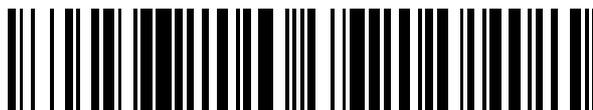


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 702**

51 Int. Cl.:

A23L 1/03 (2006.01)

C12P 7/52 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2010 E 10718580 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2427566**

54 Título: **Microorganismos probióticos aislados de leche de burra**

30 Prioridad:

05.05.2009 EP 09159379

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

07.03.2016

73 Titular/es:

**EUROLACTIS GROUP S.A. (100.0%)
15-17, Avenue Gaston Diderich
1420 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**NAZZARO, FILOMENA;
ORLANDO, PIERANGELO y
CONTI, AMEDEO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 562 702 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

Microorganismos probióticos aislados de leche de burra.

Campo técnico

5 La invención se refiere al campo de microorganismos conocidos como probióticos y su uso en la industria alimentaria, en alimentación humana o animal. En particular, la invención se refiere a probióticos aislados particularmente a partir de leche de burra cruda.

Antecedentes de la invención

10 Los microorganismos probióticos, o simplemente probióticos, se pueden definir como microorganismos que, cuando se administran en dosis adecuadas, es probable que confieran un beneficio en términos de salud o nutrición. Pertenecen a la categoría de los llamados alimentos funcionales.

Los probióticos son conocidos en productos lácteos, tal como productos comercializados bajo las marcas Actimel® o Activia® de DANONE, marca Yakult® de Yakult Honsha o bajo la marca LC1® de NESTLE. Estas bacterias pertenecen a diferentes géneros y especies de bacteria ácido láctica, por ejemplo Bifidus spp. Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus o Lactobacillus johnsonii.

15 Se acepta generalmente que los probióticos proporcionan un beneficio de salud o nutricional por la influencia que tienen sobre el equilibrio de la flora intestinal, aunque el mecanismo preciso por el que actúan los probióticos no siempre se conoce.

20 En los últimos años, el interés en leche de burra ha aumentado considerablemente, debido principalmente a su composición, de modo que se puede considerar una alternativa válida para nutrición infantil a las leches en polvo, leche de soja u otras fórmulas. En realidad la leche de burra se ve muy cercana a la leche humana debido a su composición en ácidos grasos poliinsaturados, su relación calcio/fósforo y su contenido en proteínas. Además, la leche de burra es rica en lisozima, una glicosidasa capaz de hidrolizar los polisacáridos de la pared celular microbiana. Muchos científicos tienen pruebas de la importancia nutricional y para la salud de la lisozima. El alto contenido en lactosa tiene un efecto positivo sobre la absorción intestinal del calcio y es responsable de la palatabilidad. Incluso después de los primeros meses de vida, la leche de burra puede mejorar la mineralización del hueso y constituye un importante aporte nutritivo en niños con alergia severa a la proteína de leche de vaca mediada por IgE, teniendo así un papel en la formación de un sistema inmune eficaz. En la edad más adulta, la leche de burra puede ejercer efectos positivos frente a diferentes patologías cardiovasculares y en dietas hipocolesterolémicas.

30 Además la publicación de C. Chiavari et al. "Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli", LAIT, vol 85, 1 de octubre de 2005 (2005-10-01) páginas 481-490, describe algunas bacterias ácido lácticas aisladas de leche de burra.

Compendio de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar bacterias lácticas probióticas nuevas.

35 En este punto, una realización de la invención propone bacterias lácticas probióticas, aisladas especialmente de leche de burra y seleccionada a partir del grupo que consiste en cepas depositadas bajo los términos del Tratado de Budapest y "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DSMZ, Braunschweig, Alemania) el 8 de diciembre, 2008, bajo número de acceso DSM 22098, DSM 22099, DSM 22100, DSM 22102, DSM 22101, y el 26 de abril, 2010, bajo el número de acceso DSM 23558, DSM 23559 y DSM 23560. Las cepas depositadas bajo DSM 22102, DSM 22101, DSM 23558, DSM 23559, y DSM 23560 define una nueva especie llamada de aquí en adelante Lactobacillus asini.

Otra realización de la invención propone una composición que comprende uno o una pluralidad de especies o cepas de bacteria láctica probiótica de la invención como se mencionó anteriormente. Dicha composición podría ser una composición alimentaria o una composición de bebida, para alimentación humana o animal.

45 Una realización más de la invención proporciona un proceso para fabricar una composición alimentaria o una composición de bebida. Dicho proceso puede comprender las etapas de:

- inocular un producto alimentario con bacteria láctica probiótica de la invención como se describió anteriormente,
- colocar el producto alimentario inoculado bajo condiciones favorables para el metabolismo de dicha bacteria láctica probiótica,
- 50 - fermentar dicho producto alimentario hasta que se alcance una población de al menos $[10^6]$ CFU/ml en el producto alimentario.

En otra realización, el proceso de fabricación de una composición alimentaria o una composición de bebida contiene al menos las etapas de:

- fermentar bacteria láctica probiótica como se describió anteriormente hasta que se alcance una población de al menos $[10^6]$ CFU/ml,
- 5 - proteger dicha bacteria láctica probiótica, por ejemplo por envolvimiento,
- mezclar un producto alimentario con dicha bacteria láctica probiótica protegida.

La fermentación se para cuando se alcanza la fase estacionaria de fermentación, preferentemente en aproximadamente 24 horas de haber colocado dicha bacteria láctica probiótica bajo condiciones favorables para su metabolismo.

- 10 Otra realización de la invención propone el uso de bacteria láctica probiótica en la preparación de una composición para tratar un trastorno asociado con la colonización de las membranas mucosas por microorganismos patógenos. Las membranas mucosas incluyen, pero no son limitantes, la mucosa de intestino, la mucosa de estómago. Por ejemplo, los microorganismos patogénicos pueden ser enteropatógenos. Por ejemplo, la actividad inhibitoria de cepas de *Lactobacillus* según la invención, podría ser contra: enteropatógenos (por ejemplo *Salmonella enteritidis*,
- 15 *Vibrio Choleraeae*, *Escherichia coli*).

Otra realización de la invención propone el uso de bacteria láctica probiótica para proteger productos alimentarios fermentados contra patógenos alimentarios, tales como *Lysteria* o *Salmonella*, *Campylobacter* o *Clostridium*, inhibiendo el desarrollo de tales patógenos alimentarios.

- 20 Otra realización de la invención propone el uso de bacteria láctica probiótica de la invención como se definió anteriormente para producir ácido butírico durante la fermentación haciendo uso de tal bacteria.

Otra realización de la invención proporciona un método para producir ácido butírico que comprende las etapas de fermentar bacteria láctica probiótica de la invención bajo condiciones adecuadas y recolectar el ácido butírico producido durante la fermentación de dicha bacteria.

- 25 Estos y otros aspectos, características y ventajas de la invención se harán aparentes para los expertos en la técnica al leer la descripción proporcionada en la presente memoria junto con los dibujos adjuntos. La descripción detallada, mientras que se indican realizaciones preferentes de la invención, solo se da a modo de ilustración.

Breve descripción de los dibujos.

La figura 1 muestra la evolución del pH durante 24 h de incubación de clones de la invención y cepas de referencia en leche de burra.

- 30 La figura 2 muestra una huella genética de 8 clones aislados a partir de leche de burra cruda.

Las figuras 3a a 3e muestran los electroferogramas de clones 37, 38, 41, 43 y 48, respectivamente, tras el análisis de la huella genética.

La figura 4 muestra el resultado de hibridación ADN-ADN entre clones 37, 38 y 48, usando ADN de *L. plantarum* marcado con digoxigenina-dUTP como una sonda.

- 35 La figura 5 muestra el resultado de hibridación ADN-ADN entre clones 37, 38, y 48 donde el ADN-ADN hibridizado con ADN de cepas tipo *L. plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. pentosus*, en una sonda marcada con ADN del clon 37.

Descripción detallada

- 40 Durante las pasadas décadas, el papel de los probióticos sobre la salud humana ganó gran relevancia tanto a nivel científico como industrial, causando un incremento sensible en la demanda del mercado, así como una mayor producción y consumo de productos. En el aspecto de viabilidad es de mucha importancia que las cepas probióticas tengan la capacidad de vencer el pH extremadamente bajo del ácido gástrico y el efecto detergente de las sales biliares y de llegar a un estado fisiológico viable en el lugar de acción: el epitelio intestinal. Las bacterias probióticas son capaces de colonizar el colon, para afectar positivamente el resultado de las infecciones de bacteria patógena, para estimular el sistema y disminuir la concentración desfavorable de metabolitos. Además, algunas cepas, estando
- 45 incluidas las bacterias de la invención, pueden proporcionar cierta reducción de colesterol y concentraciones de triaglicerol del plasma.

- 50 Durante el paso por el tracto gastrointestinal (GI), se requieren cultivos probióticos para tolerar la presencia de pepsina y el pH bajo en el estómago, las condiciones ricas en proteasas en el duodeno, y la actividad antimicrobiana de las sales biliares. Aunque el pH del estómago puede incrementar hasta 6,0 o más alto después de la toma de alimento, generalmente está en el intervalo de 2,5 a 3,5. Después del paso por el estómago, el intestino delgado es la segunda gran barrera del tracto GI. Aunque el pH del intestino delgado (es decir, 7,0 a 8,5) es más favorable para

la supervivencia de las bacterias, la presencia de sales biliares puede tener efectos adversos. Tradicionalmente, la capacidad de un candidato probiótico a sobrevivir al tránsito GI se valora usando técnicas convencionales de plaqueo que proporcionan información del número de células viables y reproductivas durante la incubación en jugos GI simulados como se describe por ejemplo en un artículo de Charteris et al. "Development of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper gastrointestinal tract" J. Appl. Microbiol. 84: 759-768 (1998).

Por lo tanto, para caracterizar organismos probióticos se pueden usar varios métodos basados de cultivo, tal como resistencia a jugos gástricos, resistencia a sales biliares, capacidad de hidrolizar sales biliares, evaluación de hidrofobicidad, actividad antimicrobiana, sensibilidad a antibióticos. Estas pruebas se describen completamente en los ejemplos de la sección ejemplos siguiente.

En una realización de la invención, la bacteria probiótica cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- al menos 75% CFU/ml se retienen después de resistir a la evaluación de jugo gástrico como se describe en la presente memoria,
- al menos 75% CFU/ml se retienen después de resistir a la evaluación de sales biliares como se describe en la presente memoria,
- una agregación microbiana visible en un portaobjetos de microscopio con sulfato amónico 0,5 M o menos, preferentemente con sulfato amónico 0,1 M o menos, en la prueba de hidrofobicidad como se describe en la presente memoria,
- una actividad antimicrobiana baja frente a otros Lactobacillus spp, según se mide por la prueba de halo, es decir, un halo menor de 0,5 cm, preferentemente menor de 0,2 cm como se describe en la presente memoria,
- una actividad inhibitoria frente a Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus, o Escherichia coli, como se mide por el método de halo, es decir, un halo mayor de 0,5 cm, preferentemente mayor de 0,8 cm como se describe en la presente memoria.

Los clones 37, 38, 48, 43, 41, 32, 34 y 57 representan realizaciones específicas de la invención. Se han depositado el 8 de diciembre, 2008 (para clones 37, 38, 48, 43, 41) y en el 26 de abril, 2010 (para clones 32, 34, 57) con el "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DSMZ) en conformidad con el Tratado de Budapest, bajo el número de acceso:

Clon 37	DSM 22098
Clon 38	DSM 22099
Clon 48	DSM 22100
Clon 43	DSM 22102
Clon 41	DSM 22101
Clon 32	DSM 23558
Clon 34	DSM 23559
Clon 57	DSM 23560

Los clones 37, 38 y 48 pertenecen a las subespecies Lactobacillus plantarum asini y los clones 43, 32, 34, 57 y 41 pertenecen a las especies Lactobacillus asini. Más particularmente, el clon 32 pertenece a una subespecie llamada Lactobacillus asini spp. butyricus, el clon 34 pertenece a una subespecie llamada Lactobacillus asini spp. lactis, y el clon 57 pertenece a una subespecie llamada Lactobacillus asini spp. caudatus.

Dicha bacteria probiótica se puede proporcionar como un cultivo fresco o como complemento alimentario seco, tal como un complemento de dieta. En el último caso, la biomasa puede ser liofilizada o secada por pulverizado, para proporcionar un cultivo en polvo de alta calidad, que comprende por ejemplo al menos 10^8 CFU/g, preferentemente 10^9 CFU/g.

Según la invención, se puede usar bacteria probiótica en la preparación de productos alimentarios o bebidas, para consumo humano o animal. Los productos alimentarios o bebidas incluyen productos alimentarios fermentados, tales como productos lácteos frescos, leches fermentadas, yogures. Leche normalmente se refiere a leche de vaca. En el contexto de la invención, puede ser preferente leche de burra, aunque también se pueden usar otras leches para preparar productos lácteos, leche de yegua, leche de cabra, leche de camella, leche de oveja.

Los métodos para preparar tales productos lácteos fermentados están al alcance de personas con habilidades normales en la técnica. Preferentemente, la bacteria probiótica se proporciona o mantiene en una forma viable hasta el consumo. La leche se puede usar fresca, o en polvo y reconstituida con agua. Se pueden añadir diversos ingredientes a la leche, para mejorar la fermentación, o para proporcionar beneficios de salud adicionales al consumidor (tal como adición de vitaminas o minerales).

Después de la fermentación, la leche se puede transformar en queso cottage o quark, añadiendo cuajo a la leche fermentada por ejemplo. Tales procedimientos son muy conocidos por el experto en la técnica.

En otra realización, la bacteria probiótica se usa como un ingrediente en una composición alimentaria o de bebida, sin fermentación de dicha composición. En otras palabras, dicha bacteria prebiótica es un complemento dietético o nutricional. En este caso, es preferente que la bacteria probiótica se proporcione en una forma viable.

La bacteria láctica probiótica según la presente invención también se puede usar para proteger productos alimentarios tales como productos alimentarios fermentados, frente a patógenos alimentarios, tales como *Lysteria* o *Salmonella*, *Campylobacter* o *Clostridium*, inhibiendo el desarrollo de tales patógenos alimentarios. En ese caso, se mezcla una composición que comprende la bacteria probiótica deseada, como se describe en la presente memoria, con un producto alimentario o de bebida. El último producto se puede fermentar independientemente de la composición que comprende la bacteria probiótica deseada. En cualquier caso, es preferente que la fermentación dure no más de aproximadamente 24 horas. Normalmente, las cepas probióticas han alcanzado la fase estacionaria de la fermentación en este periodo de tiempo.

En una realización de la invención, la fermentación se para cuando ha alcanzado la fase estacionaria de fermentación, preferentemente en aproximadamente 24 horas de haber realizado la inoculación del producto alimentario bajo condiciones favorables del metabolismo de dicha bacteria láctica probiótica.

La invención también se refiere al uso de bacteria láctica probiótica en la preparación de una composición para tratar un trastorno asociado con la colonización de las membranas mucosas por microorganismos patógenos. Las membranas mucosas incluyen, pero no son limitantes a la mucosa de intestino y la mucosa del estómago. Por ejemplo, los microorganismos patógenos pueden ser enteropatógenos. Por ejemplo, la actividad inhibitoria de cepas de *Lactobacillus* según la invención, podrían ser contra: enteropatógenos (por ejemplo *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*). Esto está asociado con la capacidad de las bacterias probióticas de adherirse a las células del epitelium, tal como células del intestino y, actualmente se comprende, que excluyen hasta un cierto grado, tales bacterias patógenas del intestino. Por el contrario, esto podría estar correlacionado con la hidrofobicidad de la bacteria probiótica.

La invención también se refiere al uso de bacteria láctica probiótica de la invención para producir ácido butírico durante la fermentación haciendo uso de tal bacteria, por ejemplo la fermentación del alimento en el que se ha inoculado tal bacteria, y después es ingerido por el usuario, la fermentación interna en el colon o la fermentación de un medio apropiado en condiciones apropiadas, permitiendo recoger el ácido butírico producido durante la fermentación por dicha bacteria. Bacterias preferentes son DSM 23558, DSM 22098, DSM 22100, y DSM 22099.

Ejemplos

Métodos basados en cultivos (pruebas probióticas, capacidad de hidrolizar sales biliares, evaluación de hidrofobicidad, actividad antimicrobiana, sensibilidad antibiótica, producción de ácidos orgánicos, evolución del pH durante la incubación).

Leche cruda de burra obtenida de crianza orgánica se diluyó en series en una disolución fisiológica estéril (CINa 0,85%) y se inoculó en platos de agar MRS (Man, de Rogosa and Sharpe) específicos para aislar género *Lactobacillus*. Los platos se incubaron en condiciones anaeróbicas (Anaerogen, Oxoid) durante 48 horas a diferentes temperaturas. Las bacterias ácido lácticas aisladas (aproximadamente 150) se seleccionaron aleatoriamente de los platos de agar MRS de las diluciones más altas. Los aislados se subcultivaron en caldo MRS y se estiraron sobre agar MRS.

Pruebas de probióticidad.

1) Resistencia a jugos gástricos.

Tras el crecimiento, cada colonia se centrifugó, se lavó en disolución fisiológica, y se redisolvió al volumen original con la misma disolución. La evaluación de resistencia a jugo gástrico se ensayó según De Giulio et al "Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying" *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21:739-746(2005), con algunas modificaciones. Se incubaron alícuotas en un jugo gástrico simulado (pepsina 3 g/l, pH 2,5), retirando a diferentes tiempos de incubación, hasta 180 minutos, y se puso en placa. Células sin tratar se usaron como un control negativo y se inocularon. La resistencia al jugo gástrico se evaluó mediante unidades formadoras de colonias (CFU/ml) y se comparó con el control negativo.

2) Resistencia a sales gástricas y biliares.

Las colonias que eran resistentes a jugos gástricos se incubaron durante un máximo de 3 h en un jugo biliar simulado, compuesto por MRS que contenía 0,3% de sales biliares, después se inocularon en platos de agar MRS, según De Giulio et al (2005). Las colonias sin tratar se usaron como un control negativo. La resistencia a sales biliares se evaluó mediante unidades formadoras de colonias (CFU/ml) y se comparó con el control negativo.

Resultados.

Entre 150 colonias de bacterias aisladas de leche cruda de burra, sólo 8 se identificaron pertenecientes a género *Lactobacillus* (llamadas provisionalmente Clon 32, Clon 34, Clon 37, Clon 38, Clon 41, Clon 43, Clon 48, y Clon 57), exhibiendo resistencia a jugos gástricos y sales biliares y mostraron aproximadamente 75% de CFU/ml formados en comparación con el control sin tratar puesto como 100%. Su temperatura de crecimiento óptima era aproximadamente 30 a 31°C. Sólo 8 de las 150 colonias exhibieron una buena resistencia a la presencia de jugo gástrico y sales biliares simuladas. Estas colonias se estudiaron después para las siguientes actividades: prueba de hidrofobicidad, filtración de cultivos para actividad hidrolizante de sales biliares, actividad microbiana y sensibilidad a antibióticos.

3) Prueba de hidrofobicidad.

Se evaluó la capacidad de las colonias de adherirse potencialmente al epitelio intestinal usando el método indirecto de hidrofobicidad de Strus et al "The in Vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiótica properties against *Candida*" *Infectious Diseases in obstetrics and Gynaecology*, 13(2): 69-75 (2005) y Ljungh et al "High surface hydrophobicity of autoaggregating *Staphylococcus aureus* strains isolates from human infections studied with the SALT aggregation test" *Infection and Immunity*, 47: 522-526 (1985). Las colonias crecieron en caldo MRS durante 24 horas. Se mezclaron suspensiones microbianas con volúmenes iguales de sulfato amonio, previamente preparado con molaridades diferentes (en el intervalo de 20 mM a 4 M). La concentración más pequeña de sulfato amónico capaz de causar agregación microbiana visible en una placa de microscopio estaba inversamente relacionada con la prueba de agregación de sal. Se usó una disolución isotónica como un control.

Resultados.

- agregación visible con sulfato amonio 0,1 M: clones 32, 37, 43 y 57.
- agregación visible con sulfato amonio 0,5 M: clones 34, 38, 41 y 48.

De estos datos, se puede suponer una capacidad de adhesión in vitro al epitelio intestinal más fuerte para los clones 32, 37, 43 y 57.

4) Filtración de cultivos para actividad hidrolizante de sales biliares.

La hidrólisis de sal biliar es una reacción metabólica importante en el mecanismo de sal biliar de mamíferos. En los últimos años ha incrementado el interés de usar hidrólisis de sal biliar para influenciar el metabolismo del colesterol de humanos y animales. La hidrolización de sales biliares y la incorporación de colesterol en la membrana celular tiene el potencial de bajar la concentración de colesterol del suero en humanos. La liberación de sales biliares libres a través de la hidrolización de sales biliares conjugadas en el intestino delgado da como resultado la excreción de más sales biliares en las heces. El principal medio por el que se elimina el colesterol del cuerpo es por excreción en la forma de sales biliares hidrolizadas. La mayoría de las sales biliares conjugadas se recirculan a través de circulación hepática entérica. Las sales biliares que se excretan pueden ser sustituidas por nuevos ácidos biliares, que se forman a partir del colesterol en el cuerpo. Así, cuanto más sales biliares son excretadas, más colesterol se utiliza de los depósitos del cuerpo. Además, las sales biliares libres no soportan la absorción de colesterol y otros lípidos del intestino delgado así como sales biliares conjugadas.

La actividad hidrolizante de las sales biliares de las colonias se evaluó cuantitativamente siguiendo el método de control descrito por Minelli et al "Assessment of novel probiótica *Lactobacillus casei* strains for the production of functional Dairy foods" *In. Dairy J.*, 14: 723-726 (2004). Brevemente, durante la noche se punteó los cultivos líquidos de cepas (5 µL) sobre agar MRS que contenía 0,5% de mezcla de sal biliar conjugada y 0.37 g/L de CaCl₂, y se incubó como se describió anteriormente. La presencia de ácido biliar precipitado alrededor de los puntos (halo opaco) se consideró un resultado positivo, mostrando la capacidad de las cepas de hidrolizar sales biliares.

Resultados.

La capacidad de hidrolizar extractos biliares se evaluó cualitativamente. Todas las cepas fueron capaces de hidrolizar extractos biliares.

5) Actividad antimicrobiana.

El ensayo de la prueba de inhibición de halo sobre placa de agar de empleó para investigar la actividad antimicrobiana de las cepas microbianas. Se probaron muestras contra las siguientes bacterias:

ES 2 562 702 T3

- cepas no patógenas: *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, *Lactobacillus casei* ATCC 9595, *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081, *Lactobacillus sakei* DSM 20494, *Lactobacillus rhamnosus* DSM 20711;
 - cepas patógenas Gram positiva: *Lactobacillus cereus* GN 101, DSM 4313 y DSM 4384, y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- 5 - Cepas patógenas Gram negativa: *Escherichia coli* (DSM 8579) y *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071).

10 Todas las cepas se adquirieron de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Alemania). Cada cepa se incubó a 37°C durante 18 h en su medio de crecimiento específico: la bacteria ácido láctica creció en caldo Man de Rogosa Sharpe (MRS) (Oxoid), *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *B. cereus* en Nutrient Broth (Oxoid). Las suspensiones microbianas (1×10^8 CFU/ml) se pulverizaron uniformemente sobre las placas de medio sólido específico. Se colocaron 50 µl de cada cultivo individualmente sobre las placas inoculadas. Después de permanecer 30 minutos bajo condiciones estériles a temperatura ambiente, las placas se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas, dependiendo de la cepa. El diámetro de la zona clara que mostraban las placas se midió con precisión y su actividad microbiana se expresó en cm. Se usó agua desionizada estéril como un control negativo; el agente antimicrobiano estándar, cloranfenicol, se usó como un positivo según Dall'Agnol et al "Antimicrobial activity of some *Hypericum* species" *Phytomedicine* 10: 5 1 1-5 16. (2003).

Resultados.

a) Actividad antimicrobiana frente a otros *Lactobacillus* spp.

Los clones no exhibían actividad antimicrobiana frente a *Lactobacillus sakei* 20494 (excepto el clon 57 a un grado muy bajo).

- 20 - los clones 37, 38 y 48 exhibían una actividad inhibitoria baja frente a *Lactobacillus casei* ATCC 9595, *L. bulgaricus* ATCC 11842, *L. fermentum* DSM 20052, *L. rhamnosus* DSM 2071 1
- el clon 41 exhibía una actividad inhibitoria baja frente a *L. fermentum* DSM 20052, *L. rhamnosus* DSM 2071 1, *L. acidophilus* DSM 20079
- 25 - el clon 43 exhibía una actividad inhibitoria baja frente a *L. fermentum* DSM 20052 y *L. acidophilus* DSM 20079.

Este resultado se puede considerar usual, debido a la producción por parte de todas las bacterias ácido lácticas de sustancias antimicrobianas, como bactericidas, que pueden actuar no solo contra bacterias patógenas, también como "mecanismo de defensa territorial" frente a otros *Lactobacilli*.

b) Actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas.

30 Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

	32	34	37	38	41	43	48	57
<i>B. cereus</i> GN 101	ND	ND	OX	OX	OX	ND	OX	ND
<i>B. cereus</i> DSM 4313	X	X	X	X	ND	ND	X	X
<i>B. cereus</i> DSM 4384	ND	ND	OX	OX	ND	OX	OX	ND
Ent. Faecalis ATCC 29212	ND	ND	XX	XX	XX	XX	XX	ND
<i>E. coli</i> HB101	ND	X	X	X	ND	ND	X	ND
<i>E. coli</i> DSM 8579	ND	ND	X	X	ND	ND	X	OX
<i>Ps. aeruginosa</i> DSM 50071	ND	ND	XXX	X	XX	ND	X	ND

ES 2 562 702 T3

Leyenda:

ND no detectable

OX actividad inhibitoria baja (halo: < 5mm)

X actividad inhibitoria media (halo: 6-8 mm)

5 XX actividad inhibitoria discreta (halo de 8 a 10 mm)

XXX actividad inhibitoria fuerte (halo > 10mm)

Es interesante observar la fuerte actividad antimicrobiana exhibida por el clon 37 frente a *Ps. Aeruginosa*. Los clones 37, 38 y 48 exhibían una cierta actividad antimicrobiana frente a la cepa toxicogénica *E coli* DSM 8579.

6) Sensibilidad a antibiótico.

10 Se evaluó la sensibilidad de las colonias a diferentes antibióticos usando de 30 mg a 40 mg de los siguientes antibióticos:

- ampicilina, y amoxicilina como inhibidor de síntesis de la pared celular;
- sulfato de gentamicina, lincomicina, sulfato de estreptomina, tetraciclina, cloramfenicol y espiramicina como inhibidores de síntesis de proteínas;

15 - rifamixina como inhibidor de síntesis de ácidos nucleicos.

Cada uno de los antibióticos en polvo se pesó cuidadosamente, disolvió, diluyó en diluentes apropiados y se esterilizó por filtrado antes de la adición al medio MRS.

Las placas se inocularon con cepas LAB, y se incubaron como se describió anteriormente. Se evaluó la sensibilidad o resistencia a antibióticos mediante la prueba de inhibición de halo.

20 Resultados.

Los clones exhibieron un grado variable de sensibilidad a los antibióticos usados en la prueba. Como se muestra en la tabla siguiente, el clon 32 era sensible a todos los antibióticos; por otro lado, los otros clones eran más o menos resistentes frente a estreptomina y lincomicina.

Clon	Sensibilidad a antibiótico
32	Sensible a todos los antibióticos probados
34	Sensible a todos los antibióticos probados Resistente frente a estreptomina Baja resistencia frente a lincomicina
37	Sensible a todos los antibióticos probados Baja resistencia frente a estreptomina y lincomicina
38	Sensible a todos los antibióticos probados Resistente frente a estreptomina y lincomicina
41	Sensible a todos los antibióticos probados Resistente frente a estreptomina Baja resistencia frente a lincomicina
43	Sensible a todos los antibióticos probados Resistente frente a estreptomina Baja resistencia frente a lincomicina

Clon	Sensibilidad a antibiótico
48	Sensible a todos los antibióticos probados Resistente frente a estreptomina Baja resistencia frente a lincomicina
57	Sensible a todos los antibióticos probados Resistente frente a estreptomina Baja resistencia frente a lincomicina

7) Producción de ácidos orgánicos.

5 Se determinó la producción de ácidos orgánicos después de la fermentación mediante cromatografía líquida de alta resolución del sobrenadante filtrado (Vulevic, Rastall & Gibson, 2004; Nazzaro et al. 2009), usando un aparato Gold System equipado con un detector ultravioleta (Beckman, CA, USA). Las muestras se cargaron en una columna pre-ensvasada Aminex HPX-87 (300 7,8 mm, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se eluyó con 0,005 mM de ácido sulfúrico. El tiempo total de la prueba fue 40 minutos; la velocidad de flujo era 0,6 mm/min; el volumen de inyección era 20 µl; y la longitud de onda de detección era 210 nm.

Resultados.

10 En las siguientes tablas se informa la cantidad de ácido butírico y ácido cítrico producido durante la fermentación por cepas de la invención y algunas cepas de referencia, que crecen en leche de burra. Los datos se expresan en término de área absoluta (mm²):

Cepa	Cantidad de ácido butírico
Lactobacillus acidófilus (comp.)	26,21
Latobacillus plantarum (comp.)	21,5
Lactobacillus fermentum (comp.)	33,56
Clon 32 (inv.)	60,3
Clon 37 (inv.)	65,41
Clon 38 (inv.)	42,91
Clon 48 (inv.)	60,37

Cepa	Cantidad de ácido cítrico
Lactobacillus acidófilus (comp.)	51,37
Latobacillus plantarum (comp.)	2,95
Lactobacillus fermentum (comp.)	57,97
Clon 32 (inv.)	65,81
Clon 37 (inv.)	82,1
Clon 38 (inv.)	83,11
Clon 41 (inv.)	76,2
Clon 43 (inv.)	79,98
Clon 48 (inv.)	85,71

15 La producción de ácido butírico se podría hacer externamente mediante alimentos fermentados en los que se ha inoculado la bacteria de la invención, siendo tal alimento ingerido por el usuario para incrementar el ácido butírico en el sistema digestivo.

El ácido butírico es un ácido graso de cadena corta que también se puede producir a partir de la fermentación de la bacteria en el colon, y alcanza de 60% a 70% de las necesidades de energía de las células epiteliales del colon. Además, el ácido butírico estimula la regeneración del epitelio del colon, yeyuno, íleon, e inhibe el crecimiento microbiano en el colon. Un metabolismo pobre en ácido butírico por el epitelio puede causar inflamación ulcerativa del colon.

5 La tabla muestra que las cepas de la invención son capaces de producir una cantidad más alta de ácido butírico que las cepas de referencia. Por lo tanto, las cepas de la invención permiten estimular la barrera intestinal y fortalecer el sistema inmune.

10 El ácido cítrico se usa como un conservante natural en alimentos y bebidas. La tabla muestra que las cepas de la invención son capaces de producir una cantidad más alta de ácido cítrico que las cepas de referencia. Por lo tanto, permiten mejorar las propiedades de almacenamiento de la composición que comprende las cepas de la invención.

8) Evolución del pH durante la incubación.

15 Se probó el crecimiento microbiano en leche de burra. Se obtuvo leche de burra, en forma secada por pulverizado, de la granja Eurolactis. La leche se resuspendió en agua desionizada estéril (proporción 100 g + 600 ml de agua). Se inoculó 42 ml de tal suspensión con 0,840 ml de un cultivo microbiano del aislado (2% inóculo, absorbancia inicial a $\lambda_{600\text{ nm}} = 1$). Las muestras se incubaron a 30°C.

La leche de burra se inoculó en las mismas condiciones con *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* y cepas tipo *Lactobacillus pentosus*, mientras que se utilizó una temperatura de 37°C para *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus rhamnosus*.

20 Se evaluó la capacidad de crecer en leche de burra y la capacidad fermentativa de cepas mediante conteo de colonias formadoras de unidades (CFU) / ml de células microbianas (determinado mediante cultivo anaeróbico sobre agar MRS después de 3, 6 y 24 horas de incubación) y mediante medición del pH resultante, respectivamente.

Resultados.

El valor de pH inicial era 7,14.

25 La figura 1 muestra el decrecimiento del pH durante 24 horas de incubación de clones de la invención y cepas de referencia en leche de burra. La referencia A designa el grupo de las cepas diferentes de la invención. Las referencias B a F corresponden respectivamente a *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, y *L. plantarum*.

30 La figura 1 muestra que las cepas de referencia exhibían una capacidad fermentativa más ácida, comparado con los clones de la invención. La palatabilidad del producto está negativamente afectada por pH bajo. Por lo tanto, los clones de la invención permiten conservar la palatabilidad de las composiciones que comprenden tales clones.

Enfoques fenotípicos y genotípicos (metabolismo de azúcares, huella de ADN, hibridación DNA-DNA, comparación de secuencia 16 S ARN)

9) Metabolismo de azúcares.

35 Se identificaron aislados del nivel de especies usando el sistema de identificación API 50 CHL (BioMérieux) de la fermentación de hidratos de carbono. El medio API 50 CHL, dirigido a la identificación del género *Lactobacillus* y organismos relacionados, es un medio instantáneo que permite la fermentación de 49 hidratos de carbono sobre la tira API 50 CH a estudiar. Se hace una suspensión en el medio con los microorganismos a probar y cada tubo de la tira se inocula. Durante la incubación, los hidratos de carbono fermentan a ácidos que producen una disminución del pH, detectado por el cambio de color del indicador. Los resultados construyen el perfil bioquímico de la cepa y se usan para su identificación o tipificación. Las cepas probióticas supuestas se inocularon en tiras API 50 CHL y se llevó a cabo evaluación de los cambios de color después de 24 y 48 horas de incubación a 37°C.

Cada tira estaba compuesta como se muestra en la tabla siguiente. Los resultados se analizaron usando un software API BioMérieux.

Tira 0-9	Tira 10-19	Tira 20-29
Tubo / sustrato	Tubo / sustrato	Tubo / sustrato
0 CONTROL	10 GALactosa	20 α -metil-D-Manosido
1 GLYcerol	11 GLUcosa	21 α -metil-D-Glucosido
2 ERYtritol	12 FRUctosa	22 N-acetil-glucosamina

ES 2 562 702 T3

3 D Arabinosa	13 MaNosA	23 AMIgdalina
4 L Arabinosa	14 SorBosA	24 ARButina
5 RIBosa	15 RHAMnosa	25 ESCulina
6 D Xilosa	16 DULcitol	26 SALicina
7 L Xilosa	17 INOsitol	27 CELobiosido
8 ADONitol	18 MANitol	28 MALtosa
9 β-metil-D-xilosido	19 SORbitol	29 LACtosa
Tira 30-39	Tira 40-49	
Tubo /sustrato	Tubo / sustrato	
30 MELibiosa	40 D TURanosa	
31 Sacarosa	41 D LYXosa	
32 TREhalosa	42 D TAGatosa	
33 INULina	43 D FUCosa	
34 MeLeZitosa	44 L FUCosa	
35 RAFinosa	45 D ARabitol	
36 Almidón	46 L ARabitol	
37 GLYcoGen	47 GlucoNaTo	
38 XiLiToI	48 2-Keto-Gluconato	
39 GENtobiosa	49 5-Keto-Gluconato	

Resultados de la prueba de fermentación (API)

Clon 32: discriminación insuficiente

Clon 34: discriminación insuficiente

Clon 37: identificación excelente con *Lactobacillus plantarum* 99,5 %

5 Clon 38: identificación dudosa

Clon 41: identificación dudosa preliminar

Clon 43: identificación dudosa preliminar

Clon 48: identificación excelente con *Lactobacillus plantarum* 99,5%

Clon 57: discriminación insuficiente

10 Enfoque genético.

Se aplicaron las siguientes tecnologías para la identificación molecular: huella del ADN, hibridación ADN-ADN y secuenciación 16 S ARN.

10) Huella del ADN.

15 Se usó el ensayo de ADN-PCR polimórfico amplificado al azar (RAPD-PCR) para producir diseños de huellas según Ronimus et al (1997). La amplificación de ADN se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 50 µL PCR que contenía: 50-200 ng de ADN genómico, tampón 1X PCR (proporcionado como componente del kit ADN polimerasa), 3 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs, 0,5 µM de OPR-2 iniciador (5'-CACAGCTGCC-3', secuencia SEQ ID N°: 1) o OPR-13 iniciador (5'-ggacgacaag-3', secuencia ID N°: 2) y 2,5 unidades de Platinum® Taq ADN polimerasa (INVITROGEN). Las mezclas se amplificaron en un termociclo iCycler® (BIO RAD). El perfil de amplificación consistía en una desnaturalización inicial de 2 min a 92°C y 35 ciclos de 15 segundos a 94°C, templando durante 15 segundos a 36°C

20 (previamente optimizado mediante amplificación por gradiente de temperatura) y elongación durante 2 minutos a

72°C. Se llevó a cabo una extensión final de 7 minutos a 72°C. Se hizo electroforesis de 10-20 µL de productos PCR sobre microchip ADN 7500 (Agilent) usando un Bioanalyzer 2100 equipado con un software EXPERT 2100 (Agilent).

Resultados.

5 Después de las pruebas API siguieron estudios genotípicos. El análisis de huellas de ADN (figura 2) muestra que los clones 37, 38 y 48 parecían pertenecer a la misma especie. En las figuras 3a a 3e, se proporcionan los electroferogramas relativos a los clones 37, 38, 41, 43 y 48.

11) Comparación de secuencia 16 S ARN.

10 Se extrajo ARN total mediante el kit RiboPure-Bacteria (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se disolvió el ARN en disolución de almacén de ARN (Ambion), UV-cuantificado mediante un Bio-Photometer® (Eppendorf) y se almacenó a -80°C. Alícuotas de ARN (6 µg) se digirieron por RNase-free DNase I (kit Ambion DNA-free™) en una mezcla de reacción de volumen final de 20 µL, para eliminar ADN genómico que contamina. Después de la digestión de ADNasa, se evaluó concentración y pureza de muestras de ARN mediante ensayo de microchip RNA-6000-Nano®, usando un Bioanalyzer 2100 equipado con un software EXPERT 2100 (Agilent), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para todas las muestras probadas el número de integridad del ARN (RIN) 15 era mayor de 7 (en relación a una escala 0-10) se hizo transcripción inversa en una mezcla de reacción de 20 µL. Una mezcla que contenía 3 µg de ARN total, según se evaluó mediante Bioanalyzer 2100, 2 pmoles de iniciador directo 1517R (véase anteriormente), 2 mM dNTPs en un volumen total de 10 µL, se incubó durante 2 minutos a 70°C y se enfrió rápidamente a 40°C. A la mezcla se añadió 10 µL que contenía 2x de un tampón adecuado (Invitrogen) 20 mM ditiotreitól, 20 unidades de inhibidor ARNasa (Invitrogen), y 200 unidades de MoMuLV 20 Superscript® III transcriptasa inversa (Invitrogen). La mezcla de reacción (volumen final 20 µL) se incubó a 55°C durante 60 minutos y a 70°C durante 15 minutos para parar la reacción y para degradación de ARN. Se llevó a cabo 25 amplificación de 16S cDNA mediante un iCycler-iQ5® en una mezcla de reacción de 50 µL que contenía: 1x de un tampón adecuado (Invitrogen), 200 pM dNTPs, 300 nM de 16S bacterial iniciador general diseñado en E. coli 16S ARN secuencia de acceso (8-directo y 1517-inverso). El perfil de amplificación consistía en una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, 25 ciclos de 30 segundos y elongación final de 7 minutos a 72°C. Se hizo electroforesis de 5 µL de productos PCR sobre 1% de gel agarosa (Agarosa – 1000, Invitrogen) en 1x tampón TAE a 5 V/cm durante 4 h. Se incluyó bromuro de etidio (0,1 µg/mL) tanto en el gel como en el tampón de electroforesis y se detectaron productos PCR por visualización UV y se anotaron sobre películas Polapan 55 (Polaroid). Se secó por 30 aireación 100-150 µL de cada mezcla amplificada y se envió a MWG (Ebersberg – Alemania), para secuenciación. La secuenciación se llevó a cabo usando los iniciadores 8F, 1517R y por el indicador interno 368 F, diseñado en base a los primeros datos de secuencia. El conteo de secuencia se llevó a cabo por el software DNA-Baser versión 2.0 utilizando los archivos de secuencia “.scf”. Las secuencias generadas “.fasta” (aproximadamente 1.400 bases de longitud) se alinearon a NCB1-BLAST un banco de datos “Ribosome Data Base Project) – RDP.

Resultados.

35 Se extrajo y se retro-transcribió ARN ribosomal. El cADN obtenido se amplificó y secuenció como se describió anteriormente. El conteo de secuencia de aproximadamente 1.400 bases se obtuvo y se comparó en los bancos de datos. A continuación se da una síntesis de comparación de secuencias en Ribosomal Database Project (RDP). Emerge un cuadro que incluye nuestros clones en un grupo muy ajustado de especies L. plantarum, paraplantarum y 40 pentosus que presentan (cepas tipo) un identificador 16 S RNA mayor de 99,9%. Los resultados que se dan a continuación son porcentajes de identificadores 16 S RNA de los clones de la invención comparado con esas especies.

Clon 41.

Bacteria dominio (20) (secuencias coincidentes)

phylum Firmicutes (20) clase “Bacilli” (20) orden “Lactobacillales” (20)

45 Familia Lactobacillaceae (20) género Lactobacillus (20)

0,994 1.400 L. paraplantarum (T); DSM 10667T; A5306297

0,979 1405 L. plantarum (T); JCM 1 149; D792 10

0,984 1410 L. pentosus (T); JCM 1558; D79211

Clon 43.

50 Bacteria dominio (20) (secuencias coincidentes)

phylum Firmicutes (20) clase “Bacilli” (20) orden “Lactobacillales” (20)

Familia Lactobacillaceae (20) género Lactobacillus (20)

1.400 L. paraplantarum (T); DSM 10667T; AJ306297

0,985 1405 L. plantarum (T); JCM 1 149; D792 10

0,990 1410 L. pentosus (T); JCM 1558; D79211

Clon 48.

5 Bacteria dominio (20) (secuencias coincidentes)

phylum Firmicutes (20) clase "Bacilli" (20) orden "Lactobacillales" (20)

Familia Lactobacillaceae (20) género Lactobacillus (20)

1000 L. plantarum (T); JCM 1 149; D792 10

Clon 57.

10 Bacteria dominio (0/20/5164) (secuencias RDP seleccionadas/coincidentes/total)

phylum Firmicutes (0/20/1178) clase "Bacilli" (0/20/697) orden "Lactobacillales" (0/20/289)

Familia Lactobacillaceae (0/20/114) género Lactobacillus (0/20/104)

0,987 1.400 L. paraplantarum (T); DSM 10667T; A5306297

0,990 1405 L. plantarum (T); JCM 1149; D79210

15 0,994 1410 L. pentosus (T); JCM 1558; D79211

12) Hibridación ADN-ADN.

20 Para hibridación ADN-ADN cuantitativa y cálculo del porcentaje de homología el ADN se extrajo y purificó a partir de cultivo de células bacterianas (aproximadamente 250 mg de pelet seco por cada cepa) usando el set Genomic-DNA-Buffer y columnas Genomic-tip-100/G (QIAGEN SPA, Milán, Italia), según las instrucciones del fabricante con modificaciones menores. El ADN se disolvió en tampón TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA) y se hicieron diluciones en serie hasta una concentración final (WS) de 50 µg/ml, según se evaluó mediante absorbancia UV usando un Bio-Photometer (Eppendorf, Alemania). La concentración ADN WS se confirmó mediante medición fluorimétrica usando el kit de pruebas Quant-iT ADN (INVITROGEN, Milán, Italia); el tamaño del ADN se estimó mediante electroforesis 0,8% agarosa de grado ADN (BIO-RAD) usando ADN como marcador de peso molecular (tamaño del ADN 25 aproximadamente 32 kD). Las disoluciones WS se diluyeron hasta una concentración final de 2 ng/mL en 0,1 X SSC que contenía 5 ng/mL de ADN de esperma de arenque. El ADN se desnaturalizó mediante 10 min a 100°C y rápida inmersión en baño de agua helada. El ADN se desnaturalizó durante 10 minutos a 100°C e inmersión rápida en baño de agua helada. 50-100 ng de ADN de cada cepa se secó por cuadruplicado sobre membrana de nylon cargada positivamente (Roche, Alemania) usando un aparato Dot-Blot (BIORad, Ca EEUU) conectado a vacío suave. En el 30 gráfico se incluyó una curva estándar de 20 a 200 ng ADN/punto de ADN homólogo (el ADN a investigar). El ADN se reticuló con nylon mediante 3 minutos de exposición a UV y mediante 1 hora de horneado al vacío a 120°C. las membranas se congelaron a -20°C hasta el análisis.

35 Se etiquetó 1 µg de ADN a investigar durante la noche con digoxigenina-dUTP en una mezcla de reacción de 20 µL usando el kit de etiquetado Random Primed DNA (Roche, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se prehibridizaron durante 3 horas a 40°C en disolución DIG Easy-Hyb (Roche) y se hibridaron durante la noche a 40°C en disolución DIG Easy-Hyb que contenía 20 pg/ml del etiquetado Dig a investigar (desnaturalizado por calor como se describió anteriormente), usando un incubador de hibridación de tubo rotatorio (GFL). La rutina de lavados era: dos veces durante 5 minutos a temperatura ambiente en disolución 2 x SSC que contenía 0,1 SDS, dos 40 veces durante 15 minutos a 68°C en disolución 0,1 x SSC que contenía 0,1 x SDS (fragmento antidigoxigenina FAB conjugado con alcalina fosfatasa), el sustrato químico luminiscente CDP-Star, y el set DIG Wash y tampón Block, todos los reactivos e instrucciones relacionadas eran de Roche. El químico luminiscente se cuantificó en condición de linealidad de tiempo de exposición usando un aparato VersaDOC 4000 (BIO-RAD) equipado con el software Quantity-one. El porcentaje de homología ADN-ADN se calculó según Jahnke (1994) poniendo como 100% el medio 45 de los valores químico luminiscencia (intensidad de volumen ajustado x mm²) tomado de los puntos de ADN homólogo y teniendo en cuenta la respuesta lineal de la curva estándar del ADN homólogo. La desviación estándar media de las muestras replicadas no excedía el 5% del valor medio.

Resultados.

50 Los datos metabólicos se confirmaron mediante hibridación ADN-ADN, utilizando L. plantarum etiquetado por dUTP-digoxigenina como investigado. Como se muestra en la figura 4, los clones 37, 38, 48 mostraban 86, 99, 99% respectivamente de homología ADN-ADN con L. plantarum (L. PI en la figura 4), sabiendo que el límite de ADN

taxonómico para especies diferentes está por debajo de 70% de homología de ADN-ADN. Para distinguir entre las tres posibilidades y para confirmar descubrimientos anteriores, los clones 37, 38 y 48 se hibridaron ADN-ADN con ADN de cepas tipo *L. plantarum* (PL en la figura 5), *L. paraplantarum* (PPL en la figura 5) y *L. pentosus* (PE en la figura 5), a un investigado de ADN etiquetado a partir del clon 37 (fig. 5) N-Ctr es control negativo.

- 5 La descripción anterior de realizaciones preferentes de la invención no pretende ser exhaustiva o limitar la invención a las realizaciones descritas. Varios cambios en el ámbito de la invención serán aparentes a los expertos en la técnica y se pueden adquirir a partir de la práctica de la invención.

- 10 En base a los resultados experimentales de hibridación ADN-ADN y el análisis de 16S ARN, las cepas 37, 38 y 48 pertenecen a un único grupo, en el que *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. paraplantarum* también están presentes. Pero son diferentes de ellos. Se considera que las cepas 37, 38 y 48 representan una subespecie de *L. plantarum*, que se llamará *L. plantarum asini*. Por razones similares, las cepas 41 y 43 aparentemente pertenecen a una especie nueva, *Lactobacillus asini*. En realidad, las cepas 41 y 43 presentan un 40-50% de similitud con los otros lactobacilli, principalmente con *pentosus*, *plantarum* y *paraplantarum*.

- 15 Las cepas 37, 38 y 48, y las cepas 41 y 43, son microorganismos que pertenecen al género *Lactobacillus*, con una homología del 16S ARN mayor de 99,2% con el grupo estricto de *L. plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. pentosus*, y con huella y perfil proteico relativamente proporcional a tal homología.

Lista de secuencias

SEQ ID Nº: 1

Longitud: 10 bases

Tipo: ácido nucleico

5 Cadena: simple

Topología: linear

Tipo molécula: ADN

Secuencia: CACAGCTGCC

SEQ ID Nº: 2

10 Longitud: 10 bases

Tipo: ácido nucleico

Cadena: simple

Topología: linear

Tipo molécula: ADN

15 Secuencia: GGACGACAAG

REIVINDICACIONES

1. Bacteria láctica probiótica, particularmente aislada a partir de leche de burra, y seleccionada a partir del grupo que consiste en cepas depositadas bajo el número de acceso DSM 22098, DSM 22099, DSM 22100, DSM 22102, DSM 22101, DSM 23558, DSM 23559 y DSM 23560 con DSMZ.
- 5 2. Composición que comprende una o una pluralidad de especies o cepas de bacterias lácticas según la reivindicación 1.
3. Composición según la reivindicación 2, en la que la composición es una composición alimentaria o una composición de bebida.
- 10 4. Proceso para la fabricación de una composición alimentaria o una composición de bebida que contiene al menos las etapas de:
 - inocular un producto alimentario con bacteria láctica probiótica viable según la reivindicación 1,
 - colocar el producto alimentario inoculado bajo condiciones favorables para el metabolismo de dicha bacteria láctica probiótica,
 - 15 - fermentar dicho producto alimentario hasta que se alcance una población de al menos $[10^6]$ CFU/ml en el producto alimentario.
5. Proceso para la fabricación de una composición alimentaria o una composición de bebida contiene al menos las etapas de:
 - fermentar bacteria láctica probiótica según la reivindicación 1 hasta que se alcance una población de al menos $[10^6]$ CFU/ml,
 - 20 - proteger dicha bacteria láctica probiótica, por ejemplo por envolvimiento,
 - mezclar un producto alimentario con dicha bacteria láctica probiótica protegida.
6. Un proceso según la reivindicación 4 o 5, en el que la fermentación se para cuando se alcanza la fase estacionaria de fermentación, preferentemente en aproximadamente 24 horas de haber colocado dicha bacteria láctica probiótica bajo condiciones favorables para su metabolismo.
- 25 7. El uso de bacteria láctica probiótica según la reivindicación 1 en la preparación de una composición para tratar una afección asociada con la colonización de una membrana mucosa por un microorganismo patogénico.
8. El uso según la reivindicación 7, en el que dicha membrana mucosa se selecciona en el grupo que consiste de la mucosa del intestino y la mucosa del estómago.
- 30 9. El uso según la reivindicación 7 o 8, en el que dicho microorganismo patogénico es un enteropatógeno, tales como *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*.
10. El uso de bacteria láctica probiótica según la reivindicación 1 para proteger productos alimentarios fermentados frente a patógenos alimentarios, tales como *Lysteria* o *Salmonella*, *Campylobacter* o *Clostridium*, inhibiendo el desarrollo de tales patógenos alimentarios.
- 35 11. El uso de bacteria láctica probiótica según la reivindicación 1 para producir ácido butírico durante la fermentación haciendo uso de dicha bacteria.
12. Método para producir ácido butírico que comprende las etapas de fermentar bacteria ácida probiótica según la reivindicación 1 bajo condiciones adecuadas y recolectar el ácido butírico producido durante la fermentación por dicha bacteria.

40

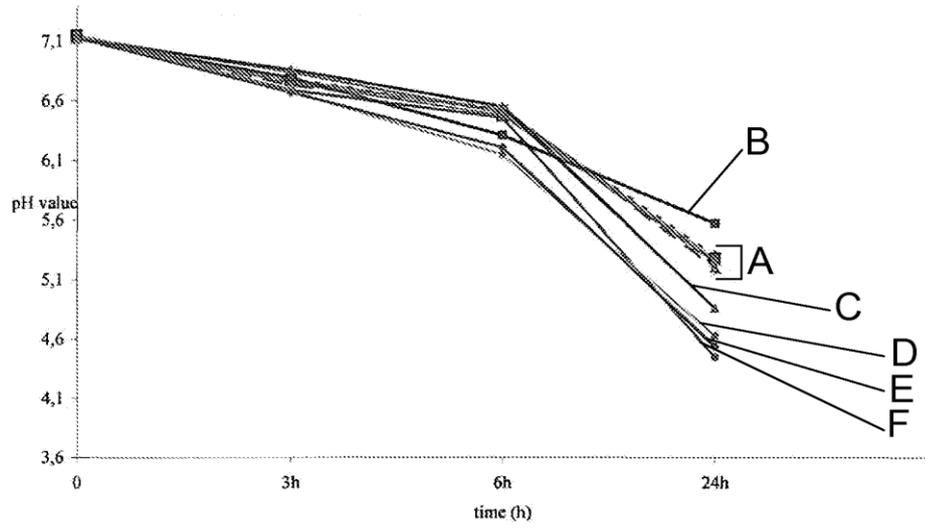


FIG. 1

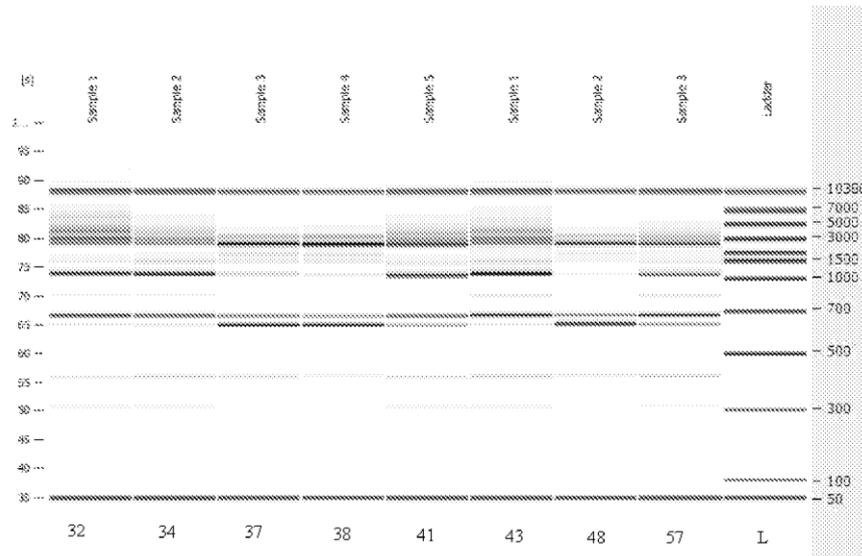


FIG. 2

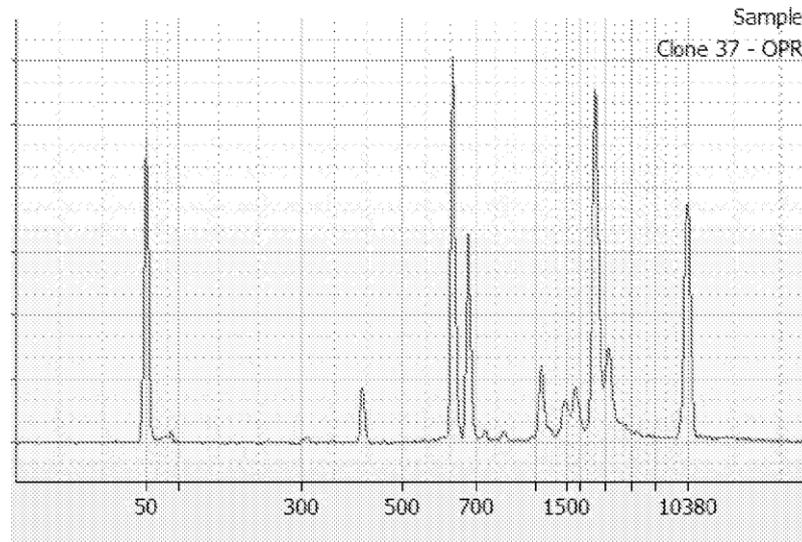


FIG. 3a

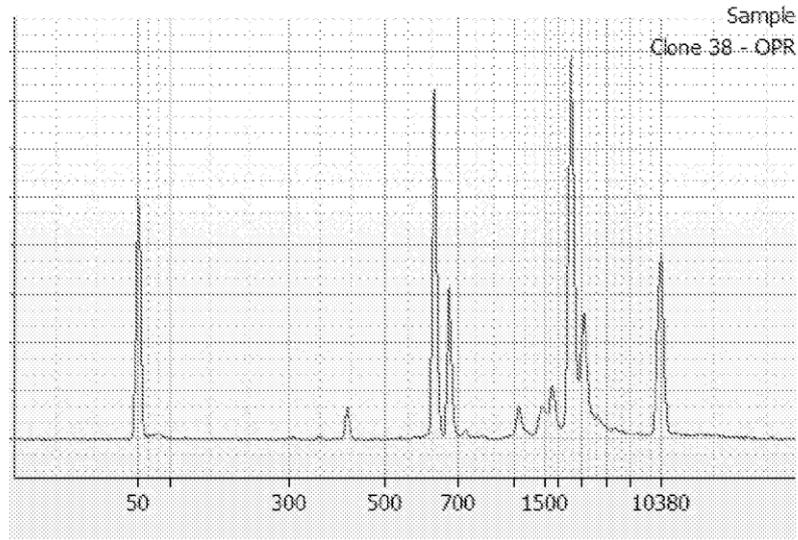


FIG. 3b

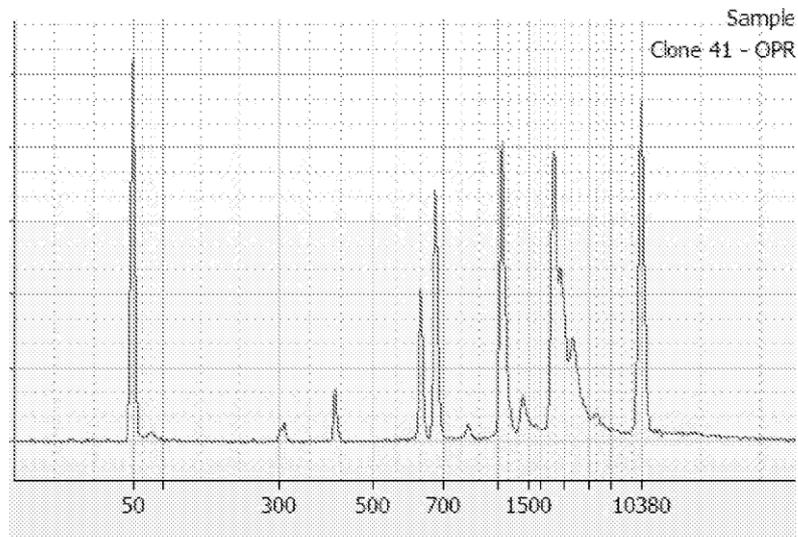


FIG. 3c

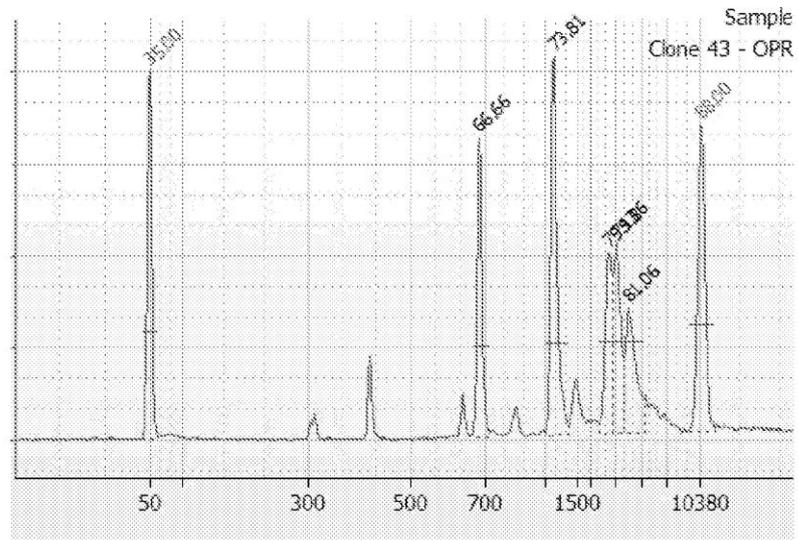


FIG. 3d

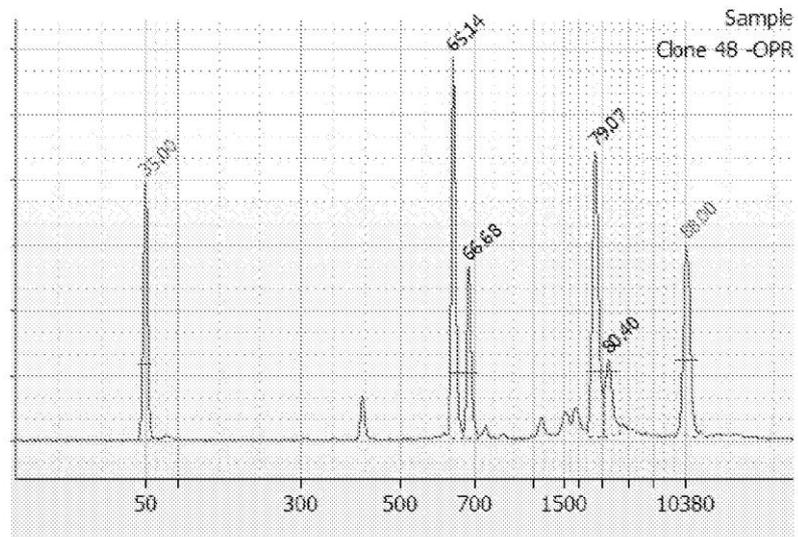


FIG.3e

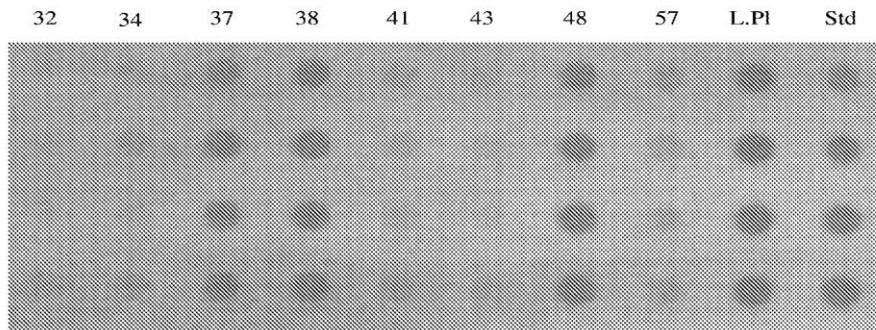


FIG. 4

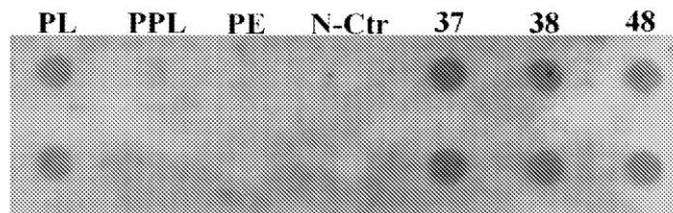


FIG. 5