpd.cme.msu.edu/html>) y EMBL (<http://www.embl-heidelberg.de/>), estas bases de datos comparan las secuencias del gen 16s rARN existentes, con nuevas secuencias obtenidas. Tal y como muestra el ejemplo 2, las cepas aisladas en la presente invención presentaron una alta homología a *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium breve*, lo que es consistente con los antecedentes que dicen que en niño alimentados con leche materna presentan altos niveles de bifidobacterias en heces, entre 40-60% del total de la microbiota, donde el *Bifidobacterium breve* se encuentra en porcentaje importante (Harmsen *et al.* 2000). También, existe un alto porcentaje de lactobacilos, principalmente *L.casei*, *L.paracasei*, *L.acidophilus*, entre otros (Heiling *et al.* 2002, Satokari *et al.* 2002).

- 25 El porcentaje de homología del gen 16s rARN de las cepas aisladas fue muy alto (99-100%) de acuerdo a la base de datos NCBI/BLAST (ejemplo 2). Los fragmentos del gen 16s rARN son de aproximadamente 1,4 kb, y los fragmentos secuenciados varían entre 1474 bp para *Lactobacillus rhamnosus* 22A HERO (CNCM I-4036), 1274 bp para (CNCM I-4034)7 HERO y 1118 bp para *Bifidobacterium breve* 15B HERO (CNCM I-4035). Precisamente este último, presenta una homología de 100% con *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y un clon no cultivable de *Bifidobacterium*, por lo que sería de interés ampliar el fragmento secuenciado del gen 16s rARN, pero en este caso, no se pudo obtener un fragmento más amplio debido a que los oligonucleótidos 27F (SEQ. ID. NO 1) y 1492R (SEQ. ID. NO 2), que amplifican un fragmento de aproximadamente 1400 bp, no fueron capaces de amplificar el gen 16s rARN de la cepa *Bifidobacterium breve* 15B HERO (CNCM I-4035). Por ello, se utilizaron otros oligonucleótidos universales que amplifican fragmentos más pequeños, como son 39F (SEQ. ID. NO 3) y 1391R (SEQ. ID. NO 4).

- 35 Los fragmentos secuenciados del gen 16s rARN de las cepas de lactobacilos aislados muestran una homología de 99% con un grupo de *Lactobacillus rhamnosus* y la otra cepa, presenta una homología de 100% con una gran variedad de *Lactobacillus paracasei*, y con un pequeño número de *Lactobacillus casei*. Los fragmentos de 16s rARN de los controles, de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* 22A HERO (CNCM I-4036) y *Lactobacillus paracasei* 7 HERO (CNCM I-4034), y un fragmento de *L. paracasei* que presentaba una alta homología con la cepa aislada fueron alineadas. A partir de esto, se puede observar que existe una diferencia de 4 bases entre las cepas controles, *L.rhamnosus* 22A HERO (CNCM I-4036) y *L.paracasei* 7 HERO (CNCM I-4034). También, hay 4 bases de diferencia entre los controles LGG y *L.casei*. La cepa *Lactobacillus rhamnosus* 22A HERO (CNCM I-4036) presenta 1 base de diferencia con ambos controles, 1 base de diferencia con el control LGG y 3 bases con *L.casei*. En este caso, las diferencias entre las cepas alineadas son pocas, lo que indicaría que en estas cepas el gen 16s rARN se encuentra bastante conservado.

- 50 Para poder ampliar la información genómica de las cepas bacterianas estudiadas, se recurrió a amplificar el espacio intergénico que está presente entre el gen 16s y 23s, el cual es conocido por presentar una gran variabilidad de tamaño (Barry *et al.* 1991 & Navarro *et al.* 1992), la cual ha sido utilizada para diferenciar especies de procariontes (Barry *et al.* 1991). En las cepas aisladas los fragmentos del espacio intergénico varían de longitud entre *Lactobacillus rhamnosus* 22A HERO (CNCM I-4036) 579bp, *Lactobacillus paracasei* 7 HERO (CNCM I-4034) 512bp y *Bifidobacterium breve* 15B HERO (CNCM I-4035) 182bp. Los fragmentos intergénicos 16s-23s, se compararon con los que se encuentran en la base de datos del NCBI/BLAST, los resultados muestran una homología de 100% para la cepa *Lactobacillus rhamnosus* 22A HERO (CNCM I-4036) con *Lactobacillus rhamnosus* isolated TS1 y *Lactobacillus rhamnosus* PS1 16S. Si comparamos los resultados de homología mostrados para 16s rARN, los resultados son totalmente diferentes, por lo que posiblemente es una cepa que no está en la base de datos o que la base de datos NCBI/BLAST tiene mayor información del 16s rARN y no del espacio intergénico 16s-23s. Estos resultados indican que la bacteria aislada objeto de la invención es única, lo que ha sido confirmado por el Instituto Pasteur al darle una nomenclatura específica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036

En el caso de la cepa *Lactobacillus paracasei* 7 HERO (CNCM I-4034), los resultados del espacio intergénico 16s-23s entregan una homología de 100% para *Lactobacillus casei* ATCC 334. La base de datos NCBI/BLAST contiene su genoma completo y está en la lista de *L.casei* que entrega una homología de 100% para el 16s rARN, por lo que existe una alta probabilidad de que la cepa que aislamos sea *L.casei* ATCC 334, de todas maneras al secuenciar otros fragmentos de su genoma, como genes 23s, 5s u otros, podrían ratificar o descartar que corresponda exactamente a esta cepa. En este sentido tras los análisis pertinentes, el Instituto Pasteur ha reconocido la cepa como única.

Para el caso de la cepa de bifidobacteria, el fragmento es bastante pequeño, por lo que se amplificó el espacio intergénico de los controles, entregando 165bp para *Bifidobacterium longum* y 298bp para *Bifidobacterium bifidum*, lo cual ratifica la existencia de una gran variación en el tamaño del fragmento. Las cepas controles, la cepa aislada, *Bifidobacterium breve* 15B HERO (CNCM I-4035), y la cepa que entregó una homología de 99% (NCBI/BLAST) con nuestra cepa, fueron alineadas, observando una gran diferencia entre los controles y las cepas de *Bifidobacterium breve*, sin embargo, hay sólo una base de diferencia entre nuestra cepa y la que presenta una homología del 99% (*Bifidobacterium breve* 16S-23S internal transcribed spacer (ITS), strain Y8). Esta cepa es totalmente diferente a la cepa con 100% de homología para el 16s rARN, por lo que podría ser una cepa que no está ingresada en esta base de datos.

Todos estos resultados demuestran que las tres cepas aisladas en la presente invención son nuevas, no habiendo sido anteriormente descritas en el estado de la técnica”.

#### Identificación fenotípica

Según muestra el ejemplo 11, la presente invención empleó un kit de fermentación de carbohidratos (API 50CH) (figura 8) y un kit de actividad enzimática (API Zym) (figura 9) para el análisis de las capacidades bioquímicas de las especies aisladas. Estos constituyen un método rápido y teóricamente reproducible para la identificación fenotípica de cultivos bacterianos puros. Estos tests han sido utilizados para la caracterización e identificación de lactobacilos en leche (Medina *et al.* 2001), yogur y otros fermentados lácteos (Andrighetto *et al.* 1998), y quesos (Andrighetto *et al.* 1998, Bouton *et al.* 1998 y De Angelis *et al.* 2001). Aunque la fiabilidad de estos tests ha sido cuestionada, especialmente para API 50CH, ya que inicialmente fue desarrollado para identificar cepas de lactobacilos de uso clínico, y que, la base de datos del fabricante no está actualizada para algunas especies de lactobacilos, entregando resultados ambiguos para su identificación (Andrighetto *et al.* 1998 y Collins *et al.* 1993), sin embargo, la información que nos ofrece resulta valiosa para caracterizar fenotípicamente las cepas aisladas.

Tal como se observa en la figura 8, las cepas aisladas, así como los controles, presentan una baja actividad proteolítica como tripsina y  $\alpha$ -quimotripsina, aunque presentaron actividad de forma diferenciada a leucina, para valina presentan una actividad mínima en bifidobacterias, y muy alta en lactobacilos.

Las bifidobacterias, también presentan una alta actividad para  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasa y para  $\alpha$ -glucosidasa. La actividad  $\alpha$ -galactosidasa y  $\alpha$ -glucosidasa podría diferenciar a las bifidobacterias de otras bacterias ácido lácticas, como fue descrito por Desjardins *et al.* (1990).

Se observa que en las bifidobacterias y en la cepa aislada *Lactobacillus rhamnosus* 22A HERO (CNCM I-4036) existe una alta actividad de  $\alpha$ -galactosidasa. Esto es importante, ya que la hidrólisis de azúcares específicos como  $\alpha$ -D-galactosil-oligosacárido permite una selectiva proliferación de bifidobacterias en el tracto intestinal (Gopal *et al.* 2001; Gulewicz *et al.* 2002), debido a que las bifidobacterias pueden utilizar galacto-oligosacáridos. La evaluación de las características fenotípicas de las bifidobacterias ha permitido confirmar su clasificación previa realizada por medios genéticos y determinar que sus acciones enzimáticas permiten utilizar varios sustratos hidrocarbonados, preferentemente polímeros de glucosa con enlaces de tipo  $\alpha$  para la producción de ácido láctico.

Se ha descrito que pocas cepas de otros orígenes y géneros incluyendo los lactobacilos presentan capacidad  $\beta$ -glucuronidasa (Gopa *et al.* 2001; Hopkins *et al.* 1998). Así, la cepa de lactobacilos de la presente invención y la cepa de bifidobacterias, así como sus controles, no presentan niveles de actividad de  $\beta$ -glucuronidasa, lo que se interpreta como una característica favorable. La no presencia de actividad  $\beta$ -glucuronidasa es una característica que deben presentar todos los probióticos considerados como buenos, ya que esta enzima es producida por las enzimas fecales (nitrorreductasa, azorreductasa) de origen microbiano, que producen que los pro-carcinógenos se conviertan en carcinógenos (Kurman 1988). Nanno *et al.* (1986) demostró que extractos de bacteria  $\beta$ -glucuronidasa positivo, aumentan la activación mutagénica de metabolitos biliares de benzopireno, mientras extractos de  $\beta$ -glucuronidasa negativo no presentan esta actividad. En resumen, podemos decir que estas bacterias al presentar baja actividad a otras fuentes de carbono como son manosa, fucosa y glucurónidos, prefieren la lactosa y glucosa como fuentes de carbono para su metabolismo, aunque la cepa aislada *Lactobacillus rhamnosus* 22A HERO (CNCM I-4036), presenta una actividad enzimática para  $\alpha$ -fucosa, lo que implica un efecto favorable sobre la fermentación de derivados de fucosil-lactosa como los presentes en leche materna y cuyo efecto favorecedor del crecimiento de bifidobacterias es conocido. Esta propiedad hace que los probióticos de la presente invención tengan aplicación muy particular en alimentación infantil, aunque también pueden ser aplicados en alimentación adulta y especial.

Otro aspecto que merece la atención es el resultado de API 50CH (figura 9B), donde la cepa *Lactobacillus paracasei* 7 HERO (CNCM I-4034) fermenta inulina, capacidad que no presentan sus controles. La capacidad de fermentar la inulina no es una propiedad común entre lactobacilos (Cebeci y Gurakan 2003; Makras *et al.* 2005). Esto indica que la cepa tiene capacidad de fermentar los oligofruetosacáridos (FOS), ampliamente utilizados como prebióticos, en alimentación infantil, promoviendo el desarrollo de una microbiota intestinal en la que predominan los lactobacilos y las bifidobacterias. Esta característica de las bacterias de la invención, refuerza el hecho de que los probióticos de la presente invención tengan aplicación muy particular en alimentación infantil, aunque también pueden ser aplicados en alimentación adulta y especial. Para la inulina y los FOS se ha demostrado su capacidad de aumentar el número de bifidobacterias en el colon (Roberfroid *et al.* 1998; Van Loo *et al.* 1999).

10 Actividad probiótica

Una vez superados los requerimientos anteriores, de resistencia a pH, resistencia a sales biliares, adherencia a células epiteliales intestinales y la secuenciación de su 16S, ya nos encontramos con el microorganismo probiótico aislado y definido. El siguiente paso consiste en caracterizar sus actividades probióticas, en concreto, sería necesario caracterizar las propiedades probióticas de *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A (CNCM I-4036) y/o *Lactobacillus paracasei* HERO 7 (CNCM I-4034) y/o *Bifidobacterium breve* HERO 15B (CNCM I-4035).

20 Teniendo en cuenta el cumplimiento de los requisitos de un probiótico relativos a resistencia a pH, sales biliares y adherencia por parte de las bacterias de la invención, dichas bacterias encontrarán aplicación en las distintas áreas en las que es conocido del Estado de la Técnica el empleo de probióticos, entre otros en el tratamiento y prevención de distintas patologías como la malabsorción de lactosa, la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol, diferentes tipos de diarreas, enfermedades inflamatorias intestinales, cáncer, trastornos generados por bacterias patógenas, etc. Así, dichos probióticos serán de aplicación en diferentes campos, como en la acción sobre los principales patógenos digestivos y en la estimulación del sistema inmune entre otros.

Bacterias patógenas

25 Dentro de los diferentes tipos de estudios realizados a los probióticos, es de especial interés los que involucran bacterias patógenas del sistema gastrointestinal. Al momento de elegir una bacteria patógena, hay que tener en cuenta su mecanismo de patogenicidad el cual varía entre una y otra. Una bacteria de interés es la *Escherichia coli* enterotoxigénica, debido a la producción de su enterotoxina es causante importante de diarrea en humanos. Estudios recientes, han descrito que ciertas bacterias ácido lácticas tienen un efecto antagonista frente a *Escherichia coli* enterotoxigénica (Gopal *et al.* 2001; Todoriki *et al.* 2001; Chu *et al.* 2005; Tsai *et al.* 2007) y frente a otras bacterias patógenas como *Salmonella typhimorium* y *Shigella flexneri* (Tien *et al.* 2006; Jankowska *et al.* 2008).

30 Otro aspecto de interés de las cepas probióticas, es la posible producción de sustancias llamadas bacteriocinas, estas son secretadas por algunas bacterias para poder competir con otros microorganismos que están creciendo en el mismo nicho. Estas sustancias pueden inhibir el crecimiento o adhesión de bacterias patógenas sobre las células epiteliales intestinales, las cuales pueden ser producidas por algunas bacterias ácido lácticas (Klaenhamer 1993; Jack *et al.* 1995; Sablon *et al.* 2000).

Un aspecto importante es conocer la interacción de las bacterias, ya sean probióticas o patógenas, con las células epiteliales intestinales, ya que con éstas interactúan en forma directa todas las bacterias presentes en la microbiota humana.

40 Se ha descrito que la presencia de bacterias patógenas en las células epiteliales intestinales estimula un perfil de respuesta pro-inflamatoria (Th1), liberando citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-8, activando el NF- $\kappa$ B, (Tien *et al.* 2006; O'Hara *et al.* 2006) y aumentando su expresión. Esta respuesta en la mayoría de los casos se ve parcialmente disminuida en presencia de una bacteria probiótica, lo cual indicaría un efecto beneficioso (Servin 2004).

45 Así, algunos probióticos podrían modular las propiedades de las DC, incluyendo su capacidad de activar una respuesta inmune específica (Kelsall *et al.* 2002). Un equilibrio entre estimulación y tolerancia después del contacto con bacterias probióticas en el intestino podría ser importante para mantener su homeostasis y poder llevar a cabo sus funciones beneficiosas de protección frente a bacterias patógenas en el sistema digestivo del huésped.

50 Las cepas probióticas de la presente invención demuestran tener un efecto inhibitor del crecimiento de los microorganismos patógenos intestinales, tales como bacterias patógenas, entre otros, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Escherichia coli* enteropatogena, *Salmonella enterica*, así como virus entéricos, tales como, *Rotavirus*.

Malabsorción de lactosa

55 Los mamíferos nacen con suficiente actividad lactasa como para usar la lactosa procedente de la leche de sus madres. Tras el destete esta actividad se va viendo reducida con la edad, y la ingestión de alimento que la contenga da lugar a signos y síntomas relacionados con la intolerancia a lactosa (incremento anormal de gas, dolor abdominal, diarrea, etc.). Es conocido que el empleo de probióticos que liberan lactasa favorece la digestión de la lactosa en el lumen del intestino, combatiendo los síntomas de intolerancia a lactosa.

Reducción de los niveles de colesterol

5 El alto nivel de lípidos en sangre, tales como el colesterol y triglicéridos implican un elevado riesgo para la salud humana, debido a su asociación con las cardiopatías. Puesto que el consumo de alimentos con bajo contenido graso o con microorganismos que participan en el metabolismo de lípidos, es muy beneficioso para evitar estas afecciones, se han caracterizado cepas de lactobacilos reguladores de los lípidos séricos. Este efecto probiótico está estrechamente relacionado con la hidrólisis de sales biliares.

Así, se ha observado en diferentes estudios en animales (Akalin *et al.* 1997; Fukushina y Nakano 1996) y en humanos (Lin *et al.* 1989), que la administración de probióticos puede disminuir la concentración sérica de colesterol.

Diarrea

10 Es un hecho que la aplicación clínica mejor documentada de un probiótico, es la del tratamiento de la diarrea aguda. Ensayos clínicos han mostrado eficacia del uso de probióticos en el tratamiento para la prevención y/o tratamiento de varios desórdenes intestinales incluidos la diarrea inducida por antibióticos (Mc Farland *et al.* 1995), diarrea en adultos (Höcter *et al.* 1990), niños (Cetina-Sauri y Sierra 1994) y diarrea del viajero (Kollaritsch *et al.* 1993).

15 En estos casos, el probiótico empleado como agente bioterapéutico afecta la expresión y la actividad de un gran número de enzimas y proteínas, ejerciendo regulación sobre el epitelio intestinal y posiblemente sobre la microbiota.

20 En relación a la diarrea asociada a antibióticos el hecho de tomar probióticos cuando se ha prescrito el antibiótico, puede reducir la aparición y/o acortar la duración de la diarrea. Los microorganismos más usados son: *Enterococcus faecium* SF6 (Wunderlich *et al.* 1989), *Lactobacillus GG* (Siitonen *et al.* 1990; Vanderhoof *et al.* 1999), *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, y *Saccharomyces Boulardii*. Estos agentes contribuyen a reducir la alteración de la microbiota en el intestino, el cambio en la consistencia de las deposiciones y la frecuencia de estas.

25 La diarrea causada por *Clostridium difficile*, el cual es un patógeno oportunista que aprovecha la alteración de la microbiota intestinal provocada por la toma de antibióticos, presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde la diarrea leve de curso benigno, hasta una colitis intensa con desarrollo de megacolon tóxico, complicaciones intraabdominales y sistémicas que pueden llevar a la muerte del paciente. Las diarreas suelen aparecer al par de semanas del inicio de la antibiótico-terapia. La secuencia patogénica se inicia con una alteración de la microbiota bacteriana intestinal, inducida por los antibióticos, lo que permite la colonización por *C. difficile*, si la persona está expuesta a la ingestión de este agente. Posteriormente, la bacteria libera toxinas que producen el daño tisular. Las cepas patógenas de *C. difficile* son productoras de toxinas, denominadas A y B. *S. Boulardii* inhibe las toxinas A y B por liberación de una proteasa de 54 kDa que corta estas toxinas y sus receptores de membrana (Castagliuolo *et al.* 1999).

30 Para restablecer la microbiota normal de los pacientes se ha comprobado que ha sido eficiente la administración oral de *Lactobacillus rhamnosus GG* y *Saccharomyces boulardii*.

35 En cuanto a la diarrea del viajero, ésta se debe a una infección por una bacteria, virus o parásito. Los microorganismos causantes son muchos y probablemente son diferentes de un país a otro. Entre ellos y por frecuencia son: *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Rotavirus* y *Giardia lamblia*. La diarrea de viajero afecta a la mitad de los viajeros que realizan visitas a zonas de alto riesgo. Las bacterias usadas en distintos estudios como prebióticos han sido: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococci* y *enterococci*. *Lactobacillus GG* ha sido el probiótico que más acertado se ha encontrado frente a la diarrea de viajero.

Enfermedades inflamatorias intestinales

40 Uno de los principales usos de los probióticos es el que involucra un desequilibrio en la microbiota y el sistema inmune. De acuerdo a este interés, el estudio de las enfermedades inflamatorias intestinales es uno de los focos de más interés para el posible uso de los probióticos como terapias clínicas. Los estudios realizados en esta área nos han entregado importante información sobre el uso clínico de los probióticos y la expresión génica de diferentes intermediarios involucrados en estas enfermedades.

45 Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), son desórdenes inflamatorios crónicos del intestino de origen desconocido (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), la patogénesis es compleja e involucra a lo menos 3 elementos importantes: factores de susceptibilidad genética, microflora entérica y daño mediado por inmunidad. Se ha hipotetizado que las EII se producirían debido a una respuesta anormal de las células T frente a la microbiota, también se ha especulado que la presencia de organismos patógenos podrían causar estas enfermedades.

50 Existe una reducción de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en biopsias de colon de pacientes con EII (Fabia *et al.* 1993; Favier *et al.* 1997). Los tratamientos convencionales para tratar las EII están enfocados a suprimir o modular la inmunidad del huésped, dentro de estos, el uso de antibióticos es un efectivo tratamiento para la enfermedad de Crohn. Lo cual, nos indicaría que el uso de probióticos para modificar la microflora puede ser importante en el tratamiento de EII.

Dentro de los antecedentes, existe un reciente estudio donde se ha encontrado que los pacientes con enfermedad de Crohn tienen cantidades disminuidas de  $\beta$ -galactosidasas en heces durante los periodos activos de la enfermedad. Esta disminución se correlaciona con la disminución de *Bifidobacterias*, las cuales son la fuente de  $\beta$ -galactosidasa (Favier *et al.* 1997).

5 Cáncer

El cáncer colorectal es una de las más serias complicaciones de EII, incluidas la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Eaden *et al.* 2001). El mecanismo preciso por el cual EII puede generar un proceso de carcinogénico es muy poco entendido. Se asume que podría ser causa de un proceso inflamatorio crónico (Weitzman & Gordon 1990), el cual en algunos modelos experimentales puede funcionar como promotor de un tumor.

10 La microbiota intestinal junto con el sistema inmune juega un papel importante en la regulación de la carcinogénesis. En ambos pueden influir los probióticos, de ahí que se hayan dirigido esfuerzos hacia este campo de actuación contra el cáncer de colon. Se ha comprobado que los probióticos pueden disminuir las concentraciones de enzimas, mutagénicos, sales biliares secundarias que posiblemente estén involucradas en el proceso carcinogénico del colon (Wollowski *et al.* 2001). Los datos epidemiológicos apoyan que el consumo diario de productos fermentados tiene un efecto protector contra los adenomas de colon o cáncer (Raftery & Glinghammar 1995).

15 Se han utilizado una combinación simbiótica para el estudio de la prevención de cáncer, esta es una mezcla de un probiótico más un prebiótico. Esta combinación aumentó los niveles de ácidos grasos de cadena corta, que son los principales productos de la fermentación bacteriana, siendo su principal rol ser fuente de nutriente para el epitelio intestinal. Están asociados con una inducción de diferenciación, supresión de proliferación y aumento de apoptosis *in vitro*. (Heerdt y col. 1997; Medina *et al.* 1997) pudiendo jugar un rol en la prevención de algunas enfermedades como desordenes gastrointestinales y cáncer (Julia *et al.* 2006).

20 La presente invención no sólo demuestra la capacidad de las cepas seleccionadas para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y virus entéricos intestinales, sino también demuestra una superioridad en las características que definen las propiedades probióticas de los microorganismos, tales como, resistencia a pH, sales biliares y adherencia al intestino, en comparación con bacterias probióticas control conocidas del estado de la técnica.

25 Los resultados han mostrado en todos los casos las mejores propiedades probióticas de las bacterias de la invención frente a dichas bacterias control. Así, es conocido que las bacterias que han sido empleadas como controles centran su actividad en los siguientes campos:

*L. casei inmunitas de Danone*

30 Los efectos beneficiosos asociados a composiciones probióticas que contienen *L. casei inmunitas* (Actimel®) son los de mejorar la respuesta inmune frente a distintos agentes infecciosos, aumentando el nivel de citoquinas activadoras del sistema inmune, mejorando la respuesta proliferativa de las células T y modulando la expresión de las células NK. Se ha observado que la toma de Actimel® mejora el pronóstico de las diarreas infantiles asociadas a infecciones reduciendo la severidad y duración de la misma.

35 Las composiciones que contienen *L. casei inmunitas* a su vez, tienen efectos positivos antiinflamatorios sobre la mucosa del colon humano debido a que incrementan la respuesta inmunitaria del hospedador lo cual resulta beneficioso para individuos con enfermedades inflamatorias intestinales y para prevención de cáncer de colon.

40 A la vista de lo anterior, y de los distintos experimentos comparativos llevados a cabo que han mostrado las mejores propiedades probióticas de *Lactobacillus paracasei* HERO 7 (CNCM I-4034) frente a *L. casei inmunitas*, *Lactobacillus paracasei* HERO 7 (CNCM I-4034) encuentra excelente aplicación, entre otros, en la prevención de distintas patologías como la malabsorción de lactosa, reducción de los niveles plasmáticos de colesterol, diferentes tipos de diarreas, enfermedades inflamatorias intestinales, cáncer, etc. en la mejora de la respuesta inmune frente a distintos agentes infecciosos, en la mejora de diarreas infantiles, como antiinflamatorio de la mucosa del colon humano (y como consecuencia en la prevención de cáncer de colon).

45 LGG

50 *Lactobacillus GG* se adhiere a las células intestinales, estimulando la respuesta inmune y previniendo de la diarrea patogénica. Distintos estudios han demostrado que el consumo de composiciones que contiene LGG, como Bioactif de Kaiku®, inhibe la colonización competitiva del intestino por microorganismos patógenos. Estos microorganismos a su vez, producen compuestos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de cepas patógenas, con la consecuente inhibición del crecimiento de cepas patógenas. De esta forma, el consumo de composiciones con LGG mantienen o restauran el equilibrio de la microflora intestinal optimizando los procesos absortivos de la función de la mucosa intestinal.

55 A la vista de lo anterior, y de los distintos experimentos comparativos llevados a cabo que han mostrado las mejores propiedades probióticas de *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A (CNCM I-4036) frente a *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A (CNCM I-4036) encuentra excelente aplicación, entre otros, estimulando la

respuesta inmune y previniendo de la diarrea patogénica y manteniendo o restaurando el equilibrio de la microflora intestinal.

*Bifidobacterium Longum* y *Bifidobacterium bifidum*

5 Del estado de la Técnica es conocido que *Bifidobacterium Longum* son resistentes a los antibióticos, por lo que su consumo en periodos en los que los individuos están en tratamiento con antibióticos previene la diarrea ocasionalmente generada en pacientes. Otras aplicaciones de estos microorganismos están dirigidas a reducir el colesterol, alivian los síntomas de intolerancia a la lactosa, estimulan el sistema inmune y previenen el cáncer.

10 El consumo de composiciones con *B. bifidum* alivian los síntomas asociados a la diarrea. A su vez, son microorganismos que aumentan la respuesta inmunológica del individuo incrementando la actividad fagocítica en la sangre periférica.

15 A la vista de lo anterior, y de los distintos experimentos comparativos llevados a cabo que han mostrado las mejores propiedades probióticas de *Bifidobacterium Breve* HERO 15B (CNCM I-4035) frente a *Bifidobacterium Longum* y *B. bifidum*, *Bifidobacterium Breve* HERO 15B (CNCM I-4035) encuentra excelente aplicación, entre otros, estimulando la respuesta inmune y previniendo de la diarrea por antibióticos, en la reducción del colesterol, mejorando los síntomas de intolerancia a la lactosa, en la prevención del cáncer, etc.

Probióticos en alimentos, bebidas, fármacos, etc.

20 La incorporación de microorganismos viables en los alimentos se lleva a cabo desde muy antiguo. El yogur y otras leches fermentadas son los alimentos que tradicionalmente han incorporado microorganismos vivos. El desarrollo de los alimentos funcionales en los últimos años ha propiciado que se hayan desarrollado nuevas aplicaciones basadas en el uso de microorganismos capaces de producir efectos beneficiosos para el organismo.

25 El área de la alimentación infantil no ha sido una excepción dentro del campo de los alimentos funcionales y los últimos años han visto la incorporación de este tipo de ingredientes a los diferentes tipos de alimentos infantiles. Los probióticos han sido una de las líneas principales de desarrollo, con una aplicación mayoritaria en el campo de las leches de fórmula, principalmente, de continuación y crecimiento. El objetivo que se persigue con la incorporación de probióticos a los alimentos es su implantación en el colon del huésped y la consecución de una serie de efectos beneficiosos (reducción de flora patógena, producción de vitaminas y otras sustancias nutricionales, reducción del pH del medio, etc.).

30 Las bacterias probióticas que constituyen la presente invención, son todas ellas reconocidas como especies encuadradas dentro del grupo de bacterias lácticas, reconocidas desde hace mucho tiempo e internacionalmente por su nulo poder patogénico. Por ello, son susceptibles de ser empleadas para la fermentación de productos lácteos, entre otros, de forma aislada o en conjunto con otras bacterias lácticas, por ejemplo *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus lactis*, etc. Asimismo, su empleo en leches infantiles, como cualquier otra bacteria láctica, no supone ningún problema potencial de seguridad alimentaria

35 La incorporación de estos probióticos en alimentos y bebidas debe asegurar mediante el empleo de un proceso de mezcla adecuado (o de fermentación en su caso) un determinado número de bacterias vivas en el producto final después del periodo de vida máxima del producto.

40 Los probióticos de la presente invención tienen aplicación tanto en alimentación infantil como adulta y especial. Dichos probióticos pueden ser utilizados en forma de polvo solos o mezclados con otros excipientes conocidos del estado de la técnica como azúcares, proteínas, leche en polvo, etc., o bien, como ingredientes activos en la fermentación de productos preferentemente de base láctea. Así, dichos probióticos pueden ser incorporados en polvo o en forma líquida en alimentos empleados por la población general. En particular, leches y productos lácteos derivados, especialmente leches fermentadas y quesos; cereales y derivados, incluidas masas panarias; sopas y otros productos similares en forma deshidratada; productos cárnicos fermentados; derivados de frutas, zumos y bebidas refrescantes; alimentos para usos nutricionales específicos, incluyendo leches infantiles, cereales infantiles, alimentos infantiles listos para comer, etc. También pueden encontrarse en complementos alimenticios y fórmulas especiales para nutrición oral y enteral para uso clínico.

45 Si se trata de un producto final en polvo (leche infantil, cereales...), la incorporación se haría por mezclado en seco sobre el producto final. Así, los probióticos de la presente invención pueden ser incorporados en alimentos en polvo destinados a ser reconstituidos con agua u otro líquido como leche (leches infantiles en polvo, cereales...).

50 En su empleo para fermentar leche o productos lácteos y preparar leches acidificadas, los probióticos son añadidos a la base líquida de leche durante una etapa intermedia del proceso y produciéndose una fermentación a temperatura y tiempo controlados para obtener una leche acidificada.

Los probióticos de la invención también son de aplicación en complementos alimenticios e incluso productos farmacéuticos, que podrían presentarse en forma de preparados en polvo, comprimidos, grageas, etc. Estos

productos encuentran su campo de actuación en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales, úlcera gástrica, diarrea aguda y otras enfermedades del tracto gastrointestinal.

#### EJEMPLOS

##### Ejemplo 1. Amplificación de fragmentos intergénicos 16s-23s.

- 5 Se amplificaron los segmentos intergénicos de las cepas seleccionadas, se secuenciaron y se efectuó la búsqueda de homología en la base de datos del NCBI (BLAST), lo cual entregó los siguientes resultados:
- *Lactobacillus rhamnosus* 22A (CNCM I-4036) presenta una homología del 100%, de un fragmento de 579 bp con:
    - *Lactobacillus rhamnosus* isolate TS1
    - *Lactobacillus rhamnosus* isolate PS1 16S
  - *Lactobacillus paracasei* 7 (CNCM I-4034) presenta una homología del 100%, de un fragmento de 512 bp con:
    - *Lactobacillus casei* ATCC 334
- 10 • *Bifidobacterium breve* 15B (CNCM I-4035), presenta una homología del 99% del espacio intergénico 16s-23s, de un fragmento de 182 bp con:
- *Bifidobacterium breve* (ITS), strain Y8
  - *Bifidobacterium longum* (ITS), strain Y10

##### Ejemplo 2. Alineamiento de secciones secuenciadas.

Se utilizó la herramienta on-line del programa Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), para alinear las secciones secuenciadas de las cepas seleccionadas y los controles.

- 15 El alineamiento global de las secuencias del gen rDNA 16S de las cepas con los controles mostró la existencia de diferencias entre las secuencias de los controles y las muestras *L. rhamnosus* 22A y *L. paracasei* 7, y se observa una homología completa entre la muestra 7 y una secuencia de *L. paracasei* seleccionada.

En relación a la muestra *B. breve* 15B seleccionada, se observa una diferencia entre las secuencias de los controles y la muestra *B. breve* 15B, y una homología del 100% entre *B. breve* 15B y una secuencia de *B. breve* seleccionada.

- 20 El alineamiento global de las secuencias del espacio intergénico 16S-23S de la cepa 15B y controles permitió observar una gran diferencia entre la secuencia de los controles y la muestra *B. breve* 15B.

El hecho de que la secuenciación del espacio intergénico 16S-23S sea única y no coincida con ninguno descrito anteriormente para una bifidobacteria indica que la cepa de la invención es única, aspecto reconocido por el Instituto Pasteur al darle una denominación también única.

##### Ejemplo 3. Toma y procesamiento de las muestras

- 25 Toma de muestras.

- 30 En la consulta del pediatra JM, inventor de esta patente y en condiciones de anaerobiosis, se tomaron heces de niño de entre 2 y 4 meses de vida, alimentados exclusivamente a pecho. Se pidió a los padres que llevaran a sus hijos, a primera hora de la mañana, a la consulta, se esperó a que los niños evacuaran tras estimulación y al hacerlo las heces se recogieron en un recipiente estéril mediante una cucharilla de plástico que tiene adherida en su tapa. Una vez terminada la recolección, el recipiente con la muestra se introdujo en una jarra anaeróbica (Anaerojan®, Oxoid, Hampshire, Reino Unido) acompañada de un sobre generador de atmósfera anaeróbica (Anaerogen®, Oxoid, Hampshire, Reino Unido) y se procedió al cierre hermético de la jarra y a su transporte al laboratorio donde las muestras fueron procesadas en un tiempo no superior a 2 horas.

##### Procesamiento y siembra de las muestras.

- 35 Las muestras a analizar se pueden manipular una vez recogidas o previa congelación a -80°C en tubos Eppendorf correctamente identificados.

Así, se prepara una suspensión de heces al 10% en PBS (Fosfato Salino amortiguador (PBS, Sigma-Aldrich, Madrid, España)) e hidrocloreuro de L-cisteína (Scharlau CEIME, Barcelona, España) (0,05%). Se realizan 7 diluciones de esta preparación, desde  $10^1$  a  $10^7$ , finalmente se siembran 50  $\mu$ l de cada dilución en los dos medios de cultivo

seleccionados, y se incuban en anaerobiosis, para cultivo de bifidobacterias (Anaerogen®) y medio rico en CO<sub>2</sub> para lactobacilos (CO<sub>2</sub>Gen) durante 72 horas a 37°C.

Ejemplo 4. Preparación de medios de cultivo.

5 A continuación se indican 3 medios de cultivo específicos para bifidobacterias y un medio de cultivo específico para lactobacilos:

1. Medio de Beerens (*Beerens 1990*): este medio es utilizado para determinar bifidobacterias.

10 Para su preparación, en un matraz Erlenmeyer de un litro se mezclan 47 g de *Brain Herat* Infusión Agar, 5g de D-(+) Glucosa, 0,5 g de citrato de Hierro III, 0,5 g de L-cisteína y un litro de agua destilada. Esta mezcla se calienta con agitación constante, sobre una placa agitadora con calor, hasta que hierva durante un par de minutos, luego se deja enfriar a temperatura ambiente. Una vez que alcanza los 55°C se le agrega 5ml de ácido propiónico y 2,2 ml de hidróxido de sodio 2Eq/L, luego, se ajusta el pH a 5,0.

2. Medio BFM (*Nebra & Blanch 1999*): este medio es específico para bifidobacterias. Dicho medio presenta los siguientes componentes, en las proporciones indicadas, por litro de disolución:

	•	Extracto de Carne	2 g
15	•	Extracto de Levadura	7 g
	•	Almidón	2 g
	•	Hidrocloreuro de L-cisteína	0,5 g
	•	Cloruro de Sodio	5 g
	•	Peptona	5 g
20	•	Tryptona	2 g
	•	Lactulosa	5 g
	•	Riboflavina*	1 mg
	•	Tiamina*	1 mg
	•	Azul de metileno	16 mg
25	•	Cloruro de litio	2 g
	•	Ácido propiónico	5 ml
	•	Agar	15 g

30 Para preparar 500 ml de este medio selectivo para bifidobacterias se emplean las cantidades correspondientes. Esta mezcla se calienta con agitación constante, sobre una placa agitadora con calor, hasta que hierva durante un par de minutos, luego la solución se autoclava. Finalmente, las vitaminas (\*) se preparan en soluciones concentradas (solución madre 1mg/ml), luego, se filtran y se adicionan, junto al ácido propiónico, al medio de cultivo cuando la solución alcanza aproximadamente 55°C.

3. Medio Columbia Modificado (pH 5,0): este medio es específico para bifidobacterias. Dicho medio presenta los siguientes componentes, en las proporciones indicadas, por litro de disolución:

- 35
- Medio Columbia Agar (Oxoid, Hampshire, Reino Unido).
  - Glucosa (5g/L).
  - Cisteína (0,5g/L).
  - Agar (hasta 15g/L).

40 Para preparar 1000ml de este medio selectivo para bifidobacterias se emplean las cantidades anteriormente indicadas. La mezcla se calienta con agitación constante, sobre una placa agitadora con calor, y hasta que hierva durante un par de minutos, luego la solución se autoclava. Finalmente, se adicionan el ácido propiónico al medio de cultivo cuando la solución alcanza aproximadamente 55°C y se ajusta el pH a 5,0 con una solución de NaOH 1N.

4. Medio Rogosa Agar: este medio se utiliza para determinar lactobacilos. Para su preparación se siguen las especificaciones suministradas por la casa comercial.

Se prepara siguiendo las especificaciones suministradas por la casa comercial.

Ejemplo 5. Siembra de las muestras

5 Una vez realizadas las diluciones, se siembran por triplicado cada una de ellas, por medio de un asa de siembra. Posteriormente, todas las placas con los diferentes medios de cultivo se incuban en una estufa con temperatura controlada a 37°C.

10 Las placas con los medios de cultivo para bifidobacterias son previamente introducidos en jarras de anaerobiosis a las que se les incorpora un sobre de Anaerogen® (Sistema generador de atmósfera anaeróbica) y en aquellas que contengan las placas de cultivo para lactobacilos un sobre de CO2Gen® (Sistema generador de atmósfera CO<sub>2</sub>), finalmente, se incuban durante 72 h a 37°C.

Ejemplo 6. Determinación del número de unidades formadoras de colonias.

15 Posterior a la incubación, se seleccionan las diluciones que presenten un crecimiento mayor a 10 unidades formadoras de colonia (UFC) y se procede a realizar el recuento de las UFC en cada uno de los medios, a través de un lápiz contador de colonias electrónico (Colony counter modelo 608702, Bio Co, Kobe, Japón). Por último, se calcula el número total de UFC mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFC} = \text{N}^\circ \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución} \times \text{dilución}$$

Una vez realizados los cultivos, las muestras restantes de las heces se almacenaron a -80°C hasta la realización de los estudios de Biología Molecular.

20 Ejemplo 7. Determinación de resistencia a pH y sales biliares.

Después de 72 horas de incubación, se seleccionan 100 colonias de cada uno de los medios de cultivo, por niño, teniendo en cuenta la morfología observada a simple vista. Dichas colonias tanto lactobacilos como bifidobacterias, se incuban en medio Man Rogosa Shape (MRS) líquido y en condiciones anaeróbicas durante 48 horas. Posteriormente, se realiza de forma inmediata un stock de glicerol de cada una de ellas (MRS+ Glicerol 10%).

25 Al mismo tiempo que se realizan los stocks de glicerol de las distintas colonias, se analiza su viabilidad tanto a pH 3,0 como a concentración de sales biliares (3%) (Oxgall, Sigma-Aldrich, España). Para ello se opera de la siguiente manera:

1. Las colonias se centrifugan a 5000 rpm durante 5 minutos.
2. Eliminar el sobrenadante y se resuspende en PBS estéril.
- 30 3. Volver a centrifugar en las mismas condiciones anteriores.
4. Los pasos del 1 al 3 se repiten tres veces.
5. Resuspender, por último, en 1 ml de PBS estéril.
6. Inocular 100 ml de la suspensión anterior en 900 ml tanto de PBS a pH 7,0 como a pH 3,0 y Oxgall 0,3% disuelto en PBS.
- 35 7. Incubar en condiciones anaeróbicas durante 3 horas a 37°C.
8. Se realizan diversas diluciones (10<sup>1</sup> a la 10<sup>5</sup>) de cada una de las condiciones en las que se han realizado las incubaciones.
9. Sembrar 50µl de cada dilución.
10. Incubar 72 horas a 37°C en anaerobiosis.
- 40 11. Determinar mediante contaje, el número de colonias presentes tanto en el control como a pH y Oxgall.
12. Determinar la viabilidad de cada colonia mediante el cociente:

**Nº colonias a pH/Oxgall**

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{Nº colonias a pH/Oxgall}}{\text{Nº colonias control}} \times 100$$

**Nº colonias control**

Todas aquellas colonias que muestran una viabilidad tanto a pH 3,0 como a Oxgall 0,3% mayor al 90% se consideran como positivas, las cuales se guardan para realizar el resto de las pruebas. Las demás colonias se eliminan.

Ejemplo 8. Bacterias controles:

5 Las colonias utilizadas con controles positivos, fueron las siguientes:

Para Bifidobacterias: *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum*, suministrado por Hero España S.A.

Para Lactobacilos: Se utilizaron 2 lactobacilos comerciales: *Lactobacillus casei* (Danone®) y *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) (KAIKU®).

10 Una vez concluido el screening inicial, con las colonias seleccionadas se ejecuta un segundo screening. En este caso, se verifica la viabilidad a pH 2,5 y 2,0 y a Oxgall 0,5% y 0,7%. El protocolo a seguir es idéntico al utilizado en el primer ensayo. Una vez determinada la viabilidad, se determinan intervalos de viabilidad. En este segundo screening, los controles de bacterias comerciales presentaron valores menores a cero, por lo que se procedió a determinar como intervalo inicialmente óptimo para la selección de colonias positivas aquel que tuviera porcentajes de viabilidad mayor a 4%. Dividiendo las colonias en 3 grupos:

15 Grupo 1. Colonias con viabilidad mayor al 66%.

Grupo 2. Colonias con viabilidad entre el 33 y el 66%.

Grupo 3. Colonias con viabilidad mayor del 4%.

20 La Figura 1 y 4 muestran los resultados de resistencia y supervivencia a pH de las cepas objeto de la invención. En el caso de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* 22A (CNCM I-4036) así como *Lactobacillus paracasei* 7 (CNCM I-4034), los resultados se ilustran en la Figura 1 y demuestran que a pH 3,0 las cepas presentan una resistencia similar o ligeramente superior a las cepas comercialmente ensayadas. No obstante, a pH 2,0, la cepa 22A presenta una viabilidad muy elevada comparada con el resto de las cepas que no sobreviven a ese pH. En el caso de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, los resultados se ilustran en la Figura 4, donde puede observarse que a pH 3,0 la cepa 15B muestra una resistencia significativamente muy superior a la de las otras dos bifidobacterias ensayadas, siendo su viabilidad superior al 100%, lo que indica que la bacteria puede reproducirse a ese pH.

25 Las Figuras 2 y 5 muestran los resultados de la influencia de las sales biliares sobre la supervivencia de las cepas de la presente invención. En la Figura 2 se presentan los resultados relativos a las cepas CNCM I-4036 y CNCM I-4034. Según se desprende, ambas cepas muestran un porcentaje de supervivencia muy superior a las cepas comerciales ensayadas, siendo el porcentaje de supervivencia superior al 100% lo que indica que pueden incluso reproducirse en presencia de estas sales. En la Figura 5 se presentan los resultados referentes a la cepa CNCM I-4035. Tal y como se ilustra en esta figura, esta cepa muestra una mayor supervivencia a concentraciones más elevadas, si comparada con las bifidobacterias control del estado de la técnica.

Ejemplo 9. Pruebas de adhesión a células epiteliales intestinales.

35 Con las colonias ya seleccionadas por la resistencia a pH y a sales biliares, se procede a realizar el ensayo de adhesión celular. Dicho ensayo se ha realizado con células epiteliales intestinales HT29. Primero, se realizó una serie de intentos para determinar la adhesión celular mediante diferentes tinciones: Gram, azul de metileno, Giemsa, etc. Observando que era muy difícil determinar el porcentaje de adhesión a las células HT29, por este medio.

40 Se planteó cual podría ser el mejor método para determinar el porcentaje de adhesión, llegando a la conclusión de que probablemente el mejor método sería aquel que permitiera recuperar todas las bacterias que se adhirieran. Por ello se eligió el método de tripsinización, y para ello se procedió de la siguiente manera:

1. Incubar las células HT29 a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta confluencia en placas de 24 pocillos.
2. Incubar en anaerobiosis las distintas colonias a ensayar.
3. Poner en contacto las bacterias con las células siguiendo los pasos descritos a continuación:
  - a. Centrifugar las bacterias a 5000 rpm durante 5 minutos.
  - 45 b. Eliminar el sobrenadante y resuspender las bacterias en 1 ml de PBS estéril.
  - c. Repetir los pasos a y b dos veces más.
  - d. Determinar la D.O de cada bacteria a 600 nm.
  - e. Diluir el cultivo bacteriano hasta D.O de 0,8 en medio de cultivo de células, previamente preparado sin FBS (suero bovino fetal) y antibióticos (1 a 5x10<sup>6</sup> CFU/ml).

- f. Eliminar el medio de cultivo de las células.
  - g. Lavar varias veces con PBS estéril para eliminar los restos de FBS y antibióticos.
  - h. Añadir 250ml de la suspensión bacteriana a cada pocillo. Se realiza el experimento por triplicado.
  - i. Incubar a 37°C y 5% CO2 durante 90 minutos.
- 5 4. Una vez incubadas las bacterias con las células se realiza lo siguiente:
- a. Eliminar el medio por aspiración con una pipeta Pasteur.
  - b. Lavar 4 ó 5 veces con PBS 1X (pH 7,0).
  - c. Añadir 100µl de tripsina e incubar 10-15 minutos a 37°C.
  - d. Recuperar todo el volumen del pocillo y pasar a un Eppendorf.
- 10 e. Lavar el pocillo con 150µl de PBS e incorporar al mismo Eppendorf.
- f. Realizar varias diluciones de cada muestra (4 ó 5).
  - g. Sembrar 50µl de cada dilución.
  - h. Incubar en anaerobiosis a 37°C durante 72 horas.
  - i. Contar el número de colonias.
- 15 5. Determinar el % de adhesión.

**Nº colonias adherentes**

**% Adhesión =** \_\_\_\_\_ **X 100**

**Nº colonias inoculadas**

20 La Figura 3 muestra los resultados de adhesión de las cepas CNCM I-4036 (cepa22A) y CNCM I-4034 (cepa 7), objeto de la invención. Ambas cepas presentan unos porcentajes de adhesión muy superiores a los porcentajes mostrados por las cepas control, (en el caso de la cepa 22A superior al doble), lo cual indica su potencial acción en la modulación de actividades celulares del intestino, incluida la inmunomodulación.

La Figura 6 muestra los resultados de adhesión de la cepa CNCM I-4035 (cepa 15B), indicando también un porcentaje de adhesión celular muy superior a la de las cepas control.

25 Ejemplo 10. Identificación de bacterias ácido lácticas.

Aislamiento de DNA, amplificación y secuenciación del fragmento 16S rRNA.

Dado el número de colonias seleccionadas en la prueba de adhesión, se procede directamente a su identificación mediante amplificación del fragmento 16S rRNA de cada colonia, secuenciación y búsqueda de homología en la base de datos de la National Center of Biotechnology Information (NCBI).

30 En primer lugar, se incuban las colonias seleccionadas en medio MRS durante 48 hrs a 37°C en anaerobiosis. Luego se lavan con PBS. Para ello:

- 1. Las colonias se centrifugan a 5000 rpm durante 5 minutos.
  - 2. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet bacteriano en 1ml de PBS estéril.
  - 3. Repetir los pasos 1 y 2 tres veces.
- 35 4. Por último, resuspender el pellet en 1 ml de PBS estéril.

Luego, se extrae el ADN genómico de las bacterias, para lo cual se procede de la siguiente manera:

- 1. Centrifugar la suspensión anterior a 5000 rpm durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
  - 2. El pellet bacteriano se resuspende en 567ml de tampón Tris-EDTA (TE).
  - 3. Agregar 30ml de Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y 3ml de proteinasa K (20mg/ml).
- 40 4. Incubar la mezcla a 37°C durante 1 hora.

5. Agregar 100ml de NaCl 5M y 80ml de cetil trimetilamonio bromuro (CTAB)/NaCl.
6. Mezclar e incubar a 65°C durante 10 minutos.
7. Agregar igual volumen (780ml) de la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1).
8. Mezclar y centrifugar durante 5 minutos a 10000 rpm.
- 5 9. Extraer la fase acuosa superior y transferir a un nuevo Eppendorf.
10. Agregar igual volumen de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1).
11. Mezclar y centrifugar durante 5 minutos a 10000 rpm.
12. Extraer la fase acuosa superior y transferir a un nuevo Eppendorf.
13. Agregar 0,6 volúmenes de isopropanol.
- 10 14. Centrifuga durante 13 minutos a 13000 rpm a 4°C.
15. Eliminar el sobrenadante y agregar al ADN precipitado, 1ml de etanol al 70%.
16. Centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm a 4°C.
17. Eliminar el sobrenadante y el precipitado de ADN, luego dejar secar a temperatura ambiente.
18. Resuspender entre 20-50 ml de agua.
- 15 19. Medir la concentración por medio de un espectrofotómetro a 260nm y obtener la relación 260/280, para verificar su pureza.

Amplificación del gen rADN 16S y espacio intergénico 16s-23s por PCR.

- Oligonucleótidos utilizados:

Para amplificar el gen rADN 16s, se utilizaron los siguientes juegos de oligonucleótidos universales:

- 20 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (M = A + C) (SEQ. ID. No. 1)
- 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3' (Y = C + T) (SEQ. ID. No.2)

Amplifica un fragmento de aproximadamente 1450 bp a una temperatura de hibridación de 55°C, tiempo de amplificación de 90 seg y 35 ciclos.

- 39F 5'-TGGCTCAGRWYGAACGCTRG-3' (R = A + G, W = A + T, Y = C + T) (SEQ. ID. No. 3)
- 25 1391R 5'-GACGGGCGGTGWGTRCA-3' (SEQ. ID. No. 4)

Amplificar un fragmento de aproximadamente 1350bp a una temperatura de hibridación de 52°C, tiempo de amplificación de 90 seg y 35 ciclos.

Además se diseñaron oligonucleótidos específicos para bifidobacterias, estos son:

- Bif 250bp F 5'-CTCGTAGGCGGTTCGTCG-3' (SEQ. ID. No. 5)
- 30 Bif 250bp R 5'-AACGGGCCCCACATCCAG-3' (SEQ. ID. No. 6)

Amplificar un fragmento de aproximadamente 250bp a una temperatura de hibridación de 65°C, tiempo de amplificación de 20 seg y 30 ciclos.

Para amplificar las zonas intergénicas 16s-23s, de bacterias lactobacilos y bifidobacterias, se utilizaron los siguientes juegos de oligonucleótidos:

- 35 lactoF 5'-ACACCGCCCGTCACACCATG-3' (SEQ. ID. No. 7)
- lactoR 5'-CCHSTTCGCTCGCCGCTACT-3' (H = A + T, S = G + C) (SEQ. ID. No.8)

Oligonucleótidos específicos para lactobacilos. Amplificar un fragmento de aproximadamente 600 bp a una temperatura de hibridación de 65°C, tiempo de amplificación de 30 seg y 30 ciclos.

- ISBif F 5'-GGGATGCTGGTGTGGAAGAGA-3' (SEQ. ID. No. 9)

ISBif R 5'-TGCTCGCGTCCACTATCCAGT-3' (SEQ. ID. No. 10)

Oligonucleótidos específicos para bifidobacterias. Amplificar un fragmento de aproximadamente 240bp a temperatura de hibridación de 60°C, tiempo de amplificación de 30 seg y 30 ciclos.

5 Para la amplificación del gen rADN 16s y del espacio intergénico 16s-23s, se cargaron entre 50-100 ng de ADN para una PCR de volumen final de 50  $\mu$ l, en cada ciclo se utilizó una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 30 seg. Luego se programó según las condiciones de cada juego de oligonucleótidos antes especificadas.

Se verificó el resultado de la amplificación en un gel de agarosa al 1,3%, se tiñeron las muestras con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador ultra violeta.

10 Las amplificaciones que resultaron negativas se repitieron, las que resultaban positivas se procedieron a amplificar con el kit de GE healthcare: Ilustra™ GFX™ PCR DNA and gel Band Purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificados se resuspendieron las muestras en 25ml de agua y se ratificó la purificación visualizando en un nuevo gel de agarosa al 1,3%.

Posteriormente, las muestras fueron llevadas al Servicio de Secuenciación de ADN del Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra" (CSIC).

15 Ejemplo 11. Identificación mediante pruebas de fermentación.

20 Se utilizan los sistemas API ZYM y API 50 CHL (bioMerieux's). El sistema API ZYM es un método semi-cuantitativo para la medición de actividades enzimáticas. Este sistema posee 20 pocillos, 19 de los cuales contiene un substrato deshidratado para la detección de la actividad de 19 enzimas (Figuras 7 y 8) se obtiene un resultado colorimétrico, el cual es indicativo del grado de actividad enzimática, y fue graduada en una escala de 0-5 en comparación con el control. También, se utilizó API 50 CH strips y API CHL medio (bioMerieux's), el cual es un método para obtener un perfil de fermentación de 49 carbohidratos (Figuras 9 y 10). Se obtiene un resultado colorimétrico, pero en este caso sólo se clasifican como positivo (+), negativo (-), e intermedio (V), en comparación con el control. En todas las pruebas se utilizaron las bacterias controles.

25 Ejemplo 12. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas *L. paracasei* CNCM I-4034, *B. breve* CNCM I-4035 y *L. rhamnosus* CNCM I-4036

Cepas en estudio y condiciones de cultivo y almacenamiento.

En el presente estudio se han analizado un total de 3 cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bidifobaterium* (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas utilizadas en el estudio y condiciones de cultivo.

Especie	Cepa	Medio de Cultivo	Temperatura	Aireación
<i>L. paracasei</i>	CNCM I-4034	MRS	37°C	Anaerobiosis
<i>B. breve</i>	CNCM I-4035	MRS-Cisteína 0,05%	37°C	Anaerobiosis
<i>L. rhamnosus</i>	CNCM I-4036	MRS	37°C	Anaerobiosis

30 Para estas cepas, se ha evaluado su capacidad antimicrobiana frente a agentes patógenos digestivos bacterianos (*Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Escherichia coli* enteropatógena y *Salmonella enterica*) y víricos (virus Ito, Wa y Va70), recogidos en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Cepas de microorganismos patógenos utilizados

Especie	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella sonnei</i>	Rotavirus
Cepas	LMG 8775	CECT 4031	CECT 457	Wa
	LMG 18041	CECT 935	CECT 4887	Va70
	LMG 19449	CECT 911	CECT 413	Ito

Tabla 3. Cepas de microorganismos patógenos utilizados

Especie	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena	<i>Salmonella enterica</i>
Cepas	CECT 434	CECT 443	CECT 443
	CECT 501	CECT 729	CECT 725
	CECT 515	CECT 742	CECT 4594

- 5 En el caso de las bacterias, éstas fueron almacenadas en una solución de MRS adicionado con glicerol 20% (p/v) mediante congelación a -80°C. Los virus fueron almacenados en medio MEM en congelación a -190°C.

Obtención del sobrenadante libre de células para el estudio.

- 10 Para obtener sobrenadante concentrado para los distintos ensayos, las cepas se cultivaron en medio líquido durante 17h y 24h en medio MRS (CNCM I-4034 y CNCM I-4036) o MRS adicionado de cisteína 0,05% (CNCM I-4035) a 37°C. El sobrenadante de cada una de las cepas se recogió por centrifugación y se liofilizó. El concentrado obtenido se disolvió hasta obtener una solución concentrada 10x, se neutralizó el pH hasta un valor de 6,0 y se esterilizó mediante filtración por 0,22 µm. Alícuotas del sobrenadante neutralizado y esterilizado se almacenaron en congelación a -20°C hasta su uso.

Ensayos de actividad en medio líquido frente a patógenos digestivos bacterianos.

- 15 Para llevar a cabo los ensayos de inhibición en medio líquido, se utilizó una modificación del protocolo de Spinler y colaboradores (2008). Brevemente, en placas multipocillo de 250 µl de volumen se adicionaron por separado los sobrenadantes obtenidos en porcentajes (v/v) crecientes (0,2% a 4%) a medio de cultivo inoculado al 5% con crecimiento *overnight* de cada uno de los patógenos. Las curvas de crecimiento se obtuvieron de forma monitorizada mediante medida de la DO 595nm utilizando el lector de placas Multiskan 5 Ascent. A partir de los resultados
- 20 obtenidos en las distintas réplicas, se evaluó de forma cuantitativa la inhibición ejercida en forma de porcentaje de inhibición del crecimiento respecto a un control sin adición de sobrenadante de la cepa inhibidora.

Ensayos de actividad en medio líquido frente a patógenos digestivos víricos.

- 25 Los ensayos de reducción de la infección vírica a partir de sobrenadante de las cepas en estudio se llevaron a cabo según el protocolo publicado por Botić *et al.* (2007) con modificaciones para su adaptación al trabajo a realizar en este proyecto. En este caso, para la realización de estos ensayos se utilizó la línea de células intestinales humanas HT-29.

Resultados de los ensayos de actividad en medio líquido frente a los patógenos digestivos bacterianos: *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei* y *Helicobacter pylori*

- 30 Para evaluar el efecto de los sobrenadantes de crecimiento de las cepas *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *B. breve*, se utilizaron sobrenadantes de crecimiento de 17 y 24h respectivamente, neutralizados y concentrados 10x.

- 35 Los resultados variaron mucho dependiendo tanto del probiótico como de la cepa patógena. En el caso de *L. monocytogenes*, la adición del sobrenadante obtenido tras el crecimiento durante 17 h de *L. paracasei* tuvo un efecto inhibitorio (Figura 10A). En el caso de *L. rhamnosus*, los mejores resultados se obtuvieron a partir de la adición de sobrenadante de 24 h de cultivo. En el caso de *B. breve*, se destaca la inhibición en *L. monocytogenes* CECT 4031T (Figura 10B). Los resultados obtenidos para *S. sonnei* fueron similares a los de *L. monocytogenes*, dado que para *L. paracasei* se obtuvieron los mejores resultados a partir de la adición del sobrenadante obtenido tras el crecimiento durante 17 h, y en *L. rhamnosus* los mejores resultados se obtuvieron a partir de la adición de sobrenadante de 24 h

de cultivo (Figura 10C). En el caso de *H. pylori*, se ha obtenido una disminución significativa en el crecimiento del patógeno a partir de los sobrenadantes de 17h y 24h de *L. paracasei* y *B. breve*, siendo la inhibición mayor en los sobrenadantes provenientes de 24h de cultivo. Los porcentajes de inhibición obtenidos quedan descritos en la siguiente tabla (tabla 4).

Tabla 4: porcentajes de inhibición obtenidos para cada uno de los patógenos en medios de cultivo adicionados de sobrenadantes de las cepas en estudio.

	<b>L. paracasei</b>						<b>L. rhamnosus</b>						<b>B. breve</b>					
	0,4% (v/v)		2%		4%		0,4% (v/v)		2%		4%		0,4% (v/v)		2%		4%	
	17h	24h	17h	24h	17h	24h	17h	24h	17h	24h	17h	24h	17h	24h	17h	24h	17h	24h
<i>L. monocytogenes</i> CECT 935	0,00	0,00	33,09	6,64	0,00	1,89	1,51	3,21	8,43	13,86	2,45	30,31	0,69	0,00	1,24	0,00	0,03	0,00
<i>L. monocytogenes</i> CECT 4031	0,00	0,00	0,00	0,00	9,48	0,00	0,00	0,00	1,24	10,67	8,21	15,29	3,32	16,63	1,06	9,88	4,54	28,05
<i>L. monocytogenes</i> CECT 911	2,60	5,73	7,31	9,92	25,64	16,81	8,46	5,18	11,99	18,36	15,53	28,13	4,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>S. sonnei</i> CECT 457	0,00	0,00	2,63	9,95	9,25	20,53	1,78	0,41	0,00	16,04	6,79	33,00	0,00	12,94	0,00	25,75	2,44	19,36
<i>S. sonnei</i> CECT 413	28,72	0,00	32,51	3,88	80,99	82,10	0,00	5,17	5,49	16,32	80,95	82,06	8,05	0,00	7,19	0,00	14,83	0,00
<i>S. sonnei</i> CECT 4887	0,00	0,00	2,63	9,95	9,25	20,53	0,00	0,00	0,00	10,05	3,80	29,07	0,00	0,00	10,00	0,00	0,00	0,00
<i>H. pylori</i> LMG 4081 <sup>T</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,24	0,00	9,70	2,06	4,19	0,00	0,00	0,00	0,00	14,97	0,00	6,33	0,00
<i>H. pylori</i> LMG 19499	21,15	13,24	51,70	41,05	75,80	70,89	17,36	36,67	54,84	61,13	83,48	85,28	12,56	37,80	37,79	71,92	57,33	77,56
<i>H. pylori</i> LMG 8775	13,84	31,34	34,61	74,04	33,65	95,66	0,00	0,00	0,00	22,50	70,77	44,22	25,77	20,38	35,38	58,55	38,50	85,00

Resultados de los ensayos de actividad en medio líquido frente a los patógenos digestivos bacterianos: *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*

5 Para el sobrenadante de la bacteria *L. paracasei* se observa una inhibición del crecimiento significativa para el grupo de las *Salmonella* ensayadas (Figura 11). Este efecto se debe principalmente al sobrenadante no neutralizado, lo que sugiere que se debe a la producción de ácido procedente de la fermentación, que limita el crecimiento del patógeno. En el caso de la *Salmonella typhi* CECT 725, se observa el efecto inhibitorio ya sea al 1% y 4% del sobrenadante independientemente de si este se encuentra neutralizado o no neutralizado lo que sugiere que la inhibición se debe a algún tipo de bacteriocina u otro factor de naturaleza desconocida que estaría ejerciendo este efecto sobre el patógeno.

10 El sobrenadante de la bacteria *B. breve* ejerce una inhibición del crecimiento sobre la bacteria *Salmonella typhi* (CECT 725). Se observa este efecto utilizando el sobrenadante para todas las condiciones (17 y 24 h; neutralizado y no neutralizado; 1% y 4%), no descartándose nuevamente la producción de algún tipo de bacteriocina u otro factor de distinta naturaleza (Figura 12).

15 Para el sobrenadante de la bacteria *L. rhamnosus* se aprecia una inhibición significativa del crecimiento principalmente al 4%, para todos los grupos (*E. coli* ETEC, *E. coli* EPEC y *Salmonella enterica*) (Figura 13). Este efecto se observa mayoritariamente con el sobrenadante no neutralizado, lo que de nuevo sugiere que se deba a productos ácidos derivados de la fermentación, que limitan el crecimiento del patógeno.

20 Aunque en el caso de la *E. coli* EPEC (CECT 742) y *Salmonella typhimurium* (CECT 4594) se observa inhibición con el sobrenadante neutralizado de 24 h, este efecto puede ser atribuido, como en casos anteriores, a la presencia de algún tipo de factor o bacteriocina procedente del medio de crecimiento de la bacteria probiótica (Figura 13).

Resultados de los ensayos de actividad en medio líquido frente a los patógenos digestivos víricos: Rotavirus humanos Ito, Wa y Va70

25 Se ha puesto a punto los protocolos de infección, detección de focos de infección y cuantificación de efecto protector para los rotavirus humanos Ito, Wa y Va70. Para obtener resultados lo más representativos posibles, los ensayos de infección y protección se han llevado a cabo en la línea celular humana HT-29.

30 Una vez amplificados los virus en células MA-104, se procedió a su titulación en la línea HT-29. Los títulos obtenidos en unidades formadoras de focos de infección fueron  $2,02 \times 10^6$  uff/mL para el virus Ito,  $6,80 \times 10^4$  uff/mL para el virus Wa y  $2,33 \times 10^5$  uff/mL para el virus Va70. Los virus se llevaron a las concentraciones apropiadas de infección a partir de los resultados de titulación obtenidos. Para asegurar la corrección de los ensayos, se realizaron los ensayos de infección utilizando tres diluciones decimales seriadas consecutivas y se realizaron los ensayos por triplicado. La Figura 14 resume los resultados de reducción de focos de infección obtenidos en sobrenadantes sin concentrar previamente neutralizados, provenientes de cultivos de 24 h. Estos resultados indican que las cepas de la presente invención reducen los focos de infección de todos los virus ensayados, (Wa, Ito y Va70).

35

Bibliografia

- Adolfsson O, Meydani SN, Russell RM. Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:245-256.
- Agarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti AC. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 202; 1:327-41.
- 5 • Akalin AS, Gonc S, Duzel S. Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice *J Dairy Sci* 1997; 80:2721-25.
- Andrighetto C, De Dea P, Lombardi A, Neviani E, Rossetti L, Giraffa G. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. *Res Microbiol* 1998; 149:631-643.
- 10 • Archer SY, Meng S, Shei A, *et al.* P21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:6791-96.
- Arhné S, Molin G, Stahl S. Plasmids in *Lactobacillus* strain isolated from meat and meat products. *Syst Appl Microbiol* 1989; 11:320-325.
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, *et al.* Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005; 307:1915-1920.
- 15 • Bai AP, Ouyang Q, Xiao X, Li SF. Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. *Int J Clin Pract* 2006; 60:284-88.
- Barry T, Colleran G, Glenon M, Dunican L, Gannon F. The 16S/23S ribosomal spacer as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl* 1991; 1:51-56.
- 20 • Beerens. Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Appl Env Microbio* 1991; 57:2418-19.
- Berg RD. Probiotics, prebiotics or “conbiotics.” *Trends Microbiol* 1998; 6:89–92.
- Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA-1 binds to cultured human intestinal cell-lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994; 35:483–9.
- Bezirtzoglou E. The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe* 1997; 3:173-177.
- 25 • Biller JA, Katz AJ, Flores AF, Buie TM, Gorbach SL. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1995; 21:224-6.
- Black FT, Andersen PL, Orskov J, *et al.* Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveler’s diarrhea. *Travel Med* 1989; 7: 333-5.
- 30 • Botes M, Loos B, van Reenen CA. Adhesion of the probiotics strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. *Arch Microbiol* 2008; 190: 573-584.
- Botić, T., Klingberg, T.D., Weingartl, H., Cencic, A. (2007) A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 115 (2): 227-234.
- 35 • Bouton Y, Guyot P, Grappin R. Preliminary characterization of microflora of comte cheese. *J Appl Microbiol* 1998; 85:123-131.
- Brownlee IA, Havler ME, Dettmar PW, Allen A, Pearson JP. Colonic mucus: secretion and turnover in relation to dietary fibre intake. *Proc Nutr Soc* 2003; 62:245-249.
- Butler M, Ng C, van Heel D, Lombarda G, Lechler R, Playford R, Ghosh S. Modulation of dendritic cell phenotype and function in an *in vitro* model of the intestinal epithelium. *Eur j Immunol* 2006; 36:864-74.
- 40 • Buts JP, De Keyser N. Effects of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. *Dig Dis Sci* 2006; 51:1485-92.
- Buts JP, DeKeyser N, Marandi S, Hermans D, Chae YHE, Lambotte L, Chanteux H, Tulkens PM. *Saccharomyces boulardii* up-grades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. *Gut* 1999; 45:89-96.
- Castagliuolo I, Riegler MF, Valenick L, LaMont JT, Pothoulakis C. *Sacharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect Immu* 1999; 67:302-7.

- Cebeci A, Gurakan C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiol 2003; 20:511-518.
- Cetina-Sauri G, Sierra Basto G. Evaluation therapeutique de *Saccharomyces boulardii* chez des enfants souffrant de diarrhee aigué. Ann Pediatr 1994 ; 41:397-400.
- 5 • Chai F, Evdokiou A, Young GP, *et al.* Involvement of p21 (Waf1/Cip1) and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate. Carcinogenesis 2000; 21:7-14.
- Chu H, Kang S, Ha S, Cho K, Park SM, Han KH, *et al.* *Lactobacillus acidophilus* expressing recombinant K99 adhesive fimbriae has an inhibitory effect on adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Microbiol Immunol 2005; 49:941-8.
- 10 • Clements ML, Levine MM, Black RE, Robins-Browne RM, Cisneros LA, Drusano GL, Lanata CF, Saah AJ. *Lactobacillus prophylaxis* for diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 1981; 20:104-8.
- Coconnier M, Lievin V, Bernet-Camard MF, Hudault S, Servin A. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:1046-52.
- 15 • Collins M, Samelis J, Metaxopoulos J, Wallbanks S. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. J Appl Bacteriol 1993; 75:595-603.
- Coronen R, Korpela R, Moilanen E. Signalling mechanisms involved in the induction of inducible nitric oxide synthase by *Lactobacillus rhamnosus* GG, endotoxin, and lipoteichoic acid. Inflammation 2002; 26:207-14.
- 20 • Cui H, Chen CL, Wang JD, Yang UJ, Cun Y, Wu JB, Liu YH, Dan HL, Jian YT, Chen XQ. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. World J Gastroenterol 2004; 10:1521-25.
- D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. BMJ 2002; 324:1361.
- 25 • Danielson AD, Peo ER Jr, Shahani KM, Lewis AJ, Whalen PJ, Amer MA. Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. J Anim Sci. 1989;67: 966-74.
- De angelis M, Corsetti A, Tosti N, Rossi J, Corbo M, Gobbetti M. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheese based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. Appl Environ Microbiol 2001; 67:2010-20.
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe MT. A medium for the cultivation of lactobacilli. J Appl Bacteriol 1960; 23:130-5.
- 30 • De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics--compensation for lactase insufficiency. Am J Clin Nutr. 2001; 73:421S-429S.
- Desjardins ML and Roy D. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. J Dairy Sci 1990; 73:299-307.
- Di Caro S, Tao H, Grillo A, Elia C, Gasbarrini G, Sepúlveda AR, Gasbarrini A. Effects of *Lactobacillus* GG on genes expression pattern in small bowel mucosa. Dig Liver Dis 2005; 37:320-29.
- 35 • Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Luinetti O, *et al.* Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. Dis Colon Rectum 2003; 46:1498-1507.
- Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, Morrissey D, Thornton G, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Quigley EM, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Antonie Van Leeuwenhoek. 1999; 76:279-92.
- 40 • Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. Am J clin Nutr 2001; 73 ( suppl) 386S-92S.
- Eaden JA, Abrams KR, Matberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. Gut 2001; 48:526-535.
- 45 • Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson M, Andersson R, Willen R, Jeppsson B, Molin G, Bengmark S. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat Digestion 1993; 54:248-255.

- FAO/WHO (2002). Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
- Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel J, Mizon J. Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1997; 42:817-822.
- 5 • Floch MH, Binder HJ, Filburn B, Gershengoren W. The effect of bile acids on intestinal micromicrobiota. *Am J Clin Nutr* 1972; 25:1418–26.
- Forestier C, de Champs C, Valtoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res microbiol* 2001; 152:167-173
- 10 • Fukushima M, Nakano M. Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat- and cholesterol-enriched diet. *Br j Nutr* 1996; 76:857-67.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 1989; 66:365-78.
- Fuller R., ed. Probiotics: the scientific basis. London: Chapman & Hall, 1992
- Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 1985; 49:377-81.
- 15 • Goldin BR, Gorbach SL. Probiotics for humans. In: Fuller R, ed. Probiotics, the scientific basis. London: Chapman and Hall, 1992;355–76.
- Gopal P, Sullivan P, Smart J. Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrate for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis DR 10* and *Lactobacillus acidophilus DR 20*. *Int Dairy J* 2001; 11:19-25.
- 20 • Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus DR20* and *Bifidobacterium lactis DR10* strain and their antagonistic activity against an eterotoxigenic Escherichia coli. *Int J Food Microbiol* 2001; 67:207-16.
- Gorbach SL, Chang TW, Goldin B. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. *Lancet.* 1987; 2:1519.
- 25 • Gordon JI, Hooper LV, McNevin MS, Wong M, Bry L. Epithelial cell growth and differentiation.III. promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1997; 273:G565-G70.
- Gotz V, Romankiewicz JA, Moss J, Murray HW. Prophylaxis against ampicillin-associated diarrhea with a lactobacillus preparation. *Am J Hosp Pharm.* 1979 ;36:754-7.
- 30 • Grupa P, Andrew H, Kirschner BS, *et al.* Is Lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31:453-457.
- Gulewicz P, Szymaniec S, Bubak B, Frias J, Vidal-Valverde C, Trajanowska K, Gulewicz K. Biological activity of a-galactoside preparations from *Lupinus angustifolius L.* and *Pisum sativum L.* seeds. *J Agr food chem* 2002; 50:384-389.
- 35 • Harms HK, Bertele-Harms RM, Bruer-Kleis D. Enzyme-substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *N Engl J Med.* 1987 ;316:1306-9.
- Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30:61-67.
- 40 • Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function. *Cell Growth Differ* 1997; 8:523-532.
- Heiling HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteu P, Akkermans AD, and de Vos WM. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. And other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of n16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:114-123.
- 45 • Henriksson A, Khaled AKD, PL Conway. Lactobacillus colonization of the gastrointestinal tract of mice after removal of the nonsecreting stomach region. *Microb Ecol Health Dis* 1999; 11:96–9.
- Hilton E, Kolakowski P, Singer C, Smith M. Efficacy of *Lactobacillus GG* as a Diarrheal Preventive in Travelers. *J Travel Med.* 1997; 4:41-43.

- Höchter W, Chase D, Hegenhoff G. *Saccharomyces boulardii* in treatment of acute adult diarrhoea. Efficacy and tolerance of treatment. *Munch Med Wochen* 1990; 132:188-92.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huisin't Veld, J.H.J., Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 1998; 41,85–101.
- 5 • Hopkins M, Cummings H, McFarlane G. Interspecies differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate source. *J Appl Microbiol* 1998; 85:381-386.
- Isolauri E, Salminen S. Probiotics, gut inflammation and barrier function. *Gastroentero Clin North Am* 2005; 34:437-450.
- 10 • Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, *et al.* Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 1996; 180:152-159.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol Rev* 1995; 59:171-200.
- Jankowska A, Laubitz D, Antushevich H, Zabielski R, Grzesiuk E. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *J Biomed Biotechnol* 2008; 2008:357964.
- 15 • Jin LZ, Ho WY, Abdullah N, Jalaludin S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998; 27:183-185.
- Jobin C, Sartor RB. The I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278:C451-C462.
- 20 • Julia M, Wong RD, Russell de Souza RD, Cyril W, *et al.* Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40:235-243.
- Kalliomaki MA, Isolauri E. Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004; 24:739-752.
- Kelsall B, Biron C, Sharma O, Kaye P. Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nat Immunol* 2002; 3:699-702.
- 25 • Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by acid lactic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 12:39-85.
- Ko JS, Yang HR, Chang JY, Seo JK. *Lactobacillus plantarum* inhibits epithelial barrier dysfunction and interleukin-8 secretion induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *World J Gastroenterol* 2007; 13:1962-65.
- Kollaritsch H, Holst H, Grobara P, *et al.* Prophylaxe der reisediarrhoe mit *Saccharomyces boulardii*. *Forst Chr Med* 1993; 111:152-56.
- 30 • Koshiji M, Adachi Y, Sogo S. Apoptosis of colorectal adenocarcinoma (COLO201) by tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and/or interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), resulting from down-regulation of Bcl-2 expression. *Clin Exp Immunol* 1998; 111:211-218.
- Kulkarni N, Zang E, Kelloff G. Effect of the chemopreventive agents piroxicam and D,L-alpha-difluoromethylornithine on intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1992; 13:995-1000.
- 35 • Kurmann J. Started for fermented milk: Started with selected intestinal bacteria. *Bull Int Dairy Fed* 1988; 227:41-45.
- Lee Y-K, Salminen S. The coming age of probiotics. *Trends Food Sci Technol* 1995; 6:241-5.
- Lee, Y.K., Puong, K.Y., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J Med Microbiol* 2003; 52:925-930.
- 40 • Lewis R, Gorbach S. Modification of bile acids by intestinal bacteria. *Arch Intern Med* 1972; 130:545-9.
- Lin MY, Yen CL, Chen SH. Management of lactose maldigestion by consuming milk containing lactobacilli. *Dig Dis Sci.* 1998; 43:133-7.
- Lin SY, Ayres JW, Winkler W, Sandine WE. *Lactobacillus* effects on cholesterol: *in vitro* and *in vivo* results. *J Dairy Res* 1989; 72:885-9.
- 45 • Madsen K, Cornish A, Soper P, *et al.* Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001; 121:580-591.

- Mahé S, Marteau P, Huneau JF, Thuillier F, Tomé D. Intestinal nitrogen and electrolyte movements following fermented milk ingestion in man. *Br J Nutr.* 1994; 71:169-80.
- Makras L, Van Acker G, De Vuyst L. *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:6531-6537.
- 5 • Marini M, Bamias G, Rivera-Nieves J. TNF- $\alpha$  neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8366-8371.
- Marteau P, Flourie B, Pochart P, Chastang C, Desjeux JF, Rambaud JC. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an *in vivo* study in lactase-deficient humans. *Br J Nutr.* 1990; 64:71-9.
- 10 • McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, *et al.* Prevention of  $\beta$ -lactam associated diarrhoea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:439-48.
- Medina R, Katz M, Gonzalez S, Oliver G. Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from northwest Argentina. *J Food Prot* 2001; 64:559-563.
- 15 • Medina V, Edmonds B, Young G, James R, Appleton S, Zalewski P. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): Dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. 1997; 57:3697-3707.
- Metchnikoff E. Etudes sur la flore intestinale. *Ann. Inst. Pasteur Paris* 1908; 22:929-55.
- Morata De Ambrosini, Ganzalez, S.N., Oliver, G. Study of adhesion of *Lactobacillus casei* CRL431 to ileal intestinal cells of mice. *J. Food Prot.* 1999; 1430-1434.
- 20 • Nanno M, Morotomi M, Takayama H, Kuroshima T, Tanaka R, Mutai M. Mutagenic activation of biliary metabolites of benzo(a)pyrene by  $\beta$ -glucuronidase-positive bacteria in human faeces. *J Med Microbiol* 1986; 22:351.
- Navarro E, Simonet P, Normard P, Bardin R. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Arch Microbiol* 1992; 157:107-115.
- Nebra Y, Blanch AR. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:5173-6.
- 25 • Niedergang F, Kweon M. New trends in antigen uptake in the gut mucosa. *Trends Microbiol* 2005; 13:485-90.
- O'Hara A, O'Regan P, Fanning A, O'Mahony C, MacSharry J, Lyons A, Bienenstock J, O'mahony L, Sanan F. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* 2006; 118:202-15.
- Otles S, Cagindi O & Akcicek E Probiotics and health. *Asian Pac J Cancer Prev* 2003; 4:369-372.
- 30 • Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C., Salminen, S. Probiotics: mechanisms and established effects. *Intern Dairy J* 1999; 9:43-52.
- Percy-Robb IW, Collee JG. Bile acids: a pH dependent antibacterial system in the gut? *Br Med J* 1972; 3:813-5.
- 35 • Piaia M, Antoine JM, Mateos-Guardia JA, Lepigard A, Lenoir-Wijnkoop I. Assessment of the benefits of live yogurt: methods and markers for *in vivo* studies of the physiological effects of yogurt cultures. *Microb Ecol Health Dis* 2003; 15:79-87.
- Pickard KM, Bremner AR, Gordon JN, *et al.* Microbial-gut interactions in health and disease. Immune responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004; 18:271-285.
- Plant, L.J., Conway, P.L., 2002. Adjuvant properties and colonization potential of adherin/gandnon-adhering *Lactobacillus* spp. Following oral administration to mice. *FEMS Immunol Med Microbio* 2002; 34:105-111.
- 40 • Ratajczak C, Duez C, Grangette C, Pochard P, Tonnel AB, Pestel J. Impact of lactic acid bacteria on dendritic cells from allergic patients in an experimental model of intestinal epithelium. *J Biomed Biotechnol* 2007; 1:719-21.
- Riedel C, Foata F, Philippe D, Adolfsson O, Eikmanns B, Blum S. Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF- $\kappa$ B activation. *World J Gastroenterol* 2006; 12:3729-35.
- 45 • Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro G, Nespoli A, Viale G, Allavena P, Rescigno M. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2005; 6:507-14.

- Rioux KP, Fedorak RN. Probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40:260-263.
- Roberfroid M, Van Loo E, Gibson R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products, *J Nutr* 1998; 128:11-19.
- 5 • Ross RP, Desmond C, Fitzgerald GF, Staton C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic food. *J. Appl. Microbiol.* 2005; 98:1410-17.
- Sablon E, Contreras B, Vandamme E. Antimicrobial peptide of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2000; 68:21-60.
- 10 • Satokari RM, Vaughan EE, Favier C, Dore J, Edwards C, and de Vos WM. Diversity of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in breast-fed and formula-fed infants as assessed by 16S rDNA sequence differences. *Microbiol Ecol Health Dis* 2002; 14:97-105.
- Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977 31; 31:107-33.
- Senmeir J, deVrese M. Probiotics, prebiotics, and Synbiotics, approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:361S-64S.
- 15 • Servin A. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28:405-440.
- Siitonen S, Vapaatalo H, Salminen S, Gordin A, Saxelin M, Wikberg R, Kirkkola AL. Effect of *Lactobacillus GG* yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann Med.* 1990; 22:57-9.
- 20 • SilvaM, Jacobs NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance fro a human *Lactobacillus* strain: Antimicrob Agents Chemother. 1987; 31:1231-33.
- Sing J, Rvenson A, Tomita M, Shimamura S, Ishibashi N, Reddy B. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997; 18:833-41.
- 25 • Sinocrope FA, Roddey G, Mc Donnell TJ. Increased apoptosis accompanies neoplastic development in the human colorectum. *Clin Cancer Res* 1996; 2:1999-2006.
- Snelling AM. Effects of probiotics on the gastrointestinal tract. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18:420–426.
- Spinler, J.K., Taweechotipatr, M., Rognerud, C.L., Oub, C.N., Tumwasorn, S., Versalovic, J. (2008) Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 14: 166– 171.
- 30 • Steiner TS, Nataro JP, Poteet-Smith CE, Smith JA, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 2000; 105:1769-77.
- Stewart L, Pellegrini CA, Way LW. Antibacterial activity of bile acids against common biliary tract organisms. *Surg Forum* 1986; 37:157–9.
- 35 • Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, McFarland LV, Chinn J, Van Belle G. Prevention of antibiotic associated diarrhoea by *Saccharomyces boulardii*: A prospective study. *Gastroenterology* 1989; 96:981-88.
- Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J Dairy Sci.* 1998; 81:2336-40.
- Thornton GM. Probiotic bacteria. Selection of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from the healthy human gastrointestinal tract; characterization of a novel *Lactobacillus*-derived antibacterial protein. PhD thesis. National University of Ireland, Cork, Ireland, 1996.
- 40 • Tien MT, Girardin S, Regnault B, Le Bourhis L, Dillies M, Coppée JY, Bourdet-Sicard R, Sansonetti P, Pédrón T. Anti-Inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-Infected Human Intestinal Epithelial Cells. *J Immunol* 2006; 176:1228-37.
- 45 • Todoriki K, Mukai T, Sato S, Toba T. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *J Appl Microbiol* 2001; 91:154-9.
- Tsai C, Lin P, Hsieh Y. Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown *in vitro*. *Anaerobe* 2008; 14:61-7.

- Tuomola EM, Salminen SJ. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. Int J Food Microbiol 1998; 41: 45-51
- 5 • Van Loo J, Cummings J, Delzenne N, Englyst H, Franck A, Hopkins M, Kok N, Macfarlane G, Newton D, Quigley M, Roberfroid M. Functional food properties of nondigestible oligosaccharides a consensus report from the ENDO project (DGXII AI-RII-CT94-1095) Br J Nutr 1999; 81:121-132.
- Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young RJ. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. J Pediatr. 1999; 135:564-8.
- Wallace T, Bradley S, Buckley N, Green-Johnson JM. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. J food Protect 2003; 66:466-72.
- 10 • Wang S, Ng L, Chow WL, Lee YK. Infant intestinal enterococcus faecalis down-regulates inflammatory responses in human intestinal cell lines. World J Gastroenterol 2008; 14:1067-76.
- Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. Blood 1990; 76:655-66.
- 15 • Wunderlich PF, Braun L, Fumagalli I, D'Apuzzo V, Heim F, Karly M, Lodi R, Politta G, Vonbank F, Zeltner L. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing Enterococcus SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. J Int Med Res. 1989; 17:333-8.
- Yan F, Polk D. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. J Biolog Chem 2002; 277:50959-50965.
- 20 • Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. J Nutr 2005; 135:1752-56.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> HERO ESPAÑA, S.A

<120> AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD PROBIÓTICA A PARTIR DE HECES DE LACTANTES ALIMENTADOS EXCLUSIVAMENTE CON LECHE MATERNA

- 5 <130> AX100007WO  
 <150> PCT/ES09/000130  
 <151> 10-03-2009  
 <160> 10  
 <170> PatentIn version 3.3
- 10 <210> 1  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>
- 15 <223> Oligonucleótido 27F  
 <400> 1  
 Agagtttgat cmtggctcag 20  
 <210> 2  
 <211> 22
- 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido 1492R  
 <400> 2
- 25 tacggytacc ttgttacgac tt 22  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido 39F  
 <400> 3  
 tggctcagrw ygaacgctrg 20  
 <210> 4
- 35 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

- <220>  
 <223> Oligonucleótido 1391R  
 <400> 4  
 gacgggcggt gwgtrca 17
- 5 <210> 5  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>
- 10 <223> Oligonucleótidos específicos para *Bifidobacterium* Bif 250bp F  
 <400> 5  
 ctcgtaggcg gttcgtcg 18  
 <210> 6  
 <211> 18
- 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótidos específicos para *Bifidobacterium* Bif 250bp R  
 <400> 6
- 20 aacgggcccc acatccag 18  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido lactoF  
 <400> 7  
 acaccgcccg tcacacatg 20  
 <210> 8
- 30 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido lactoR
- 35 <400> 8  
 cchsttcgct cgccgtact 20  
 <210> 9

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido ISBif F

<400> 9

gggatgctgg tgtggaagag a 21

<210> 10

<211> 21

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ISBif R

<400> 10

15 tgctgcgctc cactatccag t 21

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Cepa de microorganismo probiótico aislada de heces de niños alimentados exclusivamente de leche materna caracterizada por consistir en *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A con número de registro CNCM I-4036, depositada el 2 de julio de 2008 en la CNMC, Colección nacional de cultivos de microorganismos, Instituto Pasteur 25, Rué du Docteur Roux, F-75724 París.
2. Cepa de microorganismo según reivindicación 1, caracterizada por presentarse en forma de cultivo biológico puro.
3. Cepa de microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por ser aislada.
- 10 4. Cepa de microorganismo probiótico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por presentarse en forma de células viables.
5. Cepa de microorganismo probiótico según reivindicaciones 1-3, caracterizada por presentarse en forma de células no viables.
- 15 6. Formulación que comprende una cepa de microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
7. Formulación según la reivindicación 6, caracterizada porque adicionalmente comprende otro material probiótico.
8. Formulación según reivindicaciones 6-7, caracterizada porque adicionalmente comprende material prebiótico.
- 20 9. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, caracterizada porque adicionalmente comprende un carrier apto para su ingesta.
10. Formulación según reivindicación 9, caracterizada porque dicho carrier es un carrier farmacéuticamente aceptable como cápsulas, tabletas o polvo.
11. Formulación según reivindicación 9, caracterizada porque dicho carrier es un producto alimenticio.
- 25 12. Formulación según reivindicación 11, caracterizada porque dicho producto alimenticio se selecciona entre el grupo de leches y productos lácteos derivados, especialmente leches fermentadas y quesos; cereales y derivados, incluidas masas panarias; sopas y productos en forma deshidratada; productos cárnicos fermentados; derivados de frutas, zumos y bebidas refrescantes; alimentos para usos nutricionales específicos.
- 30 13. Cepa de microorganismo probiótico según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o formulación según cualquiera de las reivindicaciones 6-12 para su uso en alimentación.
14. Cepa según reivindicaciones 1-5 o formulación según reivindicación 13, para su uso en alimentación infantil y/o adulta y/o especial.
- 35 15. Cepa según reivindicaciones 1-5 o formulación según reivindicación 14, para su uso en la elaboración de fórmulas lácteas para la infancia.
16. Cepa según reivindicaciones 1-5 o formulación según reivindicación 15, caracterizada porque las fórmulas lácteas consisten en leches infantiles y/o cereales infantiles, y/o alimentos infantiles listos para comer.
- 40 17. Cepa según reivindicaciones 1-5 o formulación según reivindicación 13, para su uso en la elaboración de complementos alimenticios.
18. Cepa según reivindicaciones 1-5 o formulación según reivindicación 13, para su uso en la elaboración de fórmulas especiales para nutrición oral y/o enteral.
19. Cepa según reivindicaciones 1-5 o formulación según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, para su uso en la elaboración de un producto farmacéutico.
- 45 20. Cepa según reivindicaciones 1-5 o formulación según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, para su uso en la estimulación del sistema inmune y/o en la prevención/tratamiento del asma y/o en la prevención/tratamiento de los trastornos gastrointestinales, y/o en la eliminación/modulación de los principales patógenos digestivos, y/o en la prevención/tratamiento de la obesidad y de sus comorbilidades incluido el síndrome metabólico y la diabetes y/o en las enfermedades propias asociadas al envejecimiento.

- 5 21. Cepa o formulación según reivindicación 20, para su uso en la estimulación del sistema inmune y/o en la prevención/tratamiento del asma y/o en la prevención/tratamiento de los trastornos gastrointestinales, y/o en la eliminación/modulación de los principales patógenos digestivos, y/o en la prevención/tratamiento de la obesidad y de sus comorbilidades incluido el síndrome metabólico y la diabetes y/o en las enfermedades propias asociadas al envejecimiento, caracterizadas porque dichos trastornos gastrointestinales comprenden alteraciones del tránsito intestinal como estreñimiento y alteraciones de la biodisponibilidad de minerales, infecciones y síndromes malabsortivos.
- 10 22. Cepa o formulación, según reivindicación 21, para su uso en la estimulación del sistema inmune y/o en la prevención/tratamiento del asma y/o en la prevención/tratamiento de los trastornos gastrointestinales, y/o en la eliminación/modulación de los principales patógenos digestivos, y/o en la prevención/tratamiento de la obesidad y de sus comorbilidades incluido el síndrome metabólico y la diabetes y/o en las enfermedades propias asociadas al envejecimiento, caracterizadas porque dichas infecciones comprenden infecciones gástricas e infecciones gastrointestinales que cursan con diarrea aguda o crónica.
- 15 23. Cepa o formulación según reivindicación 21, para su uso en la estimulación del sistema inmune y/o en la prevención/tratamiento del asma y/o en la prevención/tratamiento de los trastornos gastrointestinales, y/o en la eliminación/modulación de los principales patógenos digestivos, y/o en la prevención/tratamiento de la obesidad y de sus comorbilidades incluido el síndrome metabólico y la diabetes y/o en las enfermedades propias asociadas al envejecimiento, caracterizadas porque dichos síndromes malabsortivos comprenden trastornos que afectan a la anatomía del intestino, como el síndrome del intestino corto, y trastornos que afectan a la fisiología del intestino como fibrosis quística del páncreas, malabsorción de azúcares, especialmente lactosa, alteraciones de la absorción de lípidos, alergias alimentarias, y enfermedades inflamatorias intestinales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.
- 20

Muestra	Control	pH 3,0	%	pH 2,5	%	pH 2,0	%
LGG	6,97E+07	7,40E+07	106,2	0	0	0	0
L. casei	7,53E+07	7,30E+07	96,9	0	0	0	0
7	5,33E+07	5,99E+07	112,4	0	0	0	0
22A	7,74E+07	7,88E+07	101,8	6,30E+07	81,4	5,90E+07	76,2

FIG 1

Muestra	Control	Oxgall 0,3%	%	Oxgall 0,7%	%
LGG	6,97E+07	4,03E+07	57,8	7,13E+07	76,1
L. casei	7,53E+07	3,08E+07	40,9	8,00E+07	110,6
7	1,16E+07	1,33E+07	114,7	1,79E+07	154,3
22A	7,44E+07	7,55E+07	101,5	7,81E+07	105,0

FIG 2

Muestra	Control	Adhesión	%
LGG	1,98E+08	9,50E+06	4,80
L. casei	3,25E+09	1,33E+08	4,09
7	1,05E+08	7,87E+06	7,48
22A	5,68E+08	6,56E+07	11,55

FIG 3

Muestra	control	pH 3,0	%	pH 2,5	%	pH 2,0	%
B. bifidum	1,04E+08	5,80E+07	55,6	0	0	0	0
B. longum	9,62E+07	1,01E+08	104,8	0	0	0	0
15B	5,33E+07	5,99E+07	139,6	0	0	0	0

FIG 4

Muestra	Control	Oxgal 0,3%	%	Oxgal 0,5%	%	Oxgal 0,7%	%
<b>B. bifidum</b>	7,57E+07	7,54E+07	<b>99,6</b>	6,70E+07	<b>88,5</b>	7,00E+07	<b>92,5</b>
<b>B. longum</b>	7,51E+07	7,54E+07	<b>100,4</b>	7,20E+07	<b>95,9</b>	6,90E+07	<b>91,9</b>
<b>15B</b>	6,10E+07	5,30E+07	<b>86,9</b>	6,00E+07	<b>98,4</b>	7,50E+07	<b>123,0</b>

FIG 5

Muestra	Control	Adhesión	%
<b>B. bifidum</b>	7,80E+06	6,90E+05	<b>8,8</b>
<b>B. longum</b>	1,10E+03	1,00E+02	<b>9,1</b>
<b>15B</b>	6,00E+02	1,00E+02	<b>16,7</b>

FIG 6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Control																				
Fosfatasa alcalina																				
Esterasa (C4)																				
Esterasa Lipasa (C8)																				
Lipasa (C14)																				
Leucina arilamidasa																				
Valina arilamidasa																				
Cisteina arilamidasa																				
Tripsina																				
α-quimotripsina																				
Fosfatasa ácida																				
Naftol-AS-BI-fosfhidrolasa																				
α-galactosidasa																				
β-galactosidasa																				
β-glucuronidasa																				
α-glucosidasa																				
β-glucosidasa																				
N-acetil-β-glucosaminidasa																				
α-manosidasa																				
α-fucosidasa																				
<b>B. bifid</b>	0	2	2	3	1	5	1	4	0	0	3	2	5	5	0	5	1	5	0	0
<b>B. long</b>	0	0	2	2	1	2	0	0	0	0	1	1	5	5	0	5	1	2	0	0
<b>15B</b>	0	0	1	1	1	3	0	0	0	0	1	2	5	5	0	5	2	0	0	0

FIG 7

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	Control	Fosfatasa alcalina	Esterasa (C4)	Esterasa Lipasa (C8)	Lipasa (C14)	Leucina arilamidasa	Valina arilamidasa	Cisteina arilamidasa	Tripsina	$\alpha$ -quimotripsina	Fosfatasa ácida	Naftol-AS-BI-fosfodrolasa	$\alpha$ -galactosidasa	$\beta$ -galactosidasa	$\beta$ -glucuronidasa	$\alpha$ -glucosidasa	$\beta$ -glucosidasa	N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa	$\alpha$ -manosidasa	$\alpha$ -fucosidasa
<b>LGG</b>	0	5	3	4	0	3	5	1	0	0	5	5	2	5	0	2	2	0	0	5
<b>L. casei</b>	0	1	1	5	0	4	5	1	0	0	4	3	0	3	0	5	0	0	0	0
<b>7</b>	0	3	4	4	0	5	5	1	0	0	4	2	0	4	0	5	0	0	0	0
<b>22A</b>	0	5	5	5	0	4	5	1	0	1	5	5	4	5	1	2	3	0	0	5

**FIG 8**

22A	7	L.casei	IGG	
-	-	-	-	Testigo
-	-	-	-	Glicerol
-	-	-	-	Eritritol
-	-	-	+	D-Arabinosa
-	-	-	-	L-Arabinosa
+	+	+	+	D-Ribosa
-	-	-	-	D-Xilosa
-	-	-	-	L-Xilosa
-	+	+	-	D-Adonitol
-	-	-	-	Metil- $\beta$ D-Xilopiranosida
+	+	+	+	D-galactosa
+	+	+	+	D-Glucosa
+	+	+	+	D-Fructosa
+	+	+	+	D-Manosa
+	+	+	-	L-Sorbosa
+	+	-	-	L-Ramnososa
-	+	+	+	Dulcitol
-	-	-	-	Inositol
+	+	+	+	D-Manitol
+	+	+	+	D-Sorbitol
-	-	-	-	Metil- $\alpha$ D-Manopiranosida
+	+	+	-	Metil- $\alpha$ D-Glucopiranosida
+	+	+	+	N-Acetilglucosamina
+	+	+	+	Amigdalina
+	+	+	+	Arbutina
+	+	+	+	Esculina citrato férrico

FIG 9 A

22A	7	L.casei	LGG	
+	+	+	+	Salicina
+	+	+	+	D-Celobiosa
+	+	+	-	D-Maltosa
+	+	+	-	D-Lactosa (orbovino)
-	-	-	-	D-Meliobiosa
-	+	+	+	D-Sacarosa
+	+	+	+	D-Trehalosa
-	+	-	-	Inulina
+	+	-	+	D-Melezitosa
-	-	-	-	D-Rafinosa
-	-	-	-	Almidón
-	-	-	-	Glicógeno
-	-	-	-	Xilitol
+	+	+	+	Gentiobiosa
+	+	+	-	D-Turanosa
-	+	+	-	D-Lixosa
+	+	+	+	D-Tagatosa
-	-	-	-	D-Fucosa
-	-	+	+	L-Fucosa
-	-	-	-	D-Arabitól
-	-	-	-	L-Arabitól
+	+	+	+	Gluconato potásico
-	-	-	-	2-Cetogluconato potásico
-	-	-	-	5-Cetogluconato potásico

FIG 9 B

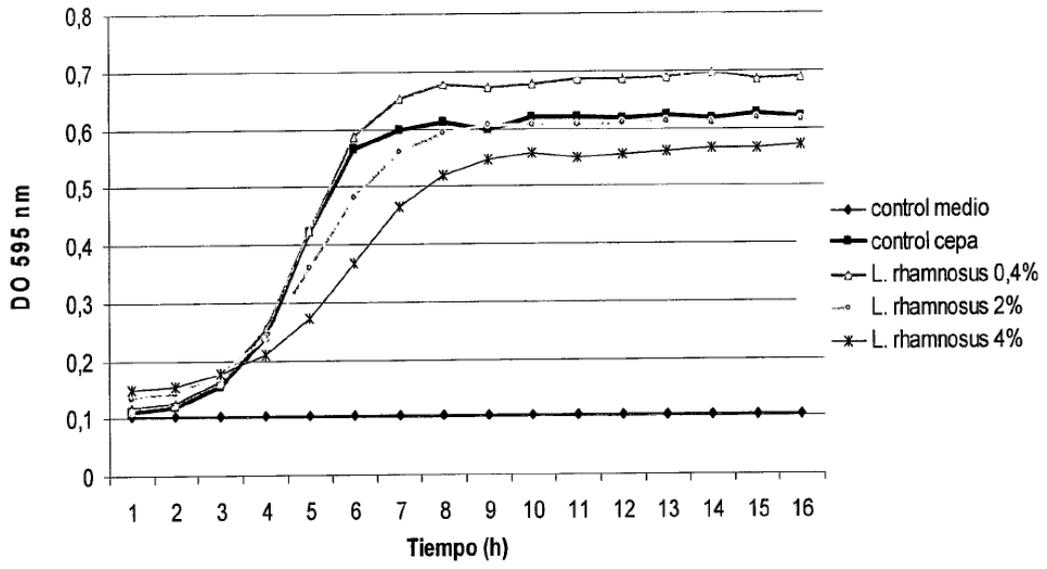


FIG 10A

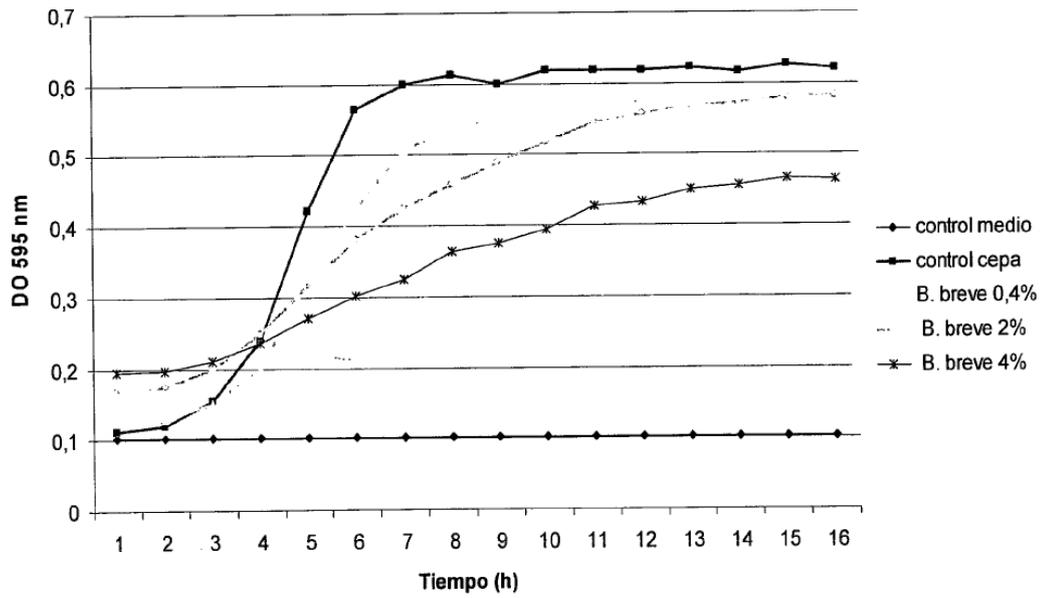


FIG 10B

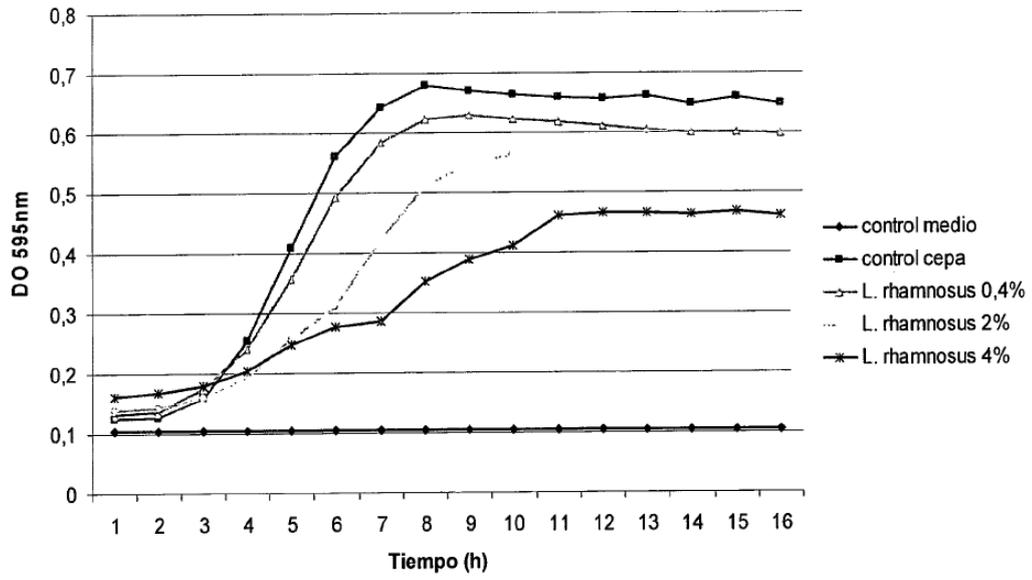


FIG 10C

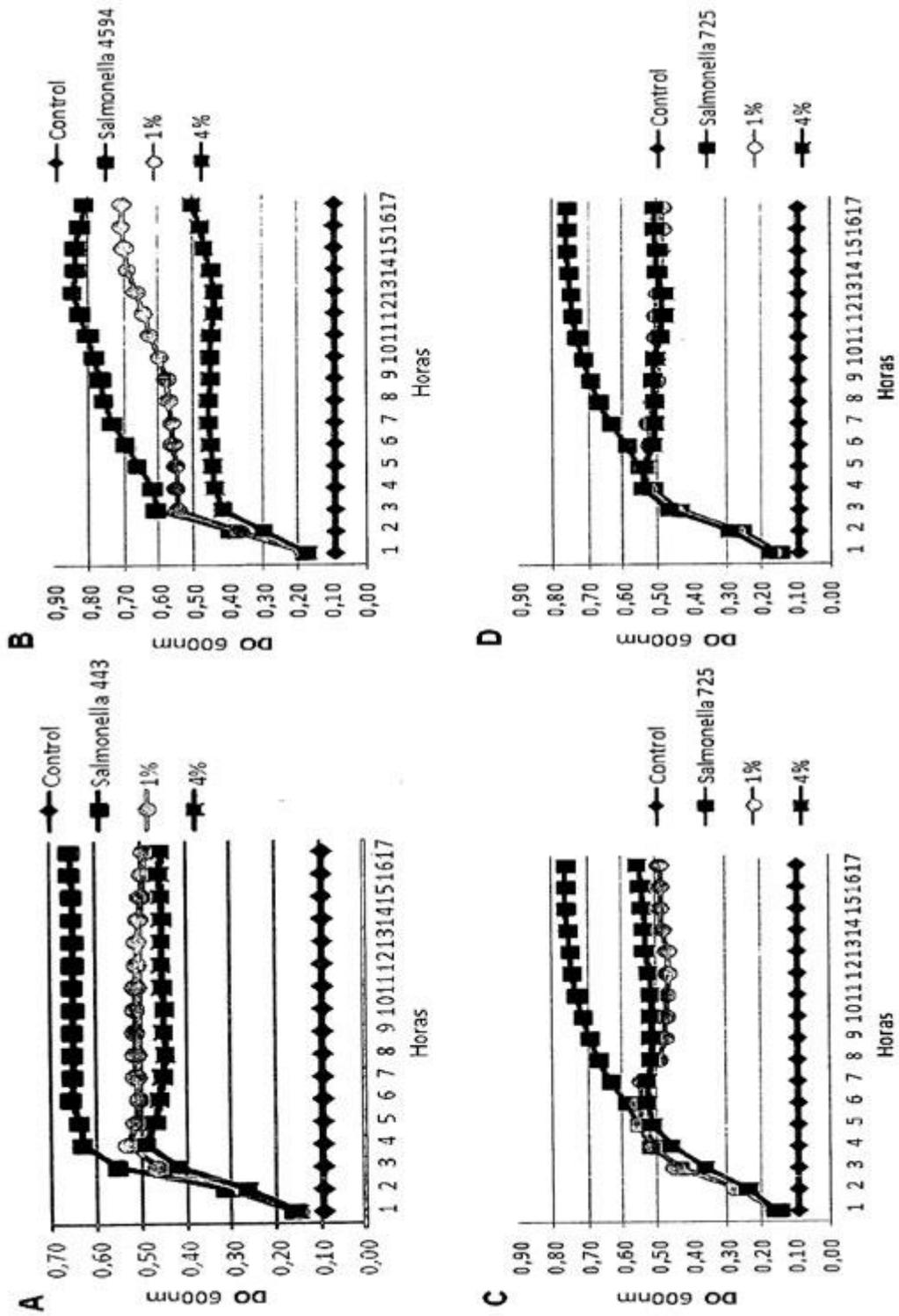


FIG 11

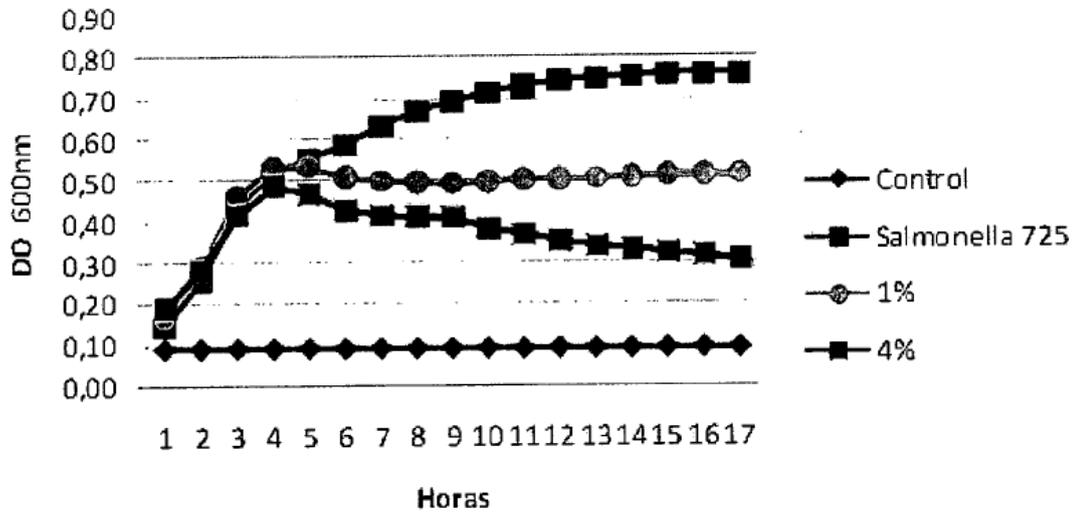


FIG 11E

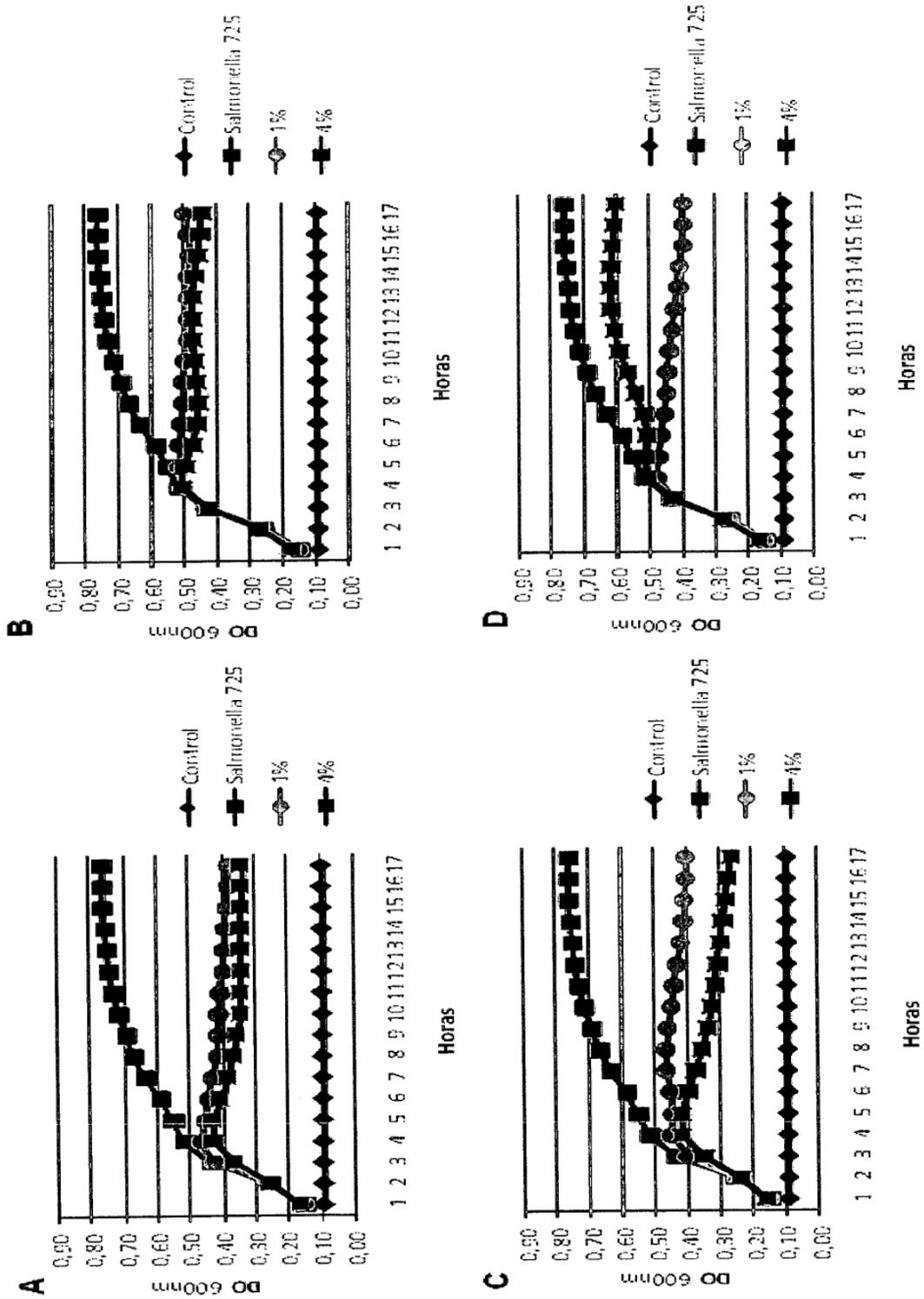


FIG 12

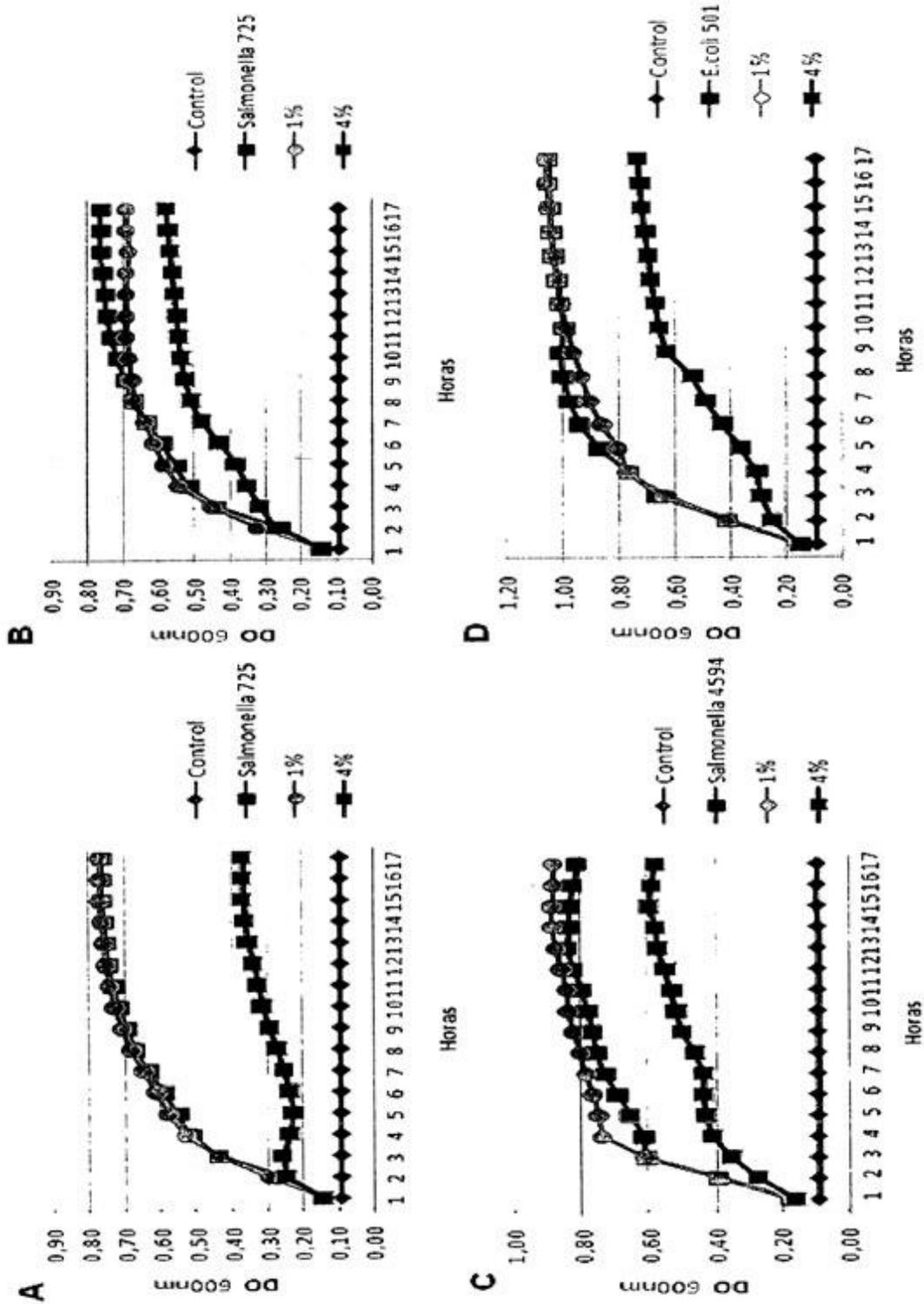


FIG 13

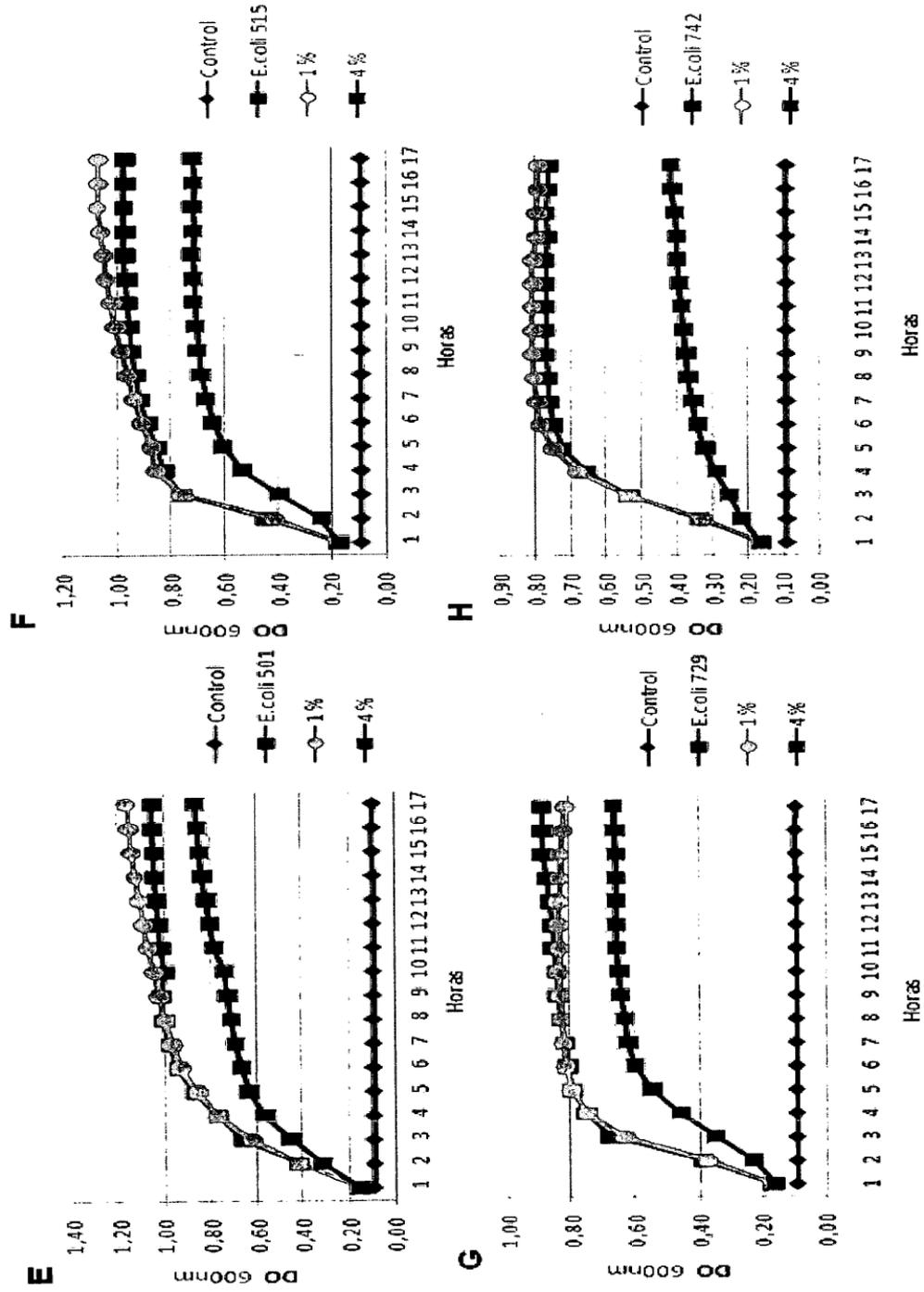


FIG 13

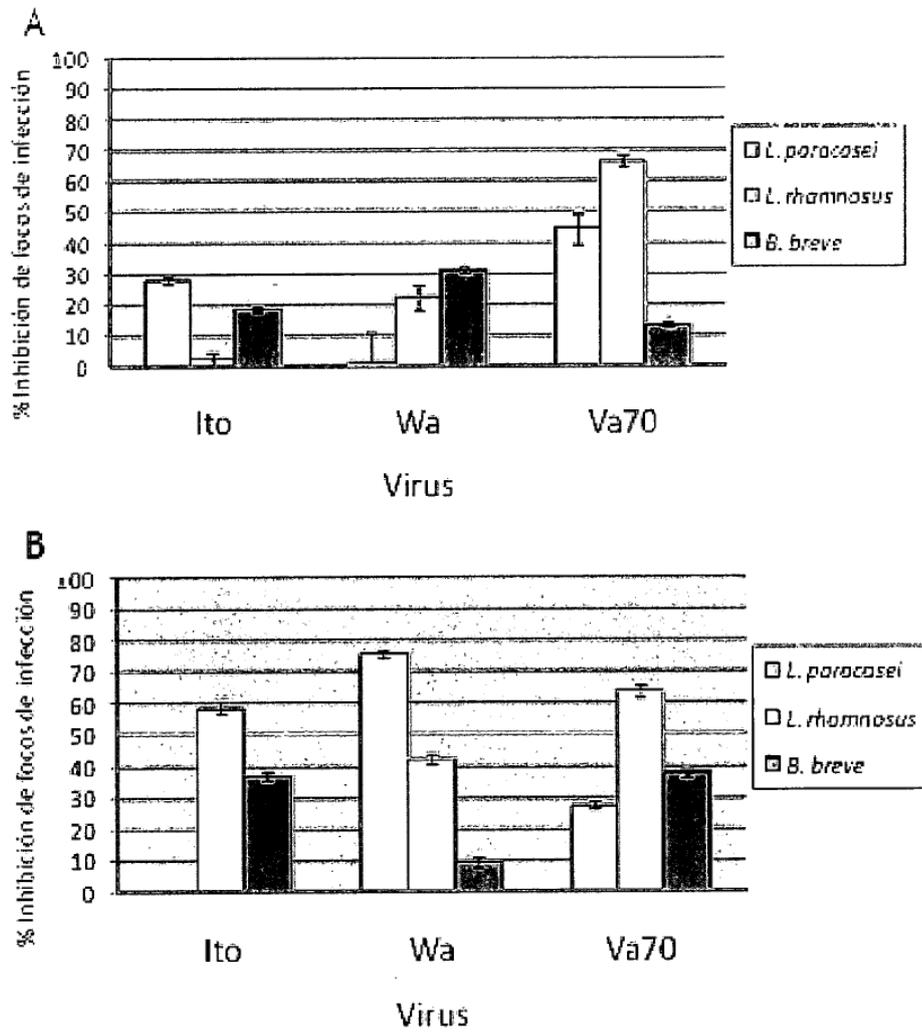


FIG 14