

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 602**

51 Int. Cl.:

A23L 29/00 (2006.01)

A23L 33/175 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2008 PCT/IT2008/000481**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2009 WO09011008**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2008 E 08790064 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2173855**

54 Título: **Procedimiento para la preparación del ácido gamma-aminobutírico (GABA) por medio de bacterias de ácido láctico (LAB) sobre el excedente de la industria agrícola y alimentaria**

30 Prioridad:

17.07.2007 IT RM20070398

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

15.02.2017

73 Titular/es:

**GIULIANI S.P.A. (100.0%)
Via P. Palagi 2
20129 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**GIULIANI, GIAMMARIA;
BENEDUSI, ANNA;
DI CAGNO, RAFFAELLA;
RIZZELLO, CARLO, GIUSEPPE;
DE ANGELIS, MARIA;
MAZZACANE, FRANCESCO y
GOBBETTI, MARCO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 601 602 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación del ácido gamma-aminobutírico (GABA) por medio de bacterias de ácido láctico (LAB) sobre el excedente de la industria agrícola y alimentaria

Esta invención se refiere a un procedimiento para la preparación del ácido gamma-aminobutírico (GABA) por medio de bacterias de ácido láctico (LAB) sobre el excedente de la industria agrícola y alimentaria. En particular, esta invención se refiere al uso de bacterias lácticas que han sido seleccionadas para la producción de ácido gamma-aminobutírico (GABA) sobre el excedente de la industria agrícola y alimentaria como mosto para el uso ventajoso en el campo dermatológico y en el tratamiento de daños renales, por ejemplo, los que son causados por la hipertensión y por la patología diabética. El GABA, que se define como un aminoácido no natural, es sintetizado por la enzima glutamato decarboxilasa (GAD) (EC 4.1.1.15), dependiente del piridoxal fosfato, que cataliza la descarboxilación irreversible de L-glutamato en GABA. La enzima GAD se encuentra ampliamente distribuida tanto en organismos procariotas como en eucariotas (Ueno, 2000, Enzymatic and structural aspect on decarboxylase, J. Mol. Catal. 10: 67-79). Se ha demostrado ampliamente que el GABA puede desarrollar diversas funciones fisiológicas en el hombre. Puede actuar como un neurotransmisor, como un agente inductor de la hipotensión, diurético y como un tranquilizante (Guin et al., 2003, GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease, Ann. Neur. 6: 3-12; Jakobs et al., 1993, Inherited disorders of GABA metabolism, J. Inherit. Metab. Di 16: 704-715). Tratamientos de la depresión (Okada et al, 2000, Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration, Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi 75: 596-603), de los síntomas asociados al alcoholismo (Oh et al., 2003, Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms, J. Med. Food., 6: 115-121) y la estimulación del sistema inmune (Oh y Oh, 2003, Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells, Food Sci. Biotechnol. 12: 248-252) se han asociado a la administración de GABA. Estudios recientes en el campo dermatológico han demostrado la participación de GABA: (i) en los mecanismos homeostáticos a nivel epidérmico, como respuesta a las radiaciones UV (Warskulat et al, 2004, The osmolyte strategy of normal human keratinocytes in maintaining cell homeostasis, J. Invest. Dermatol. 123: 516-521); (ii) en la regulación de los receptores de barrera para la prevención de disfunciones y patologías hiperproliferativas de la epidermis (Denda y col., 2002, gamma-aminobutyric acid (A) receptor agonists accelerate cutaneous barrier recovery and prevent epidermal hyperplasia induced by barrier disruption, J. Invest. Dermatol. 119: 1041-1047), y (iii) en la estimulación del ácido hialurónico y en la mejora de la supervivencia de los fibroblastos de la epidermis siguiente a tensiones oxidativas (Ito et al, GABA-synthesizing enzyme, GAD67, from dermal fibroblasts: evidence for a new skin function, Biochim. Biophys. Acta, 1770: 291-296). Además, se ha demostrado recientemente la presencia de numerosas sub-unidades del receptor para el GABA en los riñones, el ensamblaje de sub-unidades en un nuevo complejo receptor y un receptor activo para GABA_A en células tubulares proximales a los riñones (Satinder S. et al., The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, vol. 324 no. 1:376-382, 2008).

Sobre la base de tales funciones fisiológicas bien reconocidas, distintos alimentos funcionales se han enriquecido o reforzado con GABA por medio de tratamientos tecnológicos, de naturaleza enzimática o microbiana (Okada et al, 2000; Nagaoka, 2005, Treatment of germinated wheat to increase levels of GABA and IP6 catalyzed by endogenous enzymes, Biotechnol. Prog. 21:405-410; Oh, 2003, Stimulation of gamma-aminobutyric acid synthesis activity in brown rice by a chitosan/Glu germination solution and calcium/calmodulin, J. Biochem. Mol. Biol. 36: 319-325).

Algunos estudios también han considerado la síntesis de GABA a partir de bacterias lácticas (Nomura et al., 1998, Production of gamma-aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening, J. Dairy Sci. 81: 1486-1491; Park y Oh, 2004, Cloning and expression of a full length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum*, J. Food Sci. Nutr. 9: 324-329; Park y Oh, 2007, Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3, Bioresour. Technol. 98: 312-319), tanto para la producción de derivados de la leche-queso funcionales como para la comprensión del mecanismo fisiológico que subyace en dicha actividad enzimática. En general, la síntesis de GABA suministra células bacterianas sometidas a condiciones ambientales ácidas con resistencia (Cotter y Hill, 2003, Surviving the acid text: responses of the Gram-positive bacteria to low pH, Microbiol. Mol. Rev., 67: 429-453) y el proceso ejercido por la enzima GAD se ha asociado con la síntesis de la energía en *Lactobacillus* sp. E1 (Higuchi et al., 1997, Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain, J. Bacteriol. 179: 3.362-3.364). La producción de GABA en los derivados de la leche-queso que pertenecen a los documentos publicados no ha ido más allá del umbral de aproximadamente 70 mg/litro (aproximadamente 0,67 mM). En el estado actual de los conocimientos de los inventores también está la patente JP-A-2005-102559 sobre el uso de *Lactobacillus paracasei* NFRI (7415), aislado de "funa-zushi", para la producción a gran escala en MRS de suelos de cultivo y durante la preparación de una bebida a base de gérmenes de arroz y leche bovina. Además, las solicitudes de patente JP2002360289 y WO2007075011 describen la preparación de GABA por medio de bacterias de ácido láctico usando sustratos naturales. Por otra parte, un estudio que se conoce (Komatsuzaki et al, 2005, Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foodstuffs, Food Microbiol. 22: 497-504) en el que la producción de GABA en suelo de cultivo MRS por medio del mismo biotipo *L. paracasei* NFRI ha sido optimizada con referencia a algunos parámetros de la fermentación. Sin embargo, los rendimientos de GABA obtenidos por medio de los procedimientos descritos en la técnica conocida no son satisfactorios hasta el momento.

A la luz de lo que se ha descrito anteriormente es evidente, por lo tanto, que existe una necesidad de materiales y métodos para la preparación de GABA que sean capaces de superar las desventajas de los procedimientos ya conocidos.

5 Los autores de esta invención han seleccionado algunas bacterias lácticas, en particular, *Lactobacillus plantarum* DSM 19463 (presentada el 26 de junio de 2007, con el DSMZ), sustratos aptos para su crecimiento, en particular, el mosto, y han establecido un procedimiento para la producción de GABA con rendimientos mucho mayores que los que pueden obtenerse de acuerdo con la técnica ya conocida.

10 Otras ventajas de esta invención son: (i) la posibilidad de emplear sustratos de fermentación naturales y de bajo coste (por ejemplo, el mosto) evitando el uso de suelos de cultivo comerciales complicados con el fin de favorecer el crecimiento de los microorganismos y la biosíntesis de GABA; (ii) el crecimiento de la síntesis de GABA en matrices de origen alimentario con respecto a las concentraciones publicadas en la literatura; (iii) un procedimiento de fermentación que permite que un producto desecado o liofilizado se obtenga con un alto valor fisiológico, naturalmente enriquecido con GABA, vitaminas, minerales, polifenoles y bacterias lácticas vivas y vitales, lo que sería potencialmente probiótico; y (iv) la posibilidad de ampliar el campo de aplicación del producto sobre la base de
15 GABA en el campo dermatológico y para el campo del tratamiento de los daños renales.

Las bacterias lácticas según la presente invención pertenecen al género de *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Se han aislado previamente a partir de matrices alimentarias (queso) que habían sido naturalmente enriquecidas con GABA y seleccionadas sobre la base de su capacidad para sintetizar altas concentraciones de GABA en un suelo de cultivo. En la presente invención, la selección se ha llevado a cabo en ocho productores de GABA sobre la base de
20 su capacidad para desarrollar y sintetizar GABA a partir de sustratos como el mosto, integrado con el agua de levadura o con extracto de levadura, y fermentado en condiciones de cultivo estandarizados.

En particular, el *L. plantarum* DSM 19463 se ha seleccionado para la fermentación del mosto concentrado (cantidad total de azúcares 61,8%) diluido (cantidad total de azúcares 1%) en la proporción de 50:50 con agua de levadura y agua, integrado con L-glutamato monosódico (20 mM) y modificado en cuanto a su valor de pH inicial de
25 aproximadamente 6,0.

Un protocolo de producción de GABA de *L. plantarum* DSM 19463 se ha estandarizado y optimizado, proporcionando dicho protocolo su propagación inicial en un suelo de cultivo MRS durante 24 horas a 30°C, la recogida de las células por centrifugación y lavado, la inoculación en mosto diluido con agua de levadura e integrado con 20 mM de L-glutamato monosódico, un pH de aproximadamente 6,0, y la incubación sucesiva preferiblemente
30 durante un periodo de 72-78 horas a 30°C.

El proceso de fermentación por medio de *L. plantarum* DSM 19463 de acuerdo con esta invención permite (i) la explotación de mosto, como un excedente procedente del campo alimenticio y agroalimentario y, por lo tanto, sustratos a costo cero; (ii) la producción de aproximadamente 500 mg/l (aproximadamente 4,8 mM) de GABA al final del proceso de fermentación del mosto, o la producción de aproximadamente 890 mg de GABA por 100 g de una sustancia seca del producto liofilizado; (iii) el enriquecimiento natural del producto a base de GABA con vitaminas del grupo B que se derivan de la utilización de agua de levadura y con minerales y polifenoles derivados de la utilización del mosto; (iv) el enriquecimiento natural del producto liofilizado con células vivas y vitales de *L. plantarum* DSM 19463 (aproximadamente 10^{10} ufc/g en condiciones de laboratorio), que sobre la base de las pruebas in vitro podrían presentar propiedades probióticas; y (v) la aplicación potencial del producto en el campo dermatológico, como se muestra en la reciente publicación mencionada anteriormente.
40

L. plantarum DSM 19463 de acuerdo con la presente invención muestra la producción de GABA en una matriz de origen alimentario (mosto) de aproximadamente 890 mg por 100 g de materia seca, que es mucho más grande que la descrita en la patente JP-A-2005-102559 (103,9 mg por 100 g de la materia seca) después de la fermentación de una matriz alimentaria diferente (una bebida a base de gérmenes de arroz y leche bovina) por medio de *L. paracasei* NFRI (7415) aislado de 'funa-zushi'. Con referencia a *L. plantarum* DSM 19463 también la secuencia parcial del gen GAD se ha clonado, a diferencia de la *L. paracasei* NFRI, el gen de GAD que está involucrado en la síntesis de GABA.
45

La secuencia parcial del gen de la glutamato descarboxilasa (GAD) de *L. plantarum* DSM 19463 (SEQ ID NO: 1) es la siguiente:

1 gnangctatt cangcctggn cctggcaact tttgtcaga cctatatgga
 acccgaagcc
 61 gttgaattga tgaaggatac gctggctaag aatgccatcg acaaattcga
 gtacccccgc
 121 acggccgaga ttgaaaatcg gtgtgtgaac attattgcca atctgtggca
 cgcacctgat
 181 gacgaacact ttacgggtac ctctacgatt ggctcctctg aagcttgtat
 gttaggcggg
 241 ttagcaatga aattcgctg gcgtaaacgc gctcaagcgg caggtttaga
 tctgaatgcc
 301 catcgaccta acctcgttat ttcggctggc tatcaagttt gctgggaaaa
 gttttgtgc
 361 tactgggacg ttgtttttt tttttttcc caatggatga gcaacacgtg
 gcccttgggg
 421 ttaaacacgt ctacggcttg ggccgagaat cgcttggtat tttttgtaa
 acaaggcgtc
 481 ccctttaccc ctgccc

5 Los autores de la presente invención también han elegido la bacteria láctica *Lactococcus lactis* ssp. DSM 19464 (presentada el 26 de junio 2007 con el DSMZ) que puede ser empleada en la fermentación de mosto de acuerdo con un protocolo de fermentación con diferentes rendimientos de GABA.

En consecuencia, es un objeto específico de la presente invención *L. plantarum* DSM 19463 o *Lc. lactis* ssp. DSM 19464 o sus asociaciones.

Es un objeto adicional de la presente invención el uso de *L. plantarum* DSM 19463 o *Lc. lactis* ssp. DSM 19464 o sus asociaciones para la preparación de una mezcla probiótica enriquecida con ácido gamma-aminobutírico.

10 Además, esta invención se refiere también a un procedimiento para la preparación de una mezcla probiótica enriquecida con ácido gamma-aminobutírico, que incluye los siguientes pasos:

a) la propagación en un suelo de cultivo, preferiblemente MRS o M17, de *L. plantarum* DSM 19463 o *Lc. lactis* ssp. DSM 19464 o sus asociaciones durante 24 horas a 30°C;

15 b) la resuspensión de la biomasa así obtenida en la etapa a) en una parte de un sustrato añadido con L-glutamato monosódico 20 mM, siendo dicho sustrato de acuerdo con la densidad celular de aproximadamente 10^9 ufc/g;

c) la inoculación de los sustratos en el porcentaje de 1-4% y la fermentación de 72-96 horas, preferiblemente 72-78 horas, a la temperatura de 30-33°C, y preferiblemente a 30°C.

20 Preferiblemente, el mosto se puede diluir con agua la levadura o se puede añadir con la levadura. En particular, el mosto se puede diluir con agua la levadura y 50/50 de agua destilada, y se puede desacidificar por medio de NaOH 1 N a un valor de pH de 6,0 a 6,5, preferiblemente, de aproximadamente 6,0. Por otra parte, el mosto puede ser añadido con piridoxal-5-fosfato.

El proceso de acuerdo con la presente invención puede incluir además una etapa d) de la desecación o la liofilización del sustrato de fermentación obtenido en el paso c).

De acuerdo con ello, sobre la base de lo que ya se ha demostrado anteriormente, el proceso para la preparación de una mezcla probiótica enriquecida con ácido gamma-aminobutírico incluirá los siguientes pasos:

a) la propagación en el medio de cultivo, preferiblemente MRS o M17, de *L. plantarum* DSM 19463 o *Lc lactis* ssp. DSM 19464 durante 24 horas a 30°C;

5 a1) recolección de células por medio de centrifugación (10.000 x g durante 10 minutos a 4°C), el lavado por medio de tampón de fosfato 50 mM, pH 7,0, y

b) la resuspensión de la biomasa en una porción de mosto diluido de acuerdo con una densidad celular de aproximadamente 10⁹ ufc/g;

10 b1) la preparación de agua de levadura mediante la suspensión de aproximadamente 60 g de levadura de cerveza comercial en aproximadamente 300 ml de agua destilada; la esterilización en autoclave a 120°C durante 30 minutos; la decantación durante 12 horas a 4°C de la biomasa; la centrifugación a 6000 x g durante 10 minutos a 4°C; y la recuperación final en condiciones estériles del sobrenadante (agua de levadura) que contiene el extracto citoplásmico de células de levadura;

15 b2) dilución del mosto concentrado con agua y el agua de la levadura de acuerdo con las proporciones ya descritas anteriormente (pH final de aproximadamente 6,0 después de la modificación) y esterilización en autoclave sucesiva a 120°C durante 15 minutos,

c) la inoculación de los sustratos a 1-4% y la fermentación durante aproximadamente 72-96 horas (preferiblemente 72-78 horas) a 30°C.

20 El proceso de acuerdo con la presente invención puede incluir además una etapa d) que es un paso de desecación o liofilización del sustrato de fermentación obtenido en la etapa c).

Es un objeto adicional de esta invención, una mezcla de probióticos enriquecida con ácido gamma-aminobutírico que se puede obtener por medio del proceso que ha sido establecido anteriormente, comprendiendo dicha mezcla *Lactobacillus plantarum* DSM 19463 o *Lactobacillus lactis* ssp. DSM 19464 o sus asociaciones y preferiblemente la mezcla contiene al menos 890 mg de ácido gamma-aminobutírico por 100 g de sustancia seca, y además incluye 25 vitaminas, minerales, polifenoles y bacterias lácticas vivas y vitales.

La mezcla de probióticos puede emplearse ventajosamente en los campos médicos y cosméticas y, de acuerdo con los estudios realizados por el solicitante y reportados en la parte experimental de la presente solicitud de patente ha mostrado efectos ventajosos con respecto a los obtenidos tras el tratamiento con el GABA solamente. Por consiguiente, esta invención también se referirá a una composición farmacéutica o cosmética que comprende una 30 mezcla de probióticos enriquecida con ácido gamma-aminobutírico como ya se ha descrito anteriormente, como el principio activo, junto con uno o más excipientes y/o adyuvantes como compuestos farmacéuticamente o cosméticamente aceptables.

Es un objeto adicional de esta invención el uso de la mezcla de probióticos enriquecida con ácido gamma-aminobutírico como un compuesto cosmético de acuerdo con la presente invención.

35 Además, esta invención se refiere al uso de la mezcla de probióticos enriquecida con ácido gamma-aminobutírico de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento para uso en dermatología.

Es un objeto adicional de la presente invención la composición farmacéutica como se ha definido anteriormente para el tratamiento de enfermedades renales como, por ejemplo, aquellos daños renales que se derivan de la hipertensión y de la patología diabética.

40 Esta invención se describirá ahora sólo para su ilustración y no con fines limitativos de acuerdo con sus formas preferidas de realización y con particular referencia a las figuras de los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra la cinética de acidificación y el crecimiento de *L. paracasei* FC₄4, *Lactobacillus plantarum* FC₄15, *Lactobacillus delbrueckii* PR1, *L. plantarum* FC₄8 y *L. lactis* ssp. DSM 19464 en mosto diluido (azúcares totales 1%) con agua destilada, pH de aproximadamente 4,0. La fermentación se ha llevado a cabo a 30°C;

45 La figura 2 muestra la cinética de acidificación y el crecimiento de *L. paracasei* FC₄4, *L. plantarum* FC₄15, *L. delbrueckii* PR1, *L. plantarum* DSM 19463, *L. plantarum* FC₄8 y *Lc. ss lactis*. DSM 19464 en mosto diluido (azúcares totales 1%) con agua de levadura y agua destilada en una proporción de 50:50, pH aproximadamente 4,5. La fermentación se ha llevado a cabo a 30°C;

50 La figura 3 muestra la producción de ácido gamma-aminobutírico (GABA) como mg/l de *L. plantarum* DSM 19463 en el mosto diluido (azúcares totales 1%) con agua de levadura y agua destilada (50/50) a un pH de aproximadamente 4,5, y se añaden con L-glutamato monosódico (20 mM) (A); mosto diluido en agua (azúcares totales 1%), un pH de aproximadamente 4,5, y añadido con extracto de levadura (0,5%) y L-glutamato monosódico (20 mM) (B); suero de

leche, pH 5,90, añadido con L-glutamato monosódico (20 mM) (C); y suero de leche, pH 5,90, añadido con extracto de levadura (0,5%) y L-glutamato monosódico (20 mM) (D). La fermentación se ha llevado a cabo a 30°C;

La figura 4 muestra la cinética de acidificación (A) y el crecimiento (B), y la producción de ácido gamma-aminobutírico (GABA) como mg/l de *L. plantarum* DSM 19463 (C) en el mosto diluido (azúcares totales 1%) con agua de levadura y agua destilada (50/50, pH aproximadamente 6,0 y añadido con L-glutamato monosódico (20 mM). La fermentación se ha llevado a cabo a 30°C;

La figura 5 muestra la producción de ácido gamma-aminobutírico (GABA) como mg/l de *L. plantarum* DSM 19463 (C) en mosto diluido con diferentes porcentajes de azúcares totales (0,3%, A; 0,5%, B; 0,7%, C; y 1%, D) con agua de levadura y agua destilada (50/50), pH de 6,0, y añadido con L-glutamato monosódico (20 mM). La fermentación se ha llevado a cabo a 30°C;

La figura 6 muestra la cinética de acidificación (A) y el crecimiento (B), y la producción de ácido gamma-aminobutírico (GABA) como mg/l de *L. plantarum* DSM 19463 (C) en mosto diluido (azúcares totales 1%) con agua de levadura y agua destilada (50/50, pH aproximadamente 6,0 y añadido con L-glutamato monosódico (20 mM) y piridoxal 5-fosfato. La fermentación se ha llevado a cabo a 30°C;

La figura 7 muestra la cinética de acidificación (A) y la producción de ácido gamma-aminobutírico (GABA) como mg/l de células en reposo (células no en la fase de crecimiento) de *L. plantarum* DSM 19463 (B) en mosto diluido (azúcares totales 1 %) con agua de levadura y agua destilada (50/50), un pH de aproximadamente 6,0 y añadido con L-glutamato monosódico (20 mM). La fermentación se ha llevado a cabo a 30°C;

La figura 8 muestra la productividad como $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$ (A), rendimiento como $\Delta\text{P}/\Delta\text{S}$ (B) y la tasa de producción específica como $1/x \text{ dP}/\text{dt}$ (C) de ácido gamma-aminobutírico (GABA) de *L. plantarum* DSM 19463 en mosto diluido (azúcares totales 1%) con agua de levadura y agua destilada (50/50), pH de aproximadamente 6,0, y añadido con L-glutamato monosódico (20 mM). La fermentación se ha llevado a cabo a 30°C;

La figura 9 muestra la expresión de la enzima hialuronato sintetasa en un modelo FT-piel después del tratamiento a las 8, 24, 48 y 72 horas con la biomasa de acuerdo con la presente invención o GABA;

La figura 10 muestra la expresión del gen para la filagrina en un modelo FT-piel después del tratamiento a las 8, 24, 48 y 72 horas con la biomasa de acuerdo con la presente invención o GABA;

La figura 11 muestra la expresión del gen para la involucrina en un modelo FT-piel después del tratamiento a las 8, 24, 48 y 72 horas con la biomasa de acuerdo con la presente invención o GABA.

Ejemplo 1: Selección de bacterias lácticas de acuerdo con la presente invención

Las bacterias lácticas que pertenecen a la colección de cultivos del Departamento de Protección de Plantas y Microbiología Aplicada de la Universidad de Bari, Italia (Collezione di Colture del Dipartimento di protezione delle Pianta e Microbiologia Applicata dell'Università degli Studi di Bari), previamente aisladas de queso y seleccionadas sobre la base de su capacidad de síntesis de GABA en condiciones de medio de cultivo, se han cultivado a 30°C durante 24 horas en MRS o en M17 (*Lc. lactis* ssp. DSM 19464) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). En la Tabla 1 se publica la lista de las especies y los biotipos empleados en la presente invención para la producción del ácido gamma-aminobutírico.

Tabla 1

Especies	Cepa
<i>Lactobacillus paracasei</i>	FC ₄ ; FC ₄ 10
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 19463; FC ₄ ; FC ₄ 12; FC ₄ 15
<i>Lactobacillus lactis</i> ssp.	DSM 19464
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	PR1

(1) Uso de bacterias lácticas para la fermentación de agro- y alimento-matrices

Después del cultivo en medio de cultivo, las células bacterianas lácticas se recogieron por medio de la centrifugación (10.000 g x 10 min., 4°C), a continuación, se lavaron dos veces en un tampón de fosfato 50 mM, pH 7,0, y se resuspendieron en una porción de mosto o de suero de leche, a una densidad celular de 10^9 ufc/ml.

- El mosto concentrado (cantidad de azúcar total 59,2%) no se añade con anhídrido sulfuroso, se diluyó a la concentración de azúcar total de 1% con agua destilada, o con agua destilada y agua de levadura en la proporción de 50/50, a continuación, se desacidificó por medio de NaOH 1 N a un pH de aproximadamente 4,0 a 4,5 o aproximadamente 6,0 y luego se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 minutos. Cuando se emplea agua de levadura, ésta se prepara mediante la suspensión de aproximadamente 60 g de levadura de cerveza comercial en aproximadamente 300 ml de agua destilada; esterilización en autoclave a 120°C durante unos 30 minutos; separación por decantación durante 12 horas a 4°C de la biomasa; luego centrifugación a 6000 × g durante 10 minutos a 4°C; y la recuperación final en condiciones estériles del sobrenadante (agua de levadura) que contiene el extracto citoplásmico de las células de levadura.
- El suero de leche, obtenido como un producto secundario de la producción de 'ricotta' se ha caracterizado por los siguientes parámetros: lactosa 4,80%, proteínas 0,79%, grasas 0,40%, pH 5,0. Dicho suero de leche se ha empleado en los procesos de fermentación como tal o con la adición de un extracto de levadura (0,5%).
- Se añadió L-glutamato monosódico 20 mM a los sustratos de fermentación y, en algunos experimentos, se añadió piridoxal 5-fosfato 0,1 mM.
- Las fermentaciones se llevaron a cabo por medio de inóculo del 4% de las bacterias lácticas (densidad celular inicial de aproximadamente 10^7 ufc/ml) e incubación a 30°C durante 96 horas.
- Cuando se empleaban 'células en reposo', es decir, células que no están en la fase de crecimiento, se proporcionaba un inóculo capaz de permitir obtener una densidad celular inicial igual a aproximadamente 10 ufc/ml. Cuando *L. plantarum* DSM 19463 y *Lc. lactis* ssp. DSM 19464 se utilizaban en asociación, se inoculaban de acuerdo a una densidad celular de aproximadamente 10^7 ufc/ml cada uno.
- (2) Cinética de crecimiento y acidificación
- La densidad celular de las bacterias lácticas se ha determinado por recuento en placa de agar MRS (Oxoid). La cinética de acidificación de la mezcla suave amasada se obtuvo en línea por medio de la medición del pH (pH-metro 507, Crison, Italia). Los datos relativos a la cinética del crecimiento y de la acidificación se han modelado a través de la ecuación de Gompertz modificada por Zwietering et al. (Zwietering et al., 1990. Modelling of bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol. 56:1875-1881). En cuanto a los experimentos iniciales, el crecimiento de las bacterias lácticas sobre diferentes sustratos se analizó mediante la determinación de la densidad óptica a 620 nm (O.D.620). La determinación del ácido D- y L-láctico se llevó a cabo por medio de un kit enzimático (DHFF CHAMB Italia Srl, Italia).
- (3) Determinación de GABA
- La concentración de GABA en los diferentes sustratos fermentados se determinó por medio del "Analizador de Aminoácidos Biochrom 30" (Biochrom Ltd, Cambridge, RU) que emplea una columna de intercambio catiónico (Productos alimenticios oxidados Na, 20 cm x 4,6 mm) (Di Cagno et al., 2007, Characterization of Italian Cheeses Ripened Under Nonconventional Conditions, J. Dairy Sci. 90:2689-2704).
- La producción de GABA también se caracterizó en términos de productividad como $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$; rendimiento como $\Delta\text{P}/\Delta\text{S}$, es decir la producción de GABA en relación con el consumo de sustrato (L-glutamato monosódico); y la tasa de producción específica ($1/x \text{ dP/dt}$), donde x representa la densidad celular en el momento considerado.
- (4) Determinación del contenido de vitaminas, minerales y polifenoles
- El contenido de vitaminas del grupo B y de los polifenoles de los sustratos fermentados se determinó por medio de análisis HPLC. La concentración de los minerales se determinó por el método de absorción atómica.
- (5) Caracterización molecular del gen GAD en *Lactobacterium plantarum* DSM 19463
- La extracción de ADN de *L. plantarum* DSM 19463 se llevó a cabo por medio del método descrito por De Los Reyes-Gavilan (De Los Reyes-Gavilan et al., A *Lactobacillus helveticus*-specific DNA probe detects restriction fragment length polymorphisms in this species. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3492 hasta 3432). Los cebadores diseñados por regiones altamente conservadas del gen de GAD, C0ref/CoreR (5'-CCTCGAGAAGCCGATCGCTTAGTTTCG-3' (SEQ. ID NO2) y 5'-TCATATTGACCGGTATAAGTGATGCCC-3' (SEQ ID NO 3)) (PRIM srl San Raffaele Biomedical Science Park, Milán, Italia) se han usado para amplificar el gen de GAD. Cincuenta microlitros de cada reacción de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) contenían: 200 mM de cada 2'-desoxirribonucleótido 5'-trifosfato, 1 μM de cada cebador, 2 μM de MgCl_2 , 2 U de Taq ADN polimerasa y aproximadamente 50 ng de DNA. Las reacciones de amplificación de PCR se llevaron a cabo por medio del Sistema GeneAmpPCR 9700 (Applied Biosystem, EE.UU.). Los productos de amplificación se separaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y coloración y se obtuvieron por medio de bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g/ml}$). Los amplicones eluidos por medio del gel se purificaron a través del ADN GFX PCR y el Kit Gel Band Purification (Amersham Biosciences, Upsala, Suecia). Las reacciones de secuenciación de DNA han sido realizadas por PRIM. La comparación de secuencias se llevó a cabo por medio de

una base de datos de BLAST Basic. La traducción de las secuencias de nucleótidos se llevó a cabo por medio del software Omega (Oxford Molecular, Madison, EE.UU.).

Resultados

(1) Crecimiento y acidificación de mosto y de suero de leche

5 Teniendo en cuenta la innovación biotecnológica asociada a la utilización del mosto y al suero de leche como sustratos para la síntesis de GABA a partir de bacterias lácticas, la potencialidad del crecimiento y la acidificación de las bacterias fue probada inicialmente en los dos sustratos. Como es posible observar en la figura. 1, también el mosto diluido en agua destilada (azúcares totales 1%), modificación del pH a aproximadamente 4,0, permitió un crecimiento moderado de las bacterias lácticas. Ejemplos relativos a los cultivos reportados en la fig. 1 mostraron un valor de DO_{620} de 0,89 a 1,06 después de 48 horas de incubación a 30°C. También las otras bacterias empleadas para la selección inicial mostraron valores de DO_{620} en el intervalo informado anteriormente. Para el crecimiento microbiano, diversos valores de pH en el intervalo de 3,11 a 3,65 correspondieron (Fig. 1). Cuando la dilución del mosto se llevó a cabo no solo por medio de agua destilada, sino también con agua de levadura (relación de 50:50) el crecimiento microbiano fue definitivamente aumentado (Fig. 2). Como se estimó por medio de la determinación de la DO_{620} , el crecimiento bacteriano se demostró que estaba en el intervalo desde 2,28 hasta 2,48, con el valor más alto registrado en el caso de *L. plantarum* DSM 19463. Los mismos resultados se obtuvieron también por comparación del crecimiento de bacterias lácticas en el suero de leche como tal o en el suero de leche añadido con extracto de levadura (0,5%). En particular, *Lc. lactis* ssp. DSM 19464 ha mostrado el mayor crecimiento en el suero de leche. Al final de esta primera etapa de selección fue así como se decidió seguir con la parte experimental de *L. plantarum* DSM 19463 y en *Lc. lactis* DSM 19464 empleando como sustratos mosto diluido (azúcares totales 1%) con agua de levadura y agua destilada (en una proporción de 50:50), y el suero de leche añadido con extracto de levadura (0,5%).

(2) Síntesis de GABA de *Lactobacillus plantarum* DSM 19463 y *Lactococcus lactis* ssp. DSM 19464

25 La figura 3 muestra la síntesis de GABA de *Lactobacillus plantarum* DSM 19463 en mosto y suero de leche integrados de manera diferente. Una modificación adicional que se refiere a la utilización del mosto (pH de aproximadamente 4,5) fue la adición de L-glutamato monosódico (20 mM) como sustrato para la actividad de la enzima GAD. El valor de pH del suero de leche era obviamente de aproximadamente 5,9. Como se observa en el caso de los procesos de crecimiento y acidificación, la adición de agua de levadura favoreció las producciones más altas de GABA, cuyas producciones después de 96 horas de fermentación se fijaron en valores de aproximadamente 95 g/l (aproximadamente 0,91 mM). Las producciones de GABA en el suero de leche han mostrado ser notablemente inferiores, incluso en la presencia de extracto de levadura.

Por el contrario, *Lc. lactis* ssp. DSM 19464 mostró la mayor síntesis de GABA en el suero de leche fijada en valores de aproximadamente 80 g/l (0,77 mM).

35 Sobre la base de los resultados así obtenidos se decidió optimizar de todos modos la producción de GABA de *L. plantarum* DSM 19463 a partir de mosto como el único sustrato.

(3) Optimización de la síntesis de GABA de *L. plantarum* DSM 19463 en Deva

En particular, se han considerado las siguientes variables de fermentación: (i) el pH; (ii) las concentraciones iniciales de azúcares en el mosto; (iii) la adición de piridoxal 5-fosfato como un cofactor de la enzima GAD; (iv) el uso de las 'células en reposo'; y (v) el uso combinado de *L. plantarum* DSM 19463 y *Lc. lactis* ssp. DSM 19464.

40 El uso de un tampón de fosfato con el fin de mantener constante el valor de pH durante el período de incubación forzó el empleo de molaridades demasiado altas, lo que resultó ser inhibitorio del crecimiento y la actividad enzimática de *L. plantarum* DSM 19463. Con el objetivo de evitar que el valor de pH alcanzara valores notablemente ácidos demasiado rápidamente durante el período de incubación, el valor inicial del pH del mosto se modificó hasta que el valor del mosto fue de aproximadamente 6,0, mediante la adición de NaOH 1N. La figura 4 muestra la cinética de acidificación, crecimiento y síntesis de GABA de *L. plantarum* DSM 19463 en mosto diluido (azúcares totales 1%) con agua destilada y agua de levadura, pH de aproximadamente 6,0, y con la adición de L-glutamato monosódico (20 mM). Es posible observar en tales condiciones un fuerte proceso de acidificación que se caracteriza por valores de $\Delta pH = 2,12$ unidades, $V_{max} = 0,151 \text{ dpH min}^{-1}$ y $\lambda = 0,89 \text{ h}$, al cual corresponde la síntesis de aproximadamente 25 mM de ácido láctico. Un crecimiento microbiano corresponde a este tipo de cinética de acidificación, siendo caracterizado dicho crecimiento por valores de $A = 1,79 \log \text{ ufc ml}^{-1}$, $\mu_{max} = 0,31 \Delta \log \text{ ufc ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $\lambda = 0,89 \text{ h}$; y sobre todo un aumento constante de la síntesis de GABA que se fija en el valor de aproximadamente de 500 mg/ml (aproximadamente 4,79 mM) después de 78 horas de fermentación.

55 La concentración de azúcares iniciales en el mosto se cambió en el intervalo de 0,3 a 1,0% (Fig. 5). Aunque la síntesis de GABA está vinculada a las reacciones del catabolismo de los aminoácidos, tal síntesis se ha convertido en aumentar proporcionalmente (376-500 mg/l) a la concentración de azúcares (0,3-1%). Las concentraciones superiores al 1% no dieron aumentos significativos en la síntesis de GABA. En presencia de la concentración inicial

de 1%, solo trazas (<0,1%) de glucosa y fructosa se pusieron de manifiesto en el mosto después de 72-96 horas de fermentación.

Como se muestra en la figura 6, la adición de piridoxal 5-fosfato (0,1 mM) no favoreció un aumento en la síntesis de GABA con respecto a lo que se observa en el caso de su ausencia (Fig. 5). Evidentemente, la concentración de dicho compuesto en el mosto es suficiente para desarrollar la función de co-factor de la enzima GAD. Como era de esperar, también las cinéticas de acidificación y de crecimiento no se vieron afectadas por la adición de piridoxal 5-fosfato.

Como la síntesis de GABA es una reacción puramente enzimática que no está vinculada a ninguna teoría de multiplicación bacteriana, se evaluó la posibilidad de la inoculación del mosto con una alta biomasa (10 ufc/ml) de *L. plantarum* DSM 19463 en condiciones virtuales de 'células en reposo'. La figura 7 muestra que en estas condiciones de subdesarrollo de células la síntesis de GABA es más baja que la observada en condiciones de crecimiento de las células (Fig. 5). El uso de células de *L. plantarum* DSM 19463 en tales condiciones solo permitió un aumento bajo alcanzado en la producción de GABA en las primeras horas de incubación.

De nuevo con el objetivo de aumentar la producción de GABA obtenido de *L. plantarum* de acuerdo con las condiciones de fermentación de la figura. 5, se consideró la hipótesis de llevar a cabo un inóculo combinado de tal bacteria en asociación con *Lc. lactis* DSM 19464. También bajo estas condiciones experimentales no se observaron aumentos en la síntesis de GABA.

(4) Caracterización del proceso de síntesis de GABA de *L. plantarum* DSM 19463 en mosto.

Algunos parámetros biotecnológicos como la productividad como $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$, rendimiento como $\Delta P/\Delta S$ y la tasa de producción específica ($1/x \text{ dP/dt}$) de GABA se han determinado durante la fermentación del mosto diluido con agua de levadura y agua destilada (50/50 (azúcares totales 1%), pH de aproximadamente 6,0, y añadido con L-glutamato monosódico (20 mM), debido a la acción de *L. plantarum* DSM 19463. Como es posible observar en la figura 8, los valores más altos de productividad que eran iguales a 5,74 a $5,79 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$ se han observado respectivamente, después de 72-78 horas. De acuerdo con ello, también los valores más altos de rendimiento y tasa específica de GABA, respectivamente, de 0,206 y 0,673 $1/x \text{ dP/dt}$ se han observado después de 72 horas de fermentación a 30°C.

Después de 72 horas de fermentación, el caldo de cultivo se recuperó y se sometió como tal al proceso de liofilización. La Tabla 2 representa la composición como moléculas funcionales y como bacterias lácticas de la preparación, en particular, la concentración de moléculas funcionales por 100 g de sustancia seca de la preparación que se basa en mosto después de la fermentación por medio de *L. plantarum* DSM 19463 y liofilización sucesiva.

Tabla 2

Compuesto	Concentración
ácido gamma-aminobutírico	890 mg/100 g de sustancia seca
Vitamina B3	25,8 mg/100 g
polifenoles totales (método espectrofotométrico)	2,09 g / 100 g
Zinc	28,1 mg/100 g
Cobre	1,11 mg/100 g
Magnesio	155 mg/100 g
bacterias lácticas	10^{10} ufc/g

Como es posible observar en la Tabla 2, la preparación contiene una concentración de GABA de aproximadamente 890 mg/100 g de sustancia seca, siendo esta última más de ocho veces mayor que la descrita en la patente JP-A-2005-102559. La preparación también contiene otras moléculas funcionales tales como vitaminas del grupo B que se derivan de la utilización del agua de levadura como medio de dilución para el mosto, y minerales y polifenoles que se derivan del mosto como sustrato básico. Por último, aproximadamente 10 células por gramo de *L. plantarum* DSM 19463 están presentes en la preparación, siendo probable que tales células muestren potenciales actividades probióticas sobre la base de las pruebas preliminares.

Ejemplo 2. Evaluación de la eficiencia de la mezcla enriquecida con GABA de acuerdo con la presente invención y que se define en este documento como la biomasa o el complejo bio, en un modelo de epidermis humana reconstituida in vitro y a continuación en un modelo de piel FT reconstituida in vitro

Este estudio se llevó a cabo con el fin de comprobar la posible aplicación de la mezcla de acuerdo con la presente invención en el caso de la xerosis atópica, la dermatitis seborreica de la piel y del cuero cabelludo, la mejora en la función de barrera y en la acción de la microflora.

- 5 En particular, el objeto de la presente invención es en primer lugar la comprobación de la tolerancia cutánea de dicha biomasa después de aplicaciones individuales en diferentes tiempos de contacto en la epidermis humana reconstituida in vitro y el estudio de su interacción con la epidermis vital y en la función de barrera epidérmica.

Luego, en un segundo enfoque, la confirmación de la eficiencia para el GABA de acuerdo con la literatura científica anterior, y del mecanismo de acción de la biomasa con respecto a GABA que se emplea como control positivo en los siguientes parámetros.

10 Diseño experimental

Sistema de Prueba: Epidermis humana reconstituida

1) El modelo de epidermis utilizado es el producido por los laboratorios Skinethic®, Niza (F) y se emplea en el tamaño de 0,5 cm desde el decimoséptimo día de diferenciación con un espesor medio del lote de 120µ (capa córnea y epidermis vital).

- 15 Una epidermis completamente diferenciada se obtiene a partir de queratinocitos humanos en un medio de cultivo químicamente definido (MCDB 153) sin adición de suero fetal bovino, en un soporte inerte compuesto de policarbonato poroso en interfase aire-líquido durante 17 días; en esa etapa de diferenciación el análisis morfológico muestra una epidermis vital de varias capas y una capa córnea formado por más de 10 capas celulares compactas.

- 20 2) El "modelo de piel de espesor completa" (FT) (Phenion GmbH & Co., Frankfurt am Main, Alemania) es un modelo de piel humana de múltiples capas que consiste en queratinocitos y fibroblastos derivados del mismo donante. Después de un periodo de cultivo de cinco semanas, el "espesor total" fue completamente desarrollado y compuesto de epidermis, membrana basal y dermis. El modelo se caracteriza con respecto a la expresión de marcadores fundamentales de diferenciación en el nivel de la epidermis (citoqueratina 10, filagrina, transglutaminasa e involucrina), en las uniones dermis-epidermis (laminina y colágeno IV) y a nivel de la dermis (elastina fibronectina).
- 25 El diámetro del modelo FT es de 1,3 cm.

Medios y condiciones de cultivo

Los tejidos y los medios de cultivo se producen de acuerdo con GMP y se garantiza su reproducibilidad con respecto a las normas específicas. El uso de los mismos está autorizado sólo para fines de investigación, para la evaluación in vitro de productos o sustancias químicas.

- 30 El lote de tejido se analizó con el fin de garantizar la ausencia del virus VIH, del virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, citomegalovirus, micoplasma. Se garantiza que los medios de cultivo sean estériles. Los insertos RHE se envían a los diecisiete días de cultivo dentro de pocillos que contienen un gel nutritivo de agarosa, en placas de 24 pocillos.

- 35 Inmediatamente después de su llegada al laboratorio, la RHE se separa del gel de agarosa bajo una campana de flujo laminar. Los insertos se pusieron rápidamente en placas Falcon que tienen 6 ó 12 pocillos que contienen respectivamente 500 µl o 1 ml de medio de mantenimiento SkinEthic a la temperatura ambiente. Hay que tener cuidado de evitar la formación de burbujas bajo el inserto. Los tejidos se colocaron en una incubadora a 37°C en presencia de 5% de CO₂ en una atmósfera saturada de humedad. El suelo se cambia en intervalos de 24 horas y siempre al menos dos horas antes de comenzar la prueba.

- 40 Después de la llegada, el tejido FT-piel se elimina inmediatamente del suelo de transporte semisólido.

Tres pequeñas placas de Petri sin cubierta se colocan en una placa de Petri de 100 mm y se distribuyen 5 ml de ALL-medio dentro de cada una de ellas junto con dos soportes metálicos y un pequeño disco de filtro de papel en el que se colocan cuidadosamente los tejidos FT.

Los tejidos son entonces puestos en una incubadora (37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad).

45 Productos

nombre	lote	código de identificación	conservación	fabricante
Biomasa liofilizada	L2-	A74	+ 4°C	Giuliani S.p.A.
Lb. plantarum	00907			
GABA		GABA		SIGMA

muestras de control

Nombre	lote	código de identificación	conservación	fabricante
PBS	79382	A78CN	T. A.	Fluka
Isocide PN	PN 01BX6	A77CP	T. A.	Biophil

Métodos

Medición de TEER

- 5 La TEER (resistencia eléctrica trans-epitelial) es una medida directa de la funcionalidad de la barrera cutánea; refleja toda la resistencia global del tejido que es dada por su propio espesor, así como por su propia estructura. Refleja la integridad de los contactos intercelulares en el nivel de las uniones estrechas de la estructura lipídica bilaminar que se opone a la penetración de los compuestos externos.

- 10 TEER es el parámetro discriminante de la prueba de la resistencia eléctrica de la piel de rata (B 40), que está validada por la UE para la evaluación de la corrosividad tomando como los puntos finales la integridad de la capa córnea y la función de barrera.

TEER es inversamente proporcional al TEWL medido in vivo, que es la medida de la pérdida de agua trans-epidérmica; cuanto mayor sea TEWL, mayor es el daño a la función de barrera, mientras que cuanto más alta sea la TEER, menor es el daño a la función de barrera.

- 15 Se coloca 1 ml de PBS en el inserto y la resistencia eléctrica trans-epitelial se mide con el instrumento Millicell-ERS (intervalo de 0 a 20 kΩ).

Dos mediciones se llevaron a cabo por cada tejido.

Prueba de citotoxicidad: Prueba MTT

- 20 Este método permite la cuantificación de un efecto citotóxico inducido por el producto por medio de la medición de la vitalidad celular. La citotoxicidad se cuantificó mediante la medición de la disminución de la vitalidad celular con respecto a un control negativo de una muestra no tratada. La prueba se basa en la reacción de metabolización que se produce entre la sal de tetrazolio (MTT) y las enzimas mitocondriales (succinato deshidrogenasa) después del contacto con el producto para los diferentes tiempos de tratamiento: la célula vital sólo puede transformar la sal de tetrazolio en el derivado insoluble (formazano), una reacción que se puede poner en evidencia por una coloración violeta en la base del inserto.

- 25 La metabolización de la sal se produce en las células basales del epitelio en la zona que está sobre el soporte de policarbonato. La extracción del derivado que tiene un color violeta se lleva a cabo en isopropanol y la cuantificación se lleva a cabo por métodos espectrofotométricos a 570 nm.

Materiales

- 30 Sal de tetrazolio MTT (Sigma M2128) (Sigma L3771)

Solución salina (FU)

Isopropanol (Sigma)

Medio de mantenimiento (SkinEthic)

Autolector de microplaca M-200 INFINITE (TECAN)

- 35 Balanza analítica XS204 Mettler (0,00001)

Protocolo

Cuando el tiempo de tratamiento se acaba, las superficies de las epidermis tratadas se lavan con PBS (tres veces) y después se transfieren a una placa que contiene 300 µl de una solución de MTT (0,5 mg/ml en el medio).

- 40 Después de la incubación durante tres horas a 37°C, el formazano se extrae durante dos horas a la temperatura ambiente y bajo una ligera agitación. El valor de la D.O. se determina por métodos espectrofotométricos a 570 nm frente a isopropanol como blanco.

El porcentaje de citotoxicidad se calcula con respecto a los valores de la D.O. de la muestra de verificación negativa.

Análisis histológico

Las preparaciones histológicas necesarias para los análisis histológicos de la RHE se llevan a cabo por un centro especializado exterior.

- 5 Al final de todos los tratamientos se retiran las RHE de su soporte de plástico por medio de una lanceta y se someten a un proceso de fijación que emplea 10% de formalina.

PCR a tiempo real

En este estudio se emplearon los siguientes genes:

DEFB4	Hs00175474 m1
IL10	Hs00174086 m1
IL12B	Hs00233688 m1
HAS1	Hs00155410 m1
GCLC	Hs00155249 m1
GSS	Hs00609286 m1
IVL	Hs00846307 s1
FLG	Hs00863478 g1

1. Extracción de ARN

2. Síntesis de cADN a partir del ARN total

10 3. PCR

La técnica emplea sondas Taqman para detectar la señal fluorescente y es muy sensible, consistiendo en la amplificación y cuantificación de una secuencia específica de ácidos nucleicos. La detección del producto de la PCR se produce en tiempo real. La cuantificación de ADN, ADNc o ARN se lleva a cabo mediante la determinación del ciclo en el que el producto PCR puede detectarse por primera vez, por lo tanto no en el momento cuando la reacción se ha saturado. La cuantificación del producto se produce a través de la detección de la fluorescencia medida en cada ciclo; la fuerza de la señal es directamente proporcional a la cantidad de producto amplificado.

- 15

Extracción de ARN

Materiales

Kit RNAqueous (Ambion)

20 Principio del método

El RNAqueous es un método rápido para el aislamiento del ARN basado en filtro. El método se basa en la capacidad de las fibras de vidrio para unir los ácidos nucleicos en soluciones salinas concentradas.

La concentración de RNA se determina leyendo el valor de la absorbancia a 200 nm y 280 nm en una placa de 96 pocillos que era transparente a UV y empleando la siguiente fórmula:

- 25 $A_{260} \times \text{Factor de dilución} \times 40 = \text{g de ARN/ml}$

Retrotranscripción de ARN en ADNc

Materiales

Alta capacidad del Kit de transcripción inversa de ADNc

(Applied Biosystems)

30 Principio del método

El principio del método se basa en el uso de cebadores aleatorios que aseguran una síntesis eficaz de la primera hélice de todas las moléculas de ARN presentes.

cDNA se diluye y se conserva a -20°C.

PCR a tiempo real

La cuantificación determina el cambio de expresión de una secuencia de ácidos nucleicos (diana) en una muestra con respecto a la misma secuencia en una muestra calibrada que puede una muestra de control sin tratar o de la muestra en el momento de referencia.

- 5 En la cuantificación relativa se emplea un control endógeno como la "referencia activa" con el fin de normalizar el ADNc diana.

Materiales

2× TaqMan universal PCR Master Mix

Ensayo de la expresión de genes 20× TaqMan (Applied Biosystems);

- 10 GAPDH (control endógeno) Hs 999999 m1

gen diana, consulte la tabla 4.4

agua "nucleasa libre"

Procedimiento

- 15 Cada muestra biológica se evalúa en ensayos triples. El termociclador de Applied Biosystems 7500 se emplea aplicando el siguiente programa:

Condiciones	PASO 1. AmpliTaq ADN Oro Activación de polimerasa	PASO 2: 40 ciclos
TEMPERATURA	95°C	95°C 60°C
TIEMPO	10 MIN	15 s 1 MIN

Los datos generales del instrumento se registran por el software SDS 1.3.1 interno y se reportan como "datos en bruto" de la cuantificación relativa. Los resultados se exportan como Excel.

- 20 Un valor es aceptado como significativo si se sobreexpresa o desregula por una vez con respecto a la muestra de calibración.

Protocolos

Tolerabilidad cutánea y eficiencia de la función de barrera

- 25 El potencial de irritación se evalúa en el modelo de la epidermis SkinEthic después de la aplicación aguda de la biomasa en la cantidad de 50 l (1% -3% -3% + 0,8% agente de conservación) para cuatro tiempos: 24 horas-24 horas-24 horas de recuperación-48 horas-72 horas.

- 30 Tres parámetros complementarios se han estudiado con el objetivo de definir una evaluación global y predictiva de la acción biológica de la biomasa a nivel cutáneo cuando el tipo de evaluación no se ha realizado hasta el momento y representa una nueva forma de investigación en dermatología. La evaluación permite que la monitorización de la tolerabilidad se lleve a cabo y, al mismo tiempo el control de la acción biológica descrita en la literatura por medio de biomarcadores específicos.

Monitoreo de la vitalidad celular a través de la prueba MTT que define el potencial de irritación cutánea: en ese caso los inventores querían no sólo verificar el resultado después de la aplicación aguda a corto plazo (24 horas), sino también los efectos a largo plazo teniendo en cuenta el potencial actividad biológica de la biomasa.

Evaluación histológica de H & E, complementaria y para la confirmación de los valores de citotoxicidad.

- 35 Aparte del interés para la acción antimicrobiana y por lo tanto para el aumento de la protección antimicrobiana fisiológica, las beta-defensinas tienen un papel sobre la regulación global de la inmunidad innata a nivel cutáneo, ya que aumentan la proliferación celular y la producción de citoquinas específicas.

Acción sobre la síntesis del ácido hialurónico en el equilibrio redox y en los marcadores de diferenciación terminal (Filagrina e involucrina) en el Modelo Ft-piel con respecto a GABA

Los productos (1% de biomasa y GABA) se aplican en cantidades de 50 l en la superficie del tejido y después se aplican de nuevo cada día durante 3 días = 72 horas. Al final del tratamiento los tejidos se procesan para la RT-PCR.

Este tipo de tratamiento en ausencia de estímulos negativos y sobre un tejido en una situación "fisiológica" permite efectos biológicos tras una exposición repetida al ingrediente y su mecanismo de acción que se pondrá en evidencia a nivel dérmico.

El control de GABA positivo aplicado a la dosis de 1 mm ha sido elegido debido a que su eficiencia se documenta en la literatura tanto en la síntesis de ácido hialurónico como en la protección frente al estrés oxidativo a través de la mayor producción de GSH, un antioxidante no enzimático hidrófilo.

Adquisición de datos

Los datos generales obtenidos mediante el instrumento ABI PRISM 7500 son registrados por el software SDS 1.3.1. interno y se presentan como datos brutos de cuantificación relativa. Los resultados se exportan como Excel.

Un valor es aceptado como significativo si se sobreexpresa o es el desregulado por una vez con respecto a la muestra de calibración.

Las muestras histológicas (portaobjetos de vidrio) se analizaron por medio del microscopio Leica DM2500, las imágenes se guardan y se procesan mediante el software Leica Application Suite (LAS).

Las modificaciones morfológicas de los tejidos se comparan con los tejidos no tratados.

Resultados

Tolerabilidad cutánea

Resultados de la prueba MTT expresados como % de la vitalidad celular calculada con respecto a la muestra de control negativo. Los resultados de la prueba de MTT en todos los tiempos definidos muestran que ninguna actividad citotóxica se puede atribuir al compuesto bajo examen, es decir, la biomasa de LB plantarum.

La presencia de un agente conservante antimicrobiano (Isocida 0,8%) no afectó a los resultados de la citotoxicidad.

Se hace hincapié en que la vitalidad celular después del tratamiento con la biomasa, tanto en el 1% como al 3% aumentó (en los tiempos de 24 horas + recuperación y 48 horas) más allá del valor de la variabilidad intrínseca de la prueba (+/- 15%) con un aumento del 40% con respecto al 100% atribuido a la muestra de control negativo.

Dicho resultado ofrece una valencia superior considerando también el hecho de que el tiempo de 24 horas + 24 horas de recuperación es un tratamiento particularmente severo, ya que permite que se observen los efectos de la toxicidad retardada.

En ausencia de otros elementos de la toxicidad a nivel histológico tal aumento se puede correlacionar con una estimulación de la proliferación celular que es inducida por el tratamiento con la biomasa.

Tratamientos de 24 horas

Ninguna modificación significativa en los tejidos tratados con la biomasa con respecto a la muestra de control negativo al 1%. Al 3%, y en presencia del agente conservante se observa que para algunas células basales hay una pérdida de cohesión y un citoplasma ligeramente hinchado (espongiosis).

Tratamientos de 24 horas + recuperación de 24 horas

Ninguna modificación significativa se observa con respecto a la muestra de control de 24 horas.

Tratamientos de 48 horas

Ninguna modificación morfológica significativa se observó con respecto a la muestra de control, aumento en el espesor de la epidermis tanto en el 1% como al 3%.

En presencia del agente conservante se observa una capa córnea ligeramente engrosada, con marcas de descamación de superficie (S. disjunctum)

Tratamientos de 72 horas

Tanto en el 1% como al 3% se observa una disminución del espesor de la epidermis vital que no es significativa con respecto a la muestra de control lo que está en conexión con la evolución fisiológica del tejido.

RT-PCR

Después de un tratamiento con la biomasa a las diversas concentraciones que se probaron se observa que ya a las 24 horas la acción de la estimulación de la expresión de las beta-defensinas continua sin agotar el tiempo hasta las 72 horas, donde, de todos modos, tiene el doble valor con respecto a la muestra de control (PBS). Este resultado corresponde a una estimulación significativa de un aumento de la protección antimicrobiana fisiológica.

- 5 La presencia del agente conservante antimicrobiano afecta a los parámetros del estudio globalmente, con una reducción de los valores absolutos pero el comportamiento de la biomasa se mantiene justo igual; la inducción de la expresión de beta-defensina 2.

Medición de Teer

Los valores de TEER se refieren a un promedio de dos tejidos en los que se llevan a cabo dos mediciones.

- 10 En cuanto al valor de TEER, los siguientes elementos son relevantes: la presencia de una estructura laminar compacta en el nivel de la capa córnea, de uniones estrechas integrales y el espesor de la epidermis que definen globalmente una función de barrera eficiente. Cada tejido es la referencia adecuada con mediciones en $t = 0$ y a $t =$ un tiempo finito.

- 15 A las 24 horas + 24 horas de recuperación, tanto en los tejidos tratados como en el PBS = muestra de control no tratada del lote se observó un aumento significativo de TEER.

El resultado de 48 horas es particularmente interesante, al que las histologías más interesantes corresponden (aumento en el grosor de la epidermis) después del tratamiento con la biomasa.

A una concentración del 1% se observó un aumento significativo en TEER, como ocurre también al 3% a pesar de que el valor de TEER es menos agudo debido a una alta desviación estándar.

- 20 Este aumento es una consecuencia directa tanto del aumento en el espesor de la epidermis como de la mejor compacidad y la integralidad de la capa córnea a nivel de las uniones estrechas.

A las 72 horas no se pone ningún efecto sobre el parámetro en pruebas, y la tendencia es de todos modos hacia una disminución de TEER después del tratamiento, siendo correlacionada dicha disminución en parte con la disminución en el espesor que se observa en histologías.

- 25 Glutamato-cisteinil ligasa

La GCLC es el precursor enzimático de la síntesis de GSH: su expresión ha sido estudiada a partir de tiempos prematuros después de la aplicación (8H) ya que el equilibrio redox es el primer mecanismo epidérmico de defensa antioxidante.

No se ha evidenciado modulación de genes en las condiciones experimentales elegidas.

- 30 Glutatión sintetasa

La GSS es la enzima que limita la síntesis del antioxidante no enzimático hidrófilo glutatión que está presente principalmente en el nivel de la epidermis.

- 35 La modulación de genes se observa sólo como una tendencia a las 24 horas, tanto para GABA como para la biomasa, pero los valores de expresión son muy bajos e irrelevantes. De todos modos, es importante hacer hincapié en que la significativa sub-expresión a tiempos prematuros es indirectamente una señal positiva en cuanto a la compatibilidad del producto y su acción fisiológica en la dermis o al nivel de la epidermis: en ausencia de estímulos externos (por ejemplo, estrés oxidativo inducido) el equilibrio redox fisiológico que no pide un aumento de la síntesis de GSH se mantiene.

Hialuronato sintetasa

- 40 Thw HAS es la enzima encargada de la síntesis del ácido hialurónico; dicha síntesis se lleva a cabo por los fibroblastos a nivel dérmico; es importante hacer hincapié en el hecho de que la estimulación de la actividad de los fibroblastos en ausencia de estímulos negativos es importante para la eficiencia esperada sobre la piel sana y para el uso diario.

- 45 Su expresión se aumenta por la acción de GABA a las 24 y 48 horas, como se describe en la literatura y con una evidencia más alta por el tratamiento de la biomasa a las 24 horas, donde se observa una expresión de triple valor con respecto a la muestra de control (Fig. 9).

La desviación estándar de alta requiere una nueva prueba para comprobar los datos obtenidos.

Filagrina

La profilagrina, el precursor de 400 kDa de la filagrina es el principal componente de los gránulos de queratohialina en la epidermis humana.

Después de la diferenciación terminal en la capa córnea, la profilagrina se transforma en filagrina, una proteína de 37 kD.

- 5 La filagrina contribuye a la agregación y a la compactación de la queratina en el citoesqueleto, y provoca la formación del involucrum córneo, que es la parte más externa del cuerpo humano.

Marcador de la diferenciación epidérmica, la filagrina se considera que es una proteína clave para la función de barrera y un elemento fundamental en la formación de NMF.

- 10 Después de la destrucción de esa barrera, se produce una pérdida de calcio y una disminución en los niveles de ARNm de filagrina.

Tanto el tratamiento con GABA como con BIOMASS inducen a una sobre-expresión del gen que es evidente para el GABA ya a las 24 horas y es significativa para ambos a partir de las 72 horas; la biomasa ha inducido una expresión de los genes más alta que el GABA (Fig. 10).

Involucrina

- 15 Una proteína citoplasmática, soluble, de 68 kD y el marcador de la diferenciación terminal de keratinocitos.

Es el sustrato de la transglutaminasa en queratinocitos y funciona como una 'estructura' para la formación del del involucrum córneo en la epidermis.

La expresión génica se inicia en la capa espinosa y se mantiene en la capa granulosa.

- 20 Después de la destrucción de la barrera se producen una pérdida de calcio y una disminución en los niveles de ARNm de involucrina.

Funciona como una 'estructura' también para los lípidos (ceramidas, colesterol y ácidos grasos).

Globalmente no se produce modulación significativa del gen en las condiciones experimentales elegidas (Fig. 11).

- 25 Se procedió a confirmar lo que se había observado en FT-piel con respecto a la expresión de filagrina e involucrina también sobre la base de su modelo epidérmico (RHE) para la biomasa del 1%; los resultados confirman una modulación significativa para filagrina y una modulación insignificante para involucrina.

Conclusiones

Este trabajo de investigación, realizado con el objeto de demostrar la eficacia de la biomasa procedente de *Lactobacillus plantarum* en diferentes mecanismos cutáneos en la epidermis y el nivel dérmico, ha demostrado:

- 30 El potencial irritante sobre RHE: la tolerabilidad del compuesto de biomasa aplicado al 1% y al 3% para los tiempos de 24 a 72 horas es total, sin ningún signo de toxicidad, se evidencia tanto a través tanto de parámetros celulares (citotoxicidad) como por morfológica (H & E), a nivel del tejido vital.

- 35 La biomasa ha inducido un estímulo de proliferación celular tanto al 1% como al 3% sobre la base de los datos de la vitalidad celular más alta que la muestra de control negativo, del aumento en el espesor epidermis vital y de la expresión de beta-defensinas-2 que además sugiere una reacción fisiológica de la estimulación a la defensa antimicrobiana.

- 40 Acción sobre la función de barrera en RHE: El resultado confirma la función GABA reconocida ya que la medición de la TEER señala un significativo aumento de 48 horas en la TEER y al que las histologías más interesantes corresponden (aumento en el grosor de la epidermis) después del tratamiento con el biomasa, tanto al 1% como al 3%. El resultado es la consecuencia directa tanto del aumento en el espesor de la epidermis como en la mejor compacidad y la integralidad de la capa córnea a nivel de las uniones estrechas.

Acción sobre la síntesis de ácido hialurónico y sobre el equilibrio redox en el modelo FT-piel con respecto al ácido gamma-aminobutírico (GABA)

- 45 Después de repetidas aplicaciones de 3 días de la biomasa al 1% se ha observado una significativa sobre-expresión de la hialuronato sintetasa, en una cantidad superior a los valores obtenidos con GABA. El valor de estos datos está conectado al hecho de que se confirma la literatura sobre GABA y define la biomasa como un producto que, cuando se aplica tópicamente, ejerce una acción de estimulación constante prematura de los fibroblastos en la neo-síntesis del ácido hialurónico.

La acción de estimulación fisiológica a la síntesis de ácido hialurónico plantea la hipótesis de un resultado dermatológico de:

una turgencia mayor de la dermis correlacionada con una mayor capacidad de las fibras de dermis para mantener el agua a un nivel profundo,

5 una mejor elasticidad cutánea con el tiempo debido a que las fibras elásticas y las fibras de colágeno están envueltas dentro de una matriz que es característica de la piel joven y elástica (es decir, una piel rica en agua en profundidad).

10 Acción sobre los marcadores de diferenciación terminal: filagrina e involucrina monitoreadas en el modelo FT-piel: después de la aplicación repetida durante 3 días la involucrina ha demostrado ser no modulada, mientras que era observado un aumento significativo en la expresión de filagrina inducida tanto por la biomasa como por GABA. Tales resultados ponen en evidencia la eficacia de la biomasa en el relanzamiento de los mecanismos de producción del factor natural de hidratación NMF sintetizado en el nivel de la capa granular.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Giuliani S.p.A.	
5	<120> Procedimiento para la preparación del ácido gamma-aminobutírico (GABA) por medio de bacterias de ácido láctico (LAB) sobre el excedente de la industria agrícola y alimentaria	
	<130> PCT27328	
10	<150> RM2007A000398 <151> 17-07-2007	
	<160> 3	
15	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 496	
	<212> DNA	
20	<213> Lactobacillus plantarum	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (2)..(2)	
25	<223> "n" es a o c o g ó t/u	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (4)..(4)	
30	<223> "n" es a o c o g ó t/u	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (13)..(13)	
35	<223> "n" es a o c o g ó t/u	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (19)..(19)	
40	<223> "n" es a o c o g ó t/u	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (20)..(20)	
45	<223> "n" es a o c o g ó t/u	
	<400> 1	
	gnangctatt cangcctggn cctggcaact tttgtgcaga cctatatgga acccgaagcc	60
	gttgaattga tgaaggatac gctggctaag aatgccatcg acaaattctga gtacccccgc	120
	acggccgaga ttgaaaatcg gtgtgtgaac attattgcca atctgtggca cgcacctgat	180
	gacgaacact ttacgggtac ctctacgatt ggctcctctg aagcttgtat gttaggcgg	240
	ttagcaatga aattcgccctg gcgtaaacgc gctcaagcgg caggtttaga tctgaatgcc	300
	categacctt accctggtat ttcggctggc tatcaagttt gctgggaaaa gttttgtgtc	360
	tactgggacg ttgttttttt ttttttttcc caatggatga gcaacacgtg gcccttgggg	420
	ttaaacacgt ctacggcttg ggccgagaat cgcttggtat ttttttgtaa acaaggcgtc	480
	ccctttaccc ctgccc	496
	<210> 2	

<211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial

5 <220>
 <223> cebador directo del núcleo del gen de GAD
 <400> 2

10 cctcgagaag ccgacgcgtt agttcg 26

<210> 3
 <211> 27
 <212> DNA

15 <213> artificial

<220>
 <223> cebador inverso del núcleo del gen de GAD

20 <400> 3
 tcatattgac cggataagt gatgccc 27

REIVINDICACIONES

1. *Lactobacillus plantarum* DSM 19463 o *Lactococcus lactis* ssp. DSM 19464 o sus asociaciones.
2. El uso de *Lactobacillus plantarum* DSM 19463 o de *Lactococcus lactis* ssp. DSM 19464 o sus asociaciones para la preparación de una mezcla probiótica enriquecida con ácido gamma-aminobutírico.
- 5 3. Un procedimiento para la preparación de una mezcla probiótica enriquecida con ácido gamma-aminobutírico que comprende los pasos siguientes:
 - a) la propagación en un medio de cultivo de *Lactobacillus plantarum* DSM 19463 o de *Lactococcus lactis* ssp. DSM 19464 durante 24 horas a 30°C;
 - 10 b) la resuspensión de la biomasa obtenida en el paso a) en una alícuota de sustrato añadido con L-glutamato monosódico 20 mM, siendo dicho sustrato un mosto de acuerdo con una densidad celular de aproximadamente 10⁹ ufc/g;
 - c) la inoculación de los sustratos al 1-4% y 72-96 de fermentación horas, preferiblemente 72-78 horas de fermentación, a una temperatura de 30 a 33°C, preferiblemente a 30°C.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el medio de cultivo de la etapa a) es MRS o M17.
- 15 5. El procedimiento según las reivindicaciones 3-4, en el que el mosto se diluye con agua de levadura o se añade con un extracto de levadura.
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que el mosto se diluye con agua de levadura y con agua destilada y la mezcla 50:50 se desacidifica por medio de NaOH 1 N a un valor de pH 6,0 a 6,5, preferiblemente a un pH de 6,0.
- 20 7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que el mosto se añade con piridoxal 5-fosfato.
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, que comprende además una etapa d) de desecación o liofilización del sustrato de fermentación que se obtiene de la etapa c).
- 25 9. La mezcla enriquecida con ácido gamma-aminobutírico por medio de un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-8, comprendiendo dicha mezcla *Lactobacillus plantarum* DSM 19463 o *Lactococcus lactis* ssp. DSM 19464 o sus asociaciones.
10. La mezcla enriquecida con ácido gamma-aminobutírico según la reivindicación 9, que comprende al menos 890 mg de ácido gamma-aminobutírico por 100 g de sustancia seca.
- 30 11. La mezcla enriquecida con ácido gamma-aminobutírico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-10, que comprende además vitaminas, minerales, polifenoles y bacterias lácticas vivas y vitales.
12. Una composición farmacéutica o cosmética que comprende una mezcla enriquecida con ácido γ-aminobutírico según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, como principio activo, junto con uno o más excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente o cosméticamente aceptables.
- 35 13. El uso de la mezcla enriquecida con ácido γ-aminobutírico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11 como un cosmético.
14. El uso de la mezcla enriquecida con ácido gamma-aminobutírico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11 o que tiene la composición de acuerdo con la reivindicación 12 para la preparación de un medicamento para uso en dermatología.
- 40 15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 para uso en el tratamiento de los daños renales.

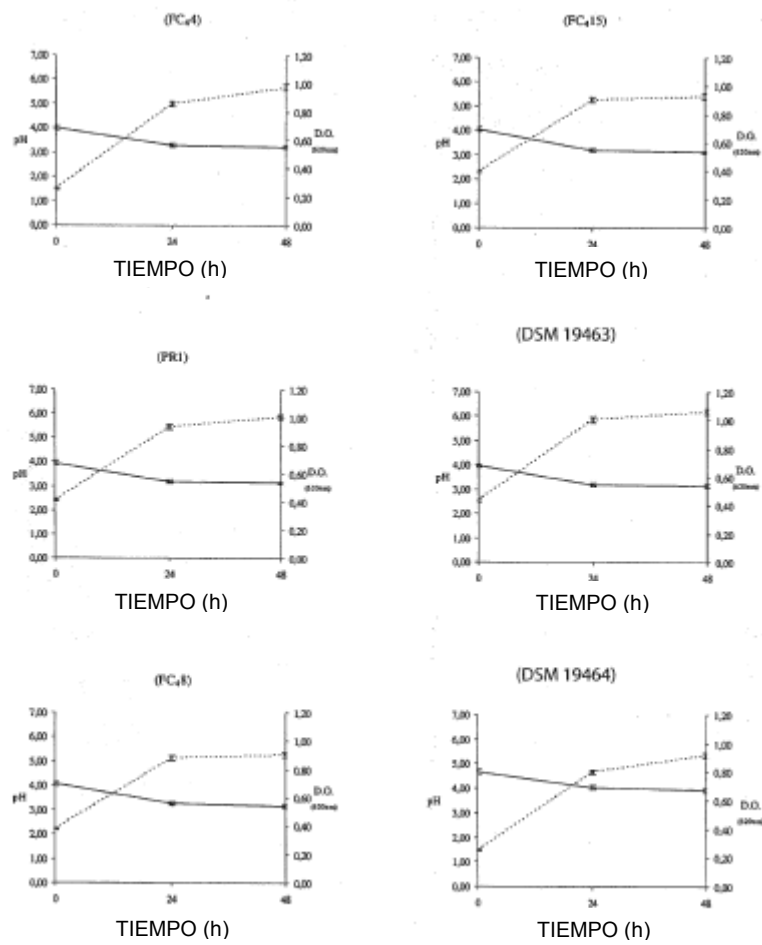


Fig. 1

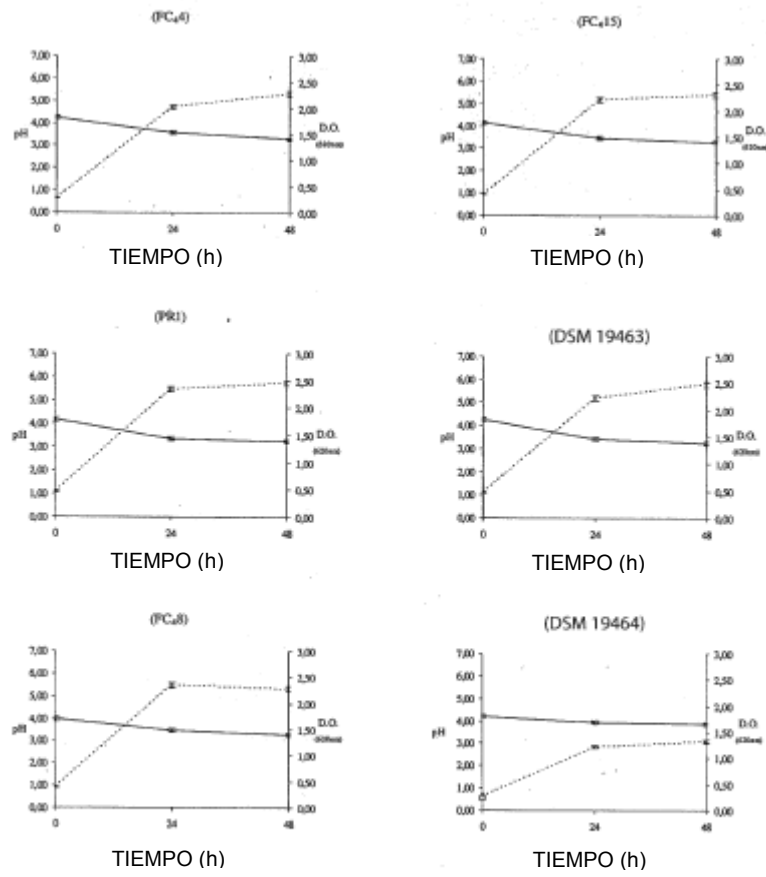


Fig. 2

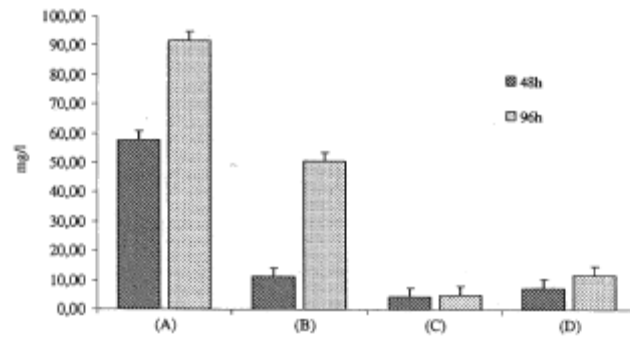


Fig. 3

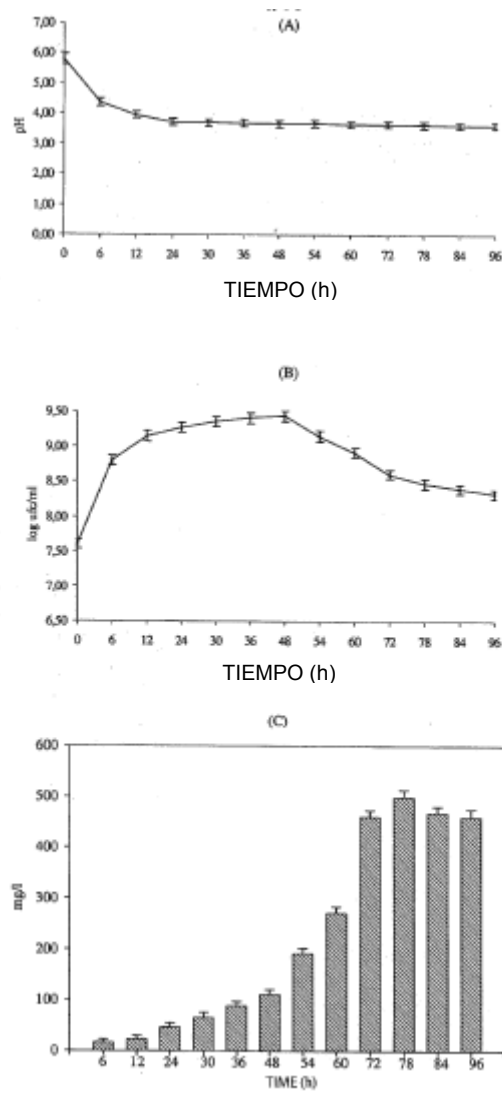


Fig. 4

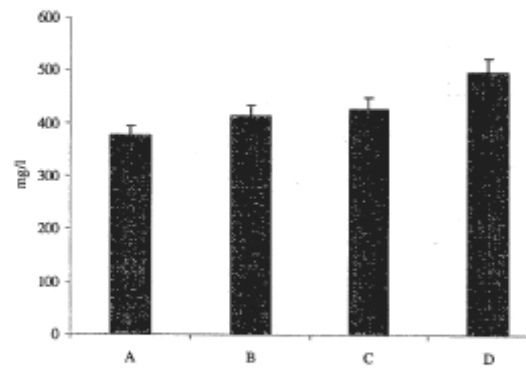


Fig. 5

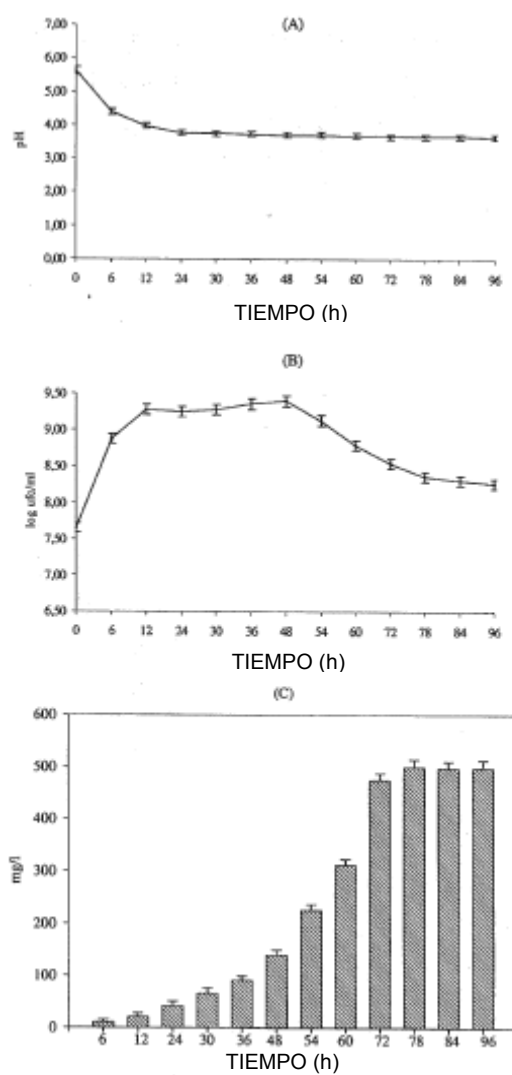


Fig. 6

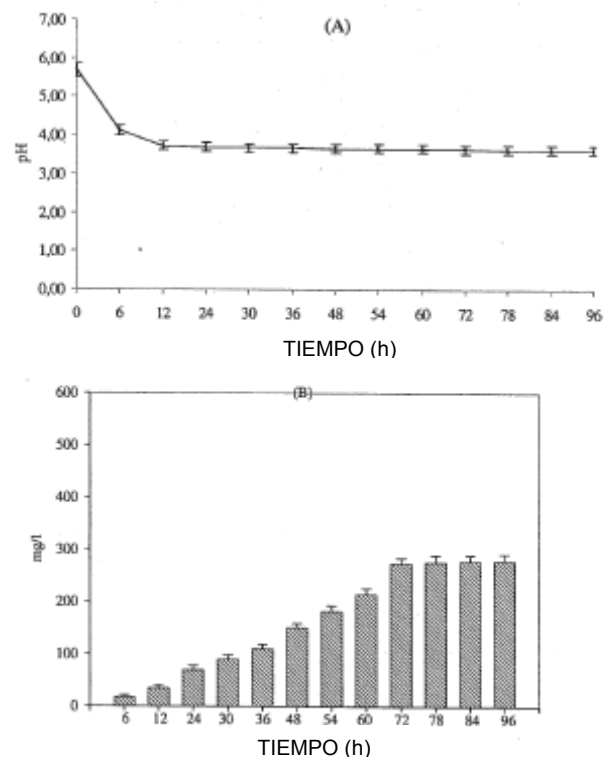


Fig. 7

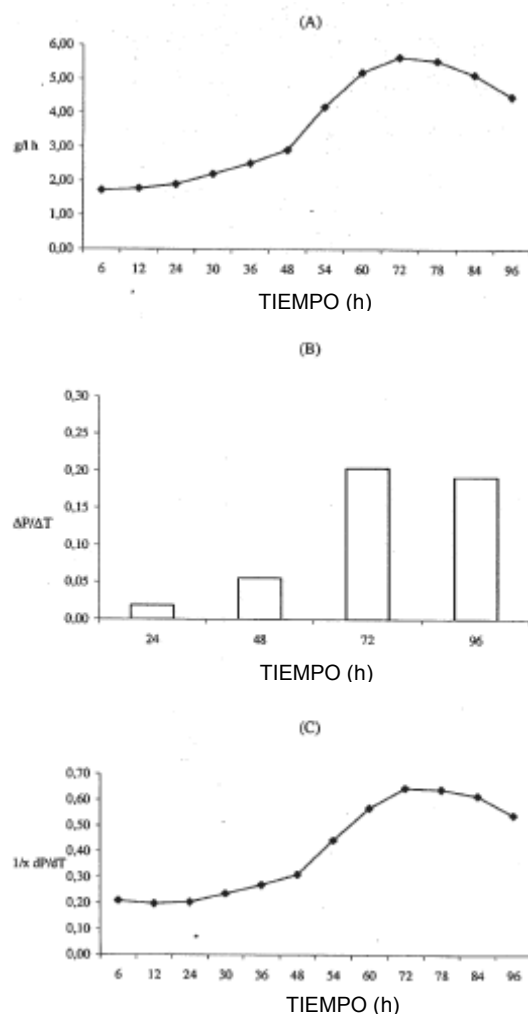


Fig. 8

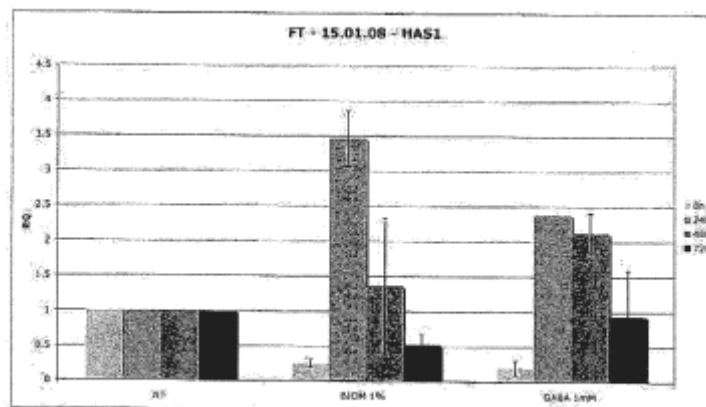


Fig. 9

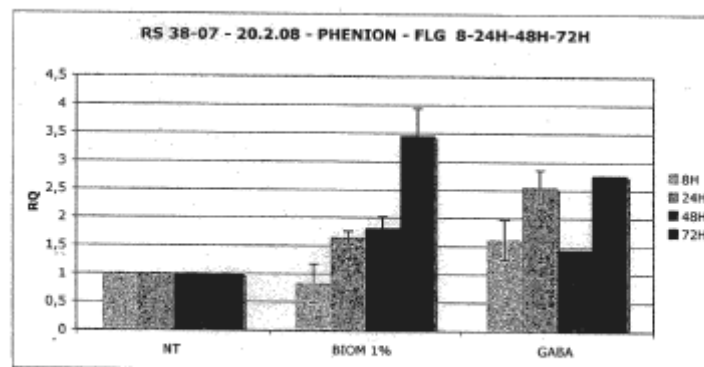


Fig. 10

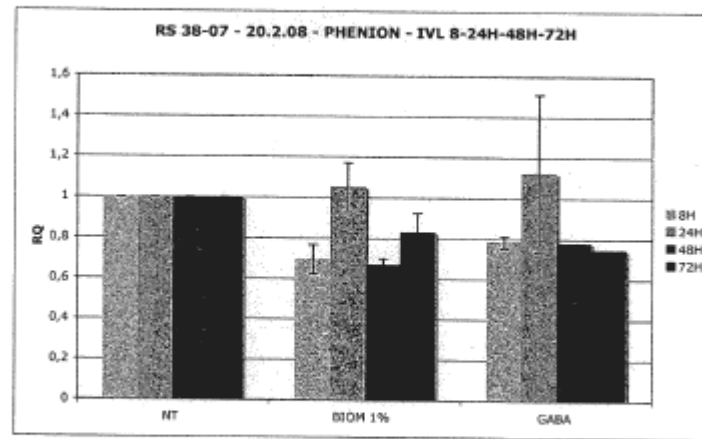


Fig. 11