

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 944**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A23L 33/00 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2010 E 14190648 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2848682**

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

30 Prioridad:

10.03.2009 WO PCT/ES2009/000130

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

10.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

Observaciones:

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

ES 2 636 944 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).

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

DESCRIPCIÓN

5

Sector técnico de la invención

10 El objetivo general del presente estudio es aislar microorganismos probióticos para un posterior uso en la industria alimentaria o farmacéutica, especialmente para utilizarlos en leche de fórmula para lactantes. Dichos microorganismos presentan valores elevados de resistencia al pH, sales biliares y de adhesión a células intestinales, y, por lo tanto, son especialmente adecuados para el uso en las industrias mencionadas anteriormente.

Antecedentes de la invención

15

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

20

25

Existen antecedentes muy antiguos que relacionan los efectos beneficiosos derivados del consumo de alimentos con alto contenido en bacterias, tal como en la versión del Antiguo Testamento donde se dice que Abraham atribuye su longevidad al consumo de leche, o el historiador romano Plinio, que en el año 76 a.c. recomendó el uso de productos lácteos fermentados para el tratamiento de la gastroenteritis (Senmier y De Vrese 2001).

30

A comienzos del siglo pasado, el microbiólogo ruso Elie Metchnikoff (1845-1916) sugirió que el consumo de leche fermentada modulaba la microbiota intestinal produciendo un efecto positivo en la salud humana (Metchnikoff 1908). Fijó su atención en el hecho de que en Bulgaria existía una cantidad inaudita de personas centenarias, a pesar de ser uno de los países europeos más pobres. Observó que los búlgaros consumían gran cantidad de yogur. Metchnikoff logró aislar las bacterias responsables de la producción del yogur y la utilizó en sus investigaciones.

35

Esto fue el inicio del estudio de los probióticos. Metchnikoff se volvió un firme defensor del concepto de que la dieta puede proteger al cuerpo de la invasión de patógenos y, en consecuencia, mejora y prolonga la calidad de vida. Fue además la primera persona en desarrollar un preparado utilizando lactobacilos en forma de cápsula para ingerir por vía oral, denominado Lactobacilina.

40

Al mismo tiempo, el microbiólogo francés Tissier observó que la microbiota fecal de recién nacidos alimentados con lactancia materna presentaban más bacterias del género *Bifidobacterium* que la microbiota fecal de niños que habían recibido leche artificial y reconoció el papel beneficioso de este microorganismo.

45

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

50

En 1965 Lilly y Stillwell utilizaron por primera vez el término "probiótico", para nombrar a los productos de la fermentación gástrica. Pero la definición de probiótico más válida y ampliamente usada será la enunciada mucho más tarde por Fuller (Fuller 1992, Fuller 1989). Los probióticos se definen como: "complementos de microorganismos vivos que añadidos a los alimentos ejercen efectos beneficiosos en la salud del receptor, dado que condicionan una mejora en su balance microbiano intestinal". Para el ser humano adulto esto incluye tanto productos derivados de la leche fermentada como preparados liofilizados con estas bacterias.

55

En 1998, el International Life Science Institute (ILSI) en Bruselas, definió a los probióticos como microorganismos vivos que, cuando se ingieren en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, cuyo efecto está muy por encima de los efectos nutritivos convencionales. Afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo. Proporcionan un mejor estado de salud y bienestar, y/o reducen el riesgo de enfermedades. Pueden ser funcionales para la población en general o para grupos particulares de la misma.

60

Hoy día existen criterios para la definición de microorganismos probióticos:

1. Son de origen humano.

2. Son de naturaleza no patógena.
3. Son resistentes a la destrucción por procedimientos técnicos.
4. Son resistentes a la destrucción por el ácido gástrico y bilis.
5. Se adhieren al epitelio intestinal.
- 5 6. Son capaces de colonizar el tracto gastrointestinal.
7. Producen sustancias antimicrobianas.
8. Modulan la respuesta inmunitaria.
9. Influyen en las actividades metabólicas humanas (asimilación de colesterol, producción de vitaminas etc).

10 Las bacterias probióticas pueden influir en todas las células intestinales y en los mecanismos de acción de estas células, incluyendo los efectos sobre la microbiota (Backhed y Ley 2005), la modulación de la función inmunitaria (Picard *et al.* 2004; Kalliomaki 2004) y el aumento de la función de la barrera epitelial (Madsen *et al.* 2001; Isolauri y Salminen 2005).

15 Entre las bacterias con actividad probiótica, las del género *Bifidobacterium* son las más abundantes en el intestino, con el 25 % de bacterias en el colon de un adulto y el 95 % en el recién nacido con lactancia materna. Hoy día hay muchos productos alimenticios (yogur y leche) que están complementados con este tipo de bacterias. Otras cepas que también tiene actividad probiótica son las del género *Lactobacillus*, que, de acuerdo con estudios "in vitro",
 20 inhbien la adhesión de otras bacterias anaeróbicas como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y enterobacteriaceas (Silva *et al.* 1987).

El uso de probióticos como herramienta médica en algunas patologías está muy aceptado y la prueba de la eficacia de los mismos es fuerte, principalmente como resultado de los estudios clínicos y del meta-análisis para malabsorción de lactosa (Adolfsson *et al.* 2004; Piaia *et al.* 2003), infecciones gastrointestinales (Brownlee *et al.*
 25 2003) y diarrea asociada al uso de antibióticos (D'Souza *et al.* 2002). Además, el uso de bacterias probióticas, ya sean bifidobacterias, lactobacilos y/o una mezcla de las mismas, han mostrado efectos beneficiosos sobre algunas enfermedades digestivas. La evidencia en la bibliografía sobre los efectos beneficiosos es muy amplia.

La comprensión de la relación existente entre los componentes de la microbiota intestinal así como de la interacción
 30 con el hospedador es muy compleja. El genoma facilita el análisis de la respuesta de bacterias aisladas a las condiciones intestinales, revelando en parte la capacidad metabólica de las cepas, sin embargo, las condiciones en las cuales se pueden expresar estas capacidades, así como las condiciones que permiten aislar la mayor parte de las cepas que componen la microbiota intestinal, siguen siendo en gran parte desconocidas, pudiendo ser solo identificadas mediante herramientas moleculares que identifican su genoma en parte o totalmente. Debido a esta
 35 razón, el desarrollo en el área de los probióticos y de los alimentos funcionales está en pleno desarrollo.

MISRA A K ET AL: "CULTURAL AND BIOCHEMICAL ACTIVITIES OF BIFIDO-BACTERIUM BIFIDUM", MILCHWISSENSCHAFT, GMBH VOLKSWIRTSCHAFTLICHER VERLAG, MUNICH, AL, vol. 45, n.º 3, 1 de enero de 1990, páginas 155 - 158, describen el aislamiento de especies de *Bifidobacterium* basándose en la fermentación de
 40 azúcares. En este trabajo no se han descrito cepas de *B. breve*.

WASILEWSKA E ET AL: "ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BIFIDOBACTERIUA FROM INFANT GUT", POLISH JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION SCIENCES, POLSKA AKADEMIA NAUK, OLSZTYN-KORTOWO, PL, vol. 12/53, n.º SI, 1 de enero de 2003, páginas 90 - 94, describe el aislamiento de cepas de *B. breve* a partir del
 45 intestino de lactantes, con el objetivo de usar las mismas en estudios adicionales sobre la selección de cepas probióticas de *Bifidobacterium* que tengan la capacidad de establecerse en el intestino humano.

El documento EP1997499 divulga dos cepas de *B. breve*, concretamente CECT 7263 y CECT 7264, a usarse como
 50 probióticos para la prevención o el tratamiento de la mastitis.

El documento WO2005/039319 describe una preparación que comprende *B. breve* y una mezcla de hidratos de carbono no digeribles para lactantes que no se alimentan con leche materna, o lo hacen parcialmente, así como el uso de la misma para el tratamiento o la prevención de trastornos inmunitarios en lactantes que no se alimentan con
 55 leche materna, o lo hacen parcialmente. Entre las posibles cepas de *B. breve*, se han citado las siguientes: *B. breve* cepa Ba-03 de Rhodia, *B. breve* MV-16 de Morinaga, *B. breve* del Institut Rosell, *B. breve* DSM 20091 y *B. breve* LMG 11613.

El documento EP0577904 describe un cultivo biológicamente puro de *B. breve* cepa CNCM 1-1226 para su uso como probiótico.
 60

Por lo tanto, teniendo en cuenta que existen distintos efectos entre las cepas de probióticos y que variedades de bacterias pertenecientes a la misma especie pueden presentar características fisiológicas distintas, que les otorguen propiedades probióticas distintas o mejoradas frente a otras bacterias, la identificación y caracterización de los efectos de nuevas cepas prebióticas es muy importante a la vista de su interés para la salud e industrial.

El objetivo general del presente estudio es aislar microorganismos probióticos con propiedades probióticas mejoradas de resistencia a pH ácido, resistencia a sales biliares y de adhesión a células intestinales, para un posterior uso en la industria alimentaria o farmacéutica, en especial para utilizarlos en leches de fórmula para lactantes.

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

La mayor resistencia de las cepas objeto de la invención al pH y a las sales biliares, confiere a los microorganismos probióticos una mayor supervivencia a medida que pasan por el estómago y el intestino, y así aumenta su efecto colonizador y, por lo tanto, sus efectos antagónicos frente a otras bacterias potencialmente patógenas. Por otra parte, la mayor adherencia a las células intestinales humanas de las cepas de probióticos que constituyen el objeto de la invención, hace posible una mayor acción sobre toda la modulación del sistema inmunitario.

Objeto de la invención

La presente invención proporciona microorganismos probióticos aislados de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna. Dichos microorganismos, debido a sus propiedades probióticas que tienen efectos beneficiosos en la salud de quienes los ingieren, se utilizan en la industria alimentaria o farmacéutica, en especial para su uso en leche de fórmula para lactantes.

Para el aislamiento de dichos microorganismos probióticos, la presente invención propone los siguientes objetivos específicos:

- a) aislar cepas de bacterias lácticas obtenidas de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna; b) evaluar la resistencia al pH y a sales biliares y c) evaluar la adherencia a células epiteliales intestinales.

Es habitual buscar bacterias probióticas en las heces de los bebés. Además, hay cierta tradición de recomendar que los probióticos deben ser de origen humano, supuestamente porque se implantarían mejor en el intestino humano. Sin embargo, muchas de las cepas aisladas no cumplen con la condición de probiótico dado que rara vez son resistentes a los jugos digestivos, o no lo son, y muchas de ellas no se adhieren al epitelio intestinal. En la presente invención se seleccionan bebés alimentados exclusivamente con leche materna para asegurar que las bacterias aisladas no son bacterias comerciales. Además, se ha demostrado que la microbiota intestinal de los bebés alimentados con leche materna es muy rica en bifidobacterias y lactobacilos.

En referencia a los probióticos, un probiótico eficaz debe caracterizarse por:

1. Su capacidad para ejercer un efecto beneficioso sobre el hospedador. Por ejemplo, la resistencia a enfermedades.
2. No provoca patogenicidad o toxicidad.
3. Su capacidad de sobrevivir al paso por el tracto intestinal. Por ejemplo, la resistencia al ácido gástrico y a ácidos biliares.
4. Su capacidad para mantener la adherencia a las células de la pared intestinal.
5. Su tiempo de generación breve y estable, y su capacidad de ser viable durante periodos prolongados en condiciones de almacenamiento.
6. Su origen humano.
7. Produce sustancias antimicrobianas frente a patógenos, tiene propiedades antineoplásicas.
8. Su capacidad de influir en la actividad metabólica.

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

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

Por lo tanto, la presente invención se refiere a nuevos microorganismos probióticos aislados de heces de bebés. La invención se refiere de forma específica al microorganismo *Bifidobacterium breve* HERO 15B (CNCM 1-4035). Dicho microorganismo tiene propiedades probióticas mejoradas frente a microorganismos de la misma especie.

Formulación se refiere a las composiciones o grupos de uno o varios ingredientes, es decir, la clase y cantidad de

los elementos presentes en una sustancia compleja (producto alimenticio o forma farmacéutica, entre otros) y la proporción en que se encuentren.

5 “Vehículo” se entiende como cualquier tipo de sustancia que permite el cultivo, transporte y/o administración de la cepa de la presente invención. En función del fin y/o uso al que dicha cepa se destina, los “vehículos” podrían ser de distinta naturaleza. La presente invención se refiere a “vehículos” farmacéuticamente aceptables tales como los asociados habitualmente con las cápsulas, comprimidos o polvo, así como a “vehículos” formados por ingredientes o productos alimenticios.

10 Los productos alimenticios destinados a dietas especiales son productos alimenticios que debido a su composición particular o al proceso particular para fabricarlos, se distinguen claramente de los productos alimenticios básicos, los cuales son adecuados para el objetivo nutritivo indicado y que se comercializan indicando que cumplen con dicho objetivo. (Directiva del Consejo 89/398/CEE de 3 de mayo de 1989, concerniente a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembro sobre los productos alimenticios destinados a dietas especiales. (DO serie L
15 n.º 186 de 30 de junio)).

Se entiende por dietas especiales las que deben satisfacer las necesidades nutritivas particulares de:

20 i) determinadas clases de personas que tienen un trastorno del proceso de asimilación o del metabolismo, o
ii) determinadas clases de personas que se encuentran en estados fisiológicas particulares y que, por lo tanto, obtienen beneficios especiales de una ingestión controlada de determinadas sustancias alimenticias, o
iii) los bebés o los niños de corta edad con buena salud.

25 Complemento alimenticio se refiere a los productos alimenticios cuyo fin sea complementar la alimentación normal y que consisten en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, de una manera individual o combinada, comercializados en formas farmacéuticas, es decir cápsulas, pastillas, comprimidos, píldoras, comprimidos, pastillas y otras formas similares, bolsitas de polvos, ampollas de líquido, frascos con gotero y otras formas similares de líquidos y polvos que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias; (Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 10 de junio de 2002, concerniente a la
30 aproximación de las legislaciones de los Estados Miembro en materia de complementos alimenticios).

Probiótico se refiere a las preparaciones de células microbianas o a células microbianas, o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso en la salud y el bienestar del hospedador.

35 Prebiótico se entiende como “un ingrediente de la alimentación que no es digerible, que beneficia y estimula el crecimiento de bacterias intestinales, mejorando el equilibrio intestinal del hospedador”. Entre de los prebióticos utilizados están: inulina, oligofruetosacáridos, galactooligosacáridos, oligosacáridos procedentes de la hidrólisis de pectinas y otras gomas y mucílagos, y almidones y maltodextrinas resistentes, así como nucleótidos.

40 Un objeto de la presente invención se refiere a la cepa de microorganismo probiótico aislada de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna, caracterizada por consistir en *Bifidobacterium breve* HERO 15B (CNCM I-4035).

45 En una realización, la cepa descrita anteriormente se presenta en forma de cultivo biológico puro. En otra realización la cepa se aísla.

En una realización, la cepa de microorganismo anteriormente descrita se presenta en forma de células viables; en otra realización la cepa se presenta en forma de células no viables.

50 Otro objeto de invención se refiere a la formulación que comprende una cepa de microorganismo, como se ha descrito anteriormente. En una realización particular, dicha formulación comprende otro material probiótico, en otra realización, comprende adicionalmente material prebiótico.

55 En otra realización particular, la formulación descrita comprende un vehículo adecuado para su ingestión. Dicho vehículo es farmacéuticamente aceptable, tal como los habitualmente asociados con cápsulas, comprimidos o polvo.

60 En otra realización particular, dicho vehículo es un producto alimenticio. Dicho producto alimenticio se selecciona del grupo que consiste en leches y productos derivados de la leche, en especial leches fermentadas y quesos; cereales y derivados, incluyendo masas de pan; sopas y otros productos similares en forma deshidratada; productos cárnicos fermentados; derivados de frutas, zumos y refrescos; alimentos para usos nutricionales específicos.

Otro objeto de invención se refiere a la cepa de microorganismo probiótico o formulación anteriormente descrita para su uso en la alimentación. En una realización, dicha alimentación se refiere a alimentación infantil y/o adulta, y/o dietas especiales.

En otra realización, la cepa de microorganismo probiótico o formulación anteriormente descrita se utiliza para la preparación de leches de fórmula para lactantes. En una realización particular, dichas fórmulas consisten en leches para lactantes y/o cereales para lactantes listos para el consumo, y/o alimentos para lactantes.

5 En otra realización, la cepa de microorganismo probiótico o la formulación anteriormente descrita se emplea para la preparación de complementos alimenticios.

10 En otra realización, la cepa de microorganismo probiótico o la formulación anteriormente descrita se emplea para la preparación de fórmulas especiales para nutrición oral y/o entérica.

15 En otra realización, la cepa de microorganismo probiótico o la formulación anteriormente descrita se emplea para la preparación para aplicación farmacéutica/aplicable como medicamento/para su uso en la elaboración de un producto farmacéutico

20 En otra realización, la cepa de microorganismo probiótico o la formulación anteriormente descrita es aplicable en la estimulación del sistema inmunitario y/o en la prevención/tratamiento del asma, y/o en la prevención/tratamiento de los trastornos gastrointestinales, y/o en la eliminación/modulación de los principales patógenos digestivos, y/o en la prevención/tratamiento de la obesidad y de sus comorbilidades, incluido el síndrome metabólico y la diabetes, y/o en las enfermedades asociadas al envejecimiento.

Dichos trastornos gastrointestinales comprenden alteraciones del tránsito intestinal, tales como el estreñimiento, y alteraciones de la biodisponibilidad de minerales, infecciones y síndromes de malabsorción.

25 Dichos síndromes de malabsorción comprenden trastornos que afectan a la anatomía del intestino, tales como el síndrome del intestino corto, y trastornos que afectan a la fisiología del intestino, tales como fibrosis quística del páncreas, la malabsorción de azúcares, en especial la lactosa, alteraciones de la absorción de lípidos, alergias alimentarias y enfermedades inflamatorias intestinales tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

30 Descripción de los dibujos

35 La Figura 1 muestra, a través de una tabla, la influencia del pH sobre la supervivencia de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036 y *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-4034, objeto de la invención, en comparación con dos cepas comercializadas. En concreto, dicha tabla muestra los valores de viabilidad (en unidades formadoras de colonias en % de los estudios de resistencia a pH de las cepas aisladas *Lactobacillus rhamnosus* 22A (CNCM 1-4036), *Lactobacillus paracasei* 7 (CNCM 1-4034) y sus respectivos controles comerciales. Dichos valores se muestran como % de supervivencia comparando el número de bacterias presentes en el control con respecto al número de bacterias presentes a los distintos pH ensayados. Los resultados se expresan en unidades de porcentaje en la columna de %. Puede observarse que a pH 3 las cepas 7 y 22A tienen una resistencia similar o ligeramente superior a las cepas comerciales ensayadas. No obstante, a pH 2 la cepa 22A tiene una viabilidad muy elevada en comparación con el resto de las cepas que no sobreviven a este pH.

40 La Figura 2 muestra, a través de una tabla, la influencia de las sales biliares (extracto de bilis) en la supervivencia de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036 y *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-4034, objeto de la invención, en comparación con dos cepas comercializadas. Por lo tanto, dicha tabla muestra los valores de viabilidad de los estudios de resistencia a sales biliares de las cepas aisladas *Lactobacillus rhamnosus* 22A (CNCM 1-4036), *Lactobacillus paracasei* 7 (CNCM 1-4034) y sus respectivos controles comerciales. Dichos valores se muestran como % de supervivencia en comparación con el número de bacterias presentes en el control con respecto al número de bacterias presentes a las distintas concentraciones de sales biliares ensayadas. Los resultados se expresan en unidades de porcentaje en la columna de %. Como se desprende de los resultados, las cepas 7 y 22A muestran un porcentaje de supervivencia mucho más alto que las cepas comerciales ensayadas, aproximadamente del doble, tanto a concentraciones del 0,3 % como del 0,7 % de sales biliares. Ambas cepas tienen una tasa de supervivencia superior al 100 %, lo que indica que incluso pueden reproducirse en presencia de estas sales. Esto indica, junto con su elevada resistencia al pH, un elevado potencial colonizador de las cepas.

45 La Figura 3 muestra, a través de una tabla, la adhesión de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036 y *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-4034, objeto de la invención, a células intestinales humanas HT-29, en comparación con dos cepas comercializadas. Dicha capacidad se muestra a través de los valores de viabilidad de los estudios de adhesión a células epiteliales intestinales de las cepas aisladas *Lactobacillus rhamnosus* 22^a (CNCM 1-4036), *Lactobacillus paracasei* 7 (CNCM 1-4034) y sus respectivos controles comerciales. Dichos valores se muestran como el % de bacterias adheridas en comparación con el número de bacterias presentes en el control. Ambas cepas presentan porcentajes de adhesión a las células intestinales humanas HT-29 muchos más altos que los de las cepas comerciales ensayadas, lo que indica su acción potencial en la modulación de las actividades de las células intestinales, incluida la inmunomodulación.

60 La Figura 4 muestra, a través de una tabla, la influencia del pH en la supervivencia de la cepa *Bifidobacterium*

breve CNCM 1-4035, objeto de la invención, en comparación con dos cepas comercializadas. Dicha influencia se muestra a través de los valores de viabilidad de los estudios de resistencia al pH de dicha cepa con respecto a sus respectivos controles comerciales. Dichos valores se muestran como el % de supervivencia comparando el número de bacterias presentes en el control con respecto al número de bacterias presentes a los distintos pH ensayados. Los resultados se expresan en unidades de porcentaje en la columna de %. Puede observarse que a pH 3, la cepa 15B muestra una resistencia significativamente mucho mayor que la de las otras dos bifidobacterias ensayadas, siendo su viabilidad mayor al 100 %, lo que indica que las bacterias pueden reproducirse incluso a ese pH.

La Figura 5 muestra, a través de una tabla, la influencia de las sales biliares (extracto de bilis) en la supervivencia de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM 1-4035, objeto de la invención, en comparación con dos cepas comercializadas. Esta influencia se muestra mediante estudios de resistencia a sales biliares de la cepa aislada *Bifidobacterium breve* 15B (CNCM 1-4035) y sus respectivos controles comerciales. Dichos valores se muestran como el % de supervivencia, comparando el número de bacterias presentes en el control con respecto al número de bacterias presentes a las distintas concentraciones de sales biliares ensayadas. Los resultados se expresan en unidades de porcentaje en la columna de %. Los valores de supervivencia en presencia de sales biliares a concentraciones bajas son similares a los de las otras dos bifidobacterias. Sin embargo, la cepa 15B muestra una mayor supervivencia a concentraciones más elevadas.

La Figura 6 muestra, a través de una tabla, la adhesión de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM 1-4035 objeto de la invención a células intestinales humanas, en comparación con dos cepas comercializadas. Dicha capacidad se muestra a través de los valores de viabilidad de los estudios de adhesión a células epiteliales intestinales de la cepa aislada *Bifidobacterium breve* 15B (CNCM 1-4035) y sus respectivos controles comerciales. Dichos valores se muestran como el % de bacterias adheridas en comparación con el número de bacterias presentes en el control. La cepa objeto de la invención tiene un porcentaje de adhesión a las células intestinales humanas HT-29 mucho mayor que el de las cepas comerciales ensayadas, lo que indica su potencial acción en la modulación de actividades de las células del intestino, incluida la inmunomodulación.

La Figura 7 muestra las actividades enzimáticas (en unidades de: Unidades/ml de medio de cultivo) de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM 1-4035 (*Bifidobacterium breve* 15B), objeto de la invención, en comparación con dos cepas comercializadas (sus controles). Los resultados se expresan como se describe en el Ejemplo 11. Los resultados obtenidos permiten concluir que la actividad fermentativa de CNCM 1-4035 coincide con la de una especie del género *Bifidobacterium*, lo que permite clasificar a CNCM 1-4035 dentro de dicho género.

La Figura 8 muestra las actividades enzimáticas de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036 (*Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A) y *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-4034 (*Lactobacillus paracasei* HERO 7), objeto de la invención, en comparación con dos cepas comercializadas (controles). Los resultados se expresan como se describe en el Ejemplo 11. Los resultados obtenidos permiten concluir que la actividad fermentativa de HERO 7 y HERO 22A coincide con la de las especies del género *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*, lo que permite clasificar a CNCM 1-4036 y CNCM 1-4034 dentro de dicho género y especie respectivos.

Figura 9 - Las figuras 9A y 9B muestran los resultados de las actividades fermentativas de hidratos de carbono y de otros sustratos (API 50 CHL) de las cepas CNCM 1-4034 (*Lactobacillus paracasei* HERO 7) y CNCM 1-4036 (*Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A) seleccionadas y sus controles. Los resultados se expresan como se describe en el Ejemplo 11. Los resultados obtenidos permiten concluir que la actividad fermentativa de HERO 7 (CNCM 1-4034) y HERO 22A (CNCM 1-4036), coincide con la de las especies del género *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*, lo que permite clasificar a CNCM 1-4036 y CNCM 1-4034 dentro de dicho género.

Figura 10 - Las Figuras 10A, 10B y 10C muestran los resultados del efecto ejercido por las bacterias probióticas de la presente invención en *L. monocytogenes* CECT 4031 y *S. sonnei* CECT 457. (A) efecto ejercido en *L. monocytogenes* CECT 4031 del sobrenadante concentrado 10x obtenido tras 17 h de cultivo de *L. paracasei* CNCM 1-4034. (B) efecto ejercido en *L. monocytogenes* CECT 4031 del sobrenadante concentrado 10x obtenido tras 24 h de cultivo de *B. breve* CNCM 1-4035. (C) efecto ejercido en *S. sonnei* CECT 457 del sobrenadante concentrado 10x obtenido tras 24 horas de cultivo de *L. rhamnosus* CNCM 1-4036.

La Figura 11 muestra los resultados de los efectos inhibidores del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-4034 neutralizado y no neutralizado al 1 % y 4 %, a las 17 y 24 h de tiempo de cultivo para las bacterias *Salmonella typhi* CECT 725, *Salmonella typhimurium* CECT 443 y *Salmonella typhimurium* CECT 4594. (A) efecto inhibidor de *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-4034 no neutralizada a las 17 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Salmonella typhimurium* CECT 443. (B) efecto inhibidor de *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-4034 no neutralizada a las 24 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Salmonella typhimurium* CECT 4594. (C) efecto inhibidor de *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-4034 no neutralizada a las 24 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725. (D) efecto inhibidor de *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-4034 neutralizada a las 24 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725. (E) efecto inhibidor de *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-4034 no neutralizada a las 17 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725.

La Figura 12 muestra los efectos inhibidores del sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM 1-4035 neutralizado y no neutralizado al 1 % y 4 %, a las 17 y 24 h de tiempo de cultivo para las bacterias *Salmonella typhi* CECT 725. (A) efectos inhibidores del sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM 1-4035 no

neutralizado al 1 % y 4 %, a las 17 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725. (B) efectos inhibidores del sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM 1-4035 neutralizado al 1 % y 4 % a las 17 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725. (C) efectos inhibidores del sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM 1-4035 no neutralizado al 1 % y 4 % a las 24 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725. (D) efectos inhibidores del sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM 1-4035 neutralizado al 1 % y 4 % a las 24 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725.

La Figura 13 muestra los efectos inhibidores del sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036 neutralizado y no neutralizado al 1 % y 4 %, a las 17 y 24 h de tiempo de cultivo para las bacterias *Salmonella typhi* CECT 725, *Salmonella typhimurium* CECT 4594, *Escherichia coli* ETEC CECT 501, *Escherichia coli* ETEC CECT 515, *Escherichia coli* EPEC CECT 729 y *Escherichia coli* EPEC CECT 742. (A) efectos inhibidores del sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036 no neutralizado al 1 % y 4 % a las 17 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725. (B) efectos inhibidores del sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036 no neutralizada al 1 % y 4 %, a las 24 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725. (C) efectos inhibidores del sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036 neutralizado al 1 % y 4 % a las 24 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Salmonella typhimurium* CECT 4594. (D) efectos inhibidores del sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036 no neutralizado al 1 % y 4 %, a las 17 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Escherichia coli* ETEC CECT 501. (E) efectos inhibidores del sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036 no neutralizado al 1 % y 4 %, a las 24 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Escherichia coli* ETEC CECT 501. (F) efectos inhibidores del sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036 no neutralizado al 1 % y 4 %, a las 17 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Escherichia coli* ETEC CECT 515. (G) efectos inhibidores del sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036 no neutralizado al 1 % y 4 %, a las 17 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Escherichia coli* EPEC CECT 729. (H) efectos inhibidores del sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036 neutralizado al 1 % y 4 %, a las 24 h de tiempo de cultivo para la bacteria *Escherichia coli* EPEC CECT 742.

La Figura 14 muestra la reducción del foco de infección obtenida en el virus Ito, Wa y VA70, en la línea HT-29, de sobrenadantes concentrados 1x de las cepas de la presente invención tras (A) 17 h de cultivo y (B) 24 h de cultivo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona microorganismos probióticos con propiedades probióticas mejoradas de resistencia a pH, sales biliares y adhesión. En concreto, la presente invención aísla y caracteriza la bacteria *Bifidobacterium breve* HERO 15B (CNCM 1-4035), aislada de heces de lactantes.

Se sabe que las superficies de las mucosas están colonizadas por una gran cantidad y gran diversidad de microorganismos. En el adulto existen numéricamente más células procariotas que eucariotas, de hecho se estima que el 90 % de las células humanas son células microbianas, mientras que solo el 10 % corresponde a células eucariotas (Savage 1977). La influencia de esta comunidad microbiana sobre la fisiología humana probablemente es más obvia en el intestino, debido al hecho de que este órgano contiene la mayor parte de estos organismos. La densidad en el intestino delgado proximal y medio es relativamente baja, pero existe un aumento considerable en el intestino delgado distal, que puede alcanzar 10^8 ufc/ml de contenido luminal y en el colon hasta 10^{11} - 10^{12} /g.

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

El ecosistema intestinal se forma por la interacción entre la microbiota, el epitelio intestinal, el sistema inmunitario de las mucosas y el sistema nervioso intestinal (Gordon *et al.* 1997). La comparación de ratas normales y ratas con intestino sin gérmenes ha revelado una serie de diferencias anatómicas, bioquímicas y fisiológicas. Por ejemplo, la presencia de la microbiota aumenta el intercambio epitelial, también conjuga y retira los grupos hidroxilo de los ácidos biliares, metaboliza la bilirrubina y reduce el colesterol a coprostanol.

Por lo tanto, la relación entre el intestino y la microbiota es muy estrecha, y puede verse como una relación simbiótica ya que, por ejemplo, la microbiota puede degradar hidratos de carbono que el intestino no puede degradar debido a la falta de maquinaria enzimática. Los productos generados por esta degradación se utilizan principalmente como nutrientes para el epitelio intestinal, como sucede con los ácidos grasos de cadena corta. Adicionalmente, la presencia de esta microbiota tiene un efecto de inmunomodulación, dado que la principal característica fisiológica de la mucosa intestinal es la capacidad de iniciar una respuesta energética frente a patógenos invasivos que pueden

- colonizar el epitelio intestinal y al mismo tiempo presentar una nula respuesta frente a bacterias contenidas en alimentos o frente a la microbiota residente. Esta falta de respuesta es un proceso activo de varios mecanismos conocido como tolerancia oral. Este proceso es esencial para que el hospedador no desarrolle una respuesta inflamatoria frente a la presencia de cualquier microorganismo y, así, puede tener distintas respuestas frente a distintos microorganismos, ayudando así a la estabilidad de la flora intestinal. Esta es la razón por la que tener una microbiota de composición normal puede ayudar al hospedador en el desarrollo fisiológico, inmunitario y metabólico. Este ecosistema se mantiene en equilibrio y cualquier causa que rompa este equilibrio puede desencadenar una patología (diarreas, enfermedades inflamatorias).
- Es de interés entender la importancia de este ecosistema, la función de las cepas no patógenas o "bacterias buenas". Sobre esta idea se ha desarrollado el concepto de probióticos como mediadores en la salud humana. Dentro de las distintas áreas estudiadas, la influencia de los probióticos sobre la modulación de la expresión génica en distintas situaciones, es una de las más interesantes.
- Como se indicó anteriormente, la presente invención aísla bacterias lácticas y bifidobacterias con propiedades probióticas mejoradas a partir de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna. Para esto, se evaluó la resistencia al pH, la resistencia a las sales biliares y la capacidad de adhesión a células epiteliales intestinales de las bacterias aisladas. Los resultados fundamentales de la presente invención indican que en las heces de estos bebés existen bacterias que son altamente resistentes al pH gástrico, a las sales biliares y con capacidad de adhesión a células epiteliales del intestino, que pueden ser usadas como probióticos.

Para comprobar la actividad probiótica de las bacterias, primero deben someterse a una serie de ensayos *in vitro* que simulen las condiciones a las que dichas bacterias se verán sometidas en el organismo, deben permanecer viables en dichas condiciones y, por lo tanto, conservar sus propiedades beneficiosas para la salud. En la presente invención, las bacterias de control utilizadas (Ejemplo 12), que en comparación con las bacterias de la invención muestran sus propiedades probióticas mejoradas, son, para Bifidobacterias: *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum*, suministrado por Hero España S.A., y para Lactobacilos, se utilizan 2 lactobacilos comerciales: *Lactobacillus casei* (Danone®) y *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) (VALIÓ®).

Teniendo en cuenta el interés de las bacterias que constituyen esta invención en la estimulación del sistema inmunitario y en su acción sobre los principales patógenos digestivos, estas bacterias de control han sido seleccionadas porque actualmente se las comercializa nivel internacional en forma de leche fermentada y otras formas farmacéuticas, y existen varias publicaciones sobre sus efectos probióticos, especialmente en la prevención de la diarrea aguda en niños y en la modulación del sistema inmunitario tanto en animales como en seres humanos.

Por lo tanto, los ensayos *in vitro* indicados se refieren a:

Resistencia a la acidez gástrica

Antes de alcanzar el tracto intestinal, las bacterias probióticas deben sobrevivir a su paso a través del estómago (Henriksson *et al.* 1999). La secreción de ácido gástrico en el estómago forma un primer mecanismo de defensa frente a la mayoría de la carga de microorganismos que entran a través de vía oral. Por lo tanto, la supervivencia de las cepas bacterianas en ácido gástrico es el indicio más preciso de su capacidad para pasar a través del estómago. El grupo de investigación sobre probióticos con base en The University College of Cork aisló satisfactoriamente e identificó bacterias lácticas que mostraban características de probiótico ideales (Dunne *et al.* 1999). Se llevaron a cabo experimentos preliminares para determinar el grado de resistencia inicial que tenían las cepas de lactobacilos y bifidobacterias aisladas del íleon humano. El jugo gástrico humano se obtuvo de individuos sanos por aspiración a través de una sonda nasogástrica. Dado que el pH en el estómago es fluctuante (puede llegar a 1,5), se midió antes de su uso. Este ácido se añadió al medio MRS (*medio rogosa sharpe*). La supervivencia inicial de las cepas se evaluó como el 108 % y 106 % para *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* respectivamente, en medio MRS (De Man *et al.* 1960) con HCl que corregía el valor del pH entre 2,0 y 3,4. Los resultados mostraron una gran sensibilidad de *Bifidobacterium* a la acidez (Thornton 1996). Por lo tanto, las cepas que constituyen la presente invención tienen valores de resistencia mayores que los de las cepas estudiadas en dichos experimentos, es decir, tienen mayor resistencia a la acidez (Figuras 1 y 4).

Resistencia a las sales biliares

Como se ha explicado anteriormente, para caracterizar un potencial probiótico, este debe también tener la capacidad de resistir las sales biliares (Lee y Salminen 1995). Los ácidos biliares se sintetizan en el hígado a partir de colesterol y se secretan de la vesícula biliar al duodeno en forma de conjugados (500-700 ml/día), estos ácidos experimentan más modificaciones químicas (desconjugación, deshidrolización, deshidrogenación y desglucuronidación) en el colon casi solo como resultado de la actividad microbiana. Tanto los ácidos conjugados como los desconjugados, tienen actividad antibacteriana que inhibe *in vitro* el crecimiento de las cepas *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* y *Enterococcus sp.* (Lewis *et al.* 1972; Stewart *et al.* 1986). Las formas desconjugadas son más

inhibidoras y las grampositivas son más sensibles que las gramnegativas (Floch *et al.* 1972; Percy-Robb 1972). El grupo de Dunne (Dunne *et al.* 1999) ha elegido, en un primer ensayo, utilizar un medio de cultivo sólido complementado con ácido biliar bovino, porcino y humano hasta una concentración final del 0,3% y 7,5%, para evaluar la resistencia a sales biliares de las cepas. Tras dejar crecer lactobacilos y bifidobacterias, el resultado fue que mostraban resistencia al ácido biliar de bovino y que el resultado del ácido biliar porcino era mucho más inhibitor para ambos grupos bacterianos (Thornton 1996). Por lo tanto, en referencia a la búsqueda del posible probiótico para el consumo humano, el resultado más importante es la capacidad del mismo para crecer en la bilis humana. Teniendo en cuenta que la bilis humana no está normalizada y que su contenido en ácidos biliares varía enormemente de un individuo a otro, es práctica habitual en el estado de la técnica el uso de bilis bovina normalizada en su contenido en ácidos biliares (extracto de bilis) como sustituto de la bilis humana, permitiendo protocolizar ensayos reproducibles. Este ha sido el método seguido en la presente invención para el estudio de la resistencia a sales biliares de las bacterias que constituyen la presente invención. Los resultados obtenidos muestran que dichas bacterias tienen mayor resistencia a sales biliares que sus controles comerciales (Figuras 2 y 5).

Adherencia al epitelio intestinal de cepas probióticas

La adhesión de las cepas adheridas al tejido epitelial del intestino y la capacidad para colonizar el tracto gastrointestinal debe evaluarse también en la selección. La importancia de este proceder reside en el hecho de que después de habérselos seleccionado, muchos de los probióticos ya no son capaces de colonizar a su hospedador diana. De hecho, de los probióticos disponibles hoy día, parece que solo *L. rhamnosus* GG permanece dentro del tracto gastrointestinal durante un período significativo de tiempo (Berg *et al.* 1998; Goldin *et al.* 1992 *L. rhamnosus* GG se adhiere a células Caco-2. Las células HT-29 y Caco-2, que pertenecen a líneas celulares intestinales humanas, expresan las características morfológicas y fisiológicas de un colonocito normal humano y se utilizan para analizar los mecanismos que median de la adhesión de enteropatógenos (Bernet 1994). En estudios recientes se han utilizado para la selección realizada y, por lo tanto, evaluar las posibles bacterias lácticas o bifidobacterias a base de su capacidad de adhesión (Coconnier *et al.* 1992; Bernet *et al.* 1993; Greene y Klaenhammer 1994; Crociani *et al.* 1995; Sarem *et al.* 1996; Tuomola y Salminen 1998).

De los estudios realizados con estas líneas celulares se infiere que la adherencia de las cepas de lactobacilos de la presente invención, que es del orden del 9 % en células Caco-2 y del orden del 5 % en células HT-29 (Tuomola *et al.*, 1998; Dunne *et al.*, 2001; Botes *et al.*, 2008) es muy superior (el 7,5 % para *L. rhamnosus* CNCM 14036 y el 15,5 % para *L. paracasei* CNCM I-4034 (Figura 3) en comparación con la bien caracterizada cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG. El estado de la técnica contempla que la adhesión de las bifidobacterias es pequeña en comparación con los lactobacilos, independientemente de la especie (Dunne *et al.*, 2001): Sin embargo, las cepas *Bifidobacterium bifidum* y *B. longum* utilizadas por la firma HERO España, la cuales se han considerado como controles en la presente invención, se adhieren a las células HT-29 con valores cercanos al 9 %. Asimismo, la bifidobacteria objeto de la presente invención se adhiere a dichas células con un valor, mucho mayor, del 16,7 % (Figura 6).

Selección de las bacterias

Por lo tanto, en la presente invención, las bacterias se seleccionaron utilizando medios de cultivo específicos (Ejemplo 4) tanto para bifidobacterias como para lactobacilos. Durante el aislamiento se utilizaron tres nuevos medios de cultivos descritos como específicos para bifidobacterias, estos son: medio BFM (Nebra y Blanch 1999), medio Columbia modificado y medio Beerens (Beerens 1991. Ejemplos 4.1, 4.2 y 4.3), con lo que se obtuvo mejores resultado en la obtención de colonias de bifidobacterias. Para seleccionar lactobacilos, el medio de cultivo empleado fue medio Rogosa agar (ejemplo 4.4).

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

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

Finalmente, había 29 cepas bacterianas aisladas del medio de Beerens, 13 del medio de Rogosa y 10 del medio Columbia modificado, las cuales pasaron de forma satisfactoria la selección. Dado el número de colonias seleccionadas, como se ha explicado, se procedió directamente a su identificación molecular mediante amplificación del gen ARNr 16S de cada colonia, para la posterior secuenciación y búsqueda de homología en la base de datos del NCBI (BLAST).

Se secuenciaron las cepas clasificadas como lactobacilos y estas secuencias se alinearon entre sí para saber si existían bacterias con el mismo gen ADNr 16s, y se encontraron 41 bacterias que se pueden separar en 2 grupos:

Un grupo que tenía una homología del 99 % de un fragmento de 1474 pb del gen ADNr 16s con:

- 5
Lactobacillus rhamnosus cepa R-11
Lactobacillus rhamnosus cepa La
Lactobacillus rhamnosus, cepa: MNFLM01
Lactobacillus rhamnosus cepa IDCC 3201
10 *Lactobacillus rhamnosus* cepa: YIT 0105 (= ATCC 7469)
Lactobacillus rhamnosus cepa Lcr35 16S

Con estos resultados, se seleccionó del grupo una bacteria con los mejores valores en las pruebas de resistencia (Ejemplos 7 y 9) y se denominó *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A (posteriormente numerada por el Instituto Pasteur [CNCM National Collection of Microorganism Culture PASTEUR INSTITUTE 25, Rue du Docteur Roux F-75724 París] como *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036, donde se la depositó el 2 de julio de 2008).

El otro grupo que tenía una homología del 100 % de un fragmento de 1276 pb del gen ADNr 16s con:

- 20 *Lactobacillus paracasei*, cepa: T11-9
Lactobacillus paracasei, cepa: T7-10
Lactobacillus casei cepa KLDS 1.0720
Lactobacillus casei cepa L5
Lactobacillus casei, cepa: YIT 0209 (= NCDO 151)
25 *Lactobacillus casei*, cepa: YIT 0180 (= ATCC 334)
Lactobacillus paracasei cepa IMPC 2.1
Lactobacillus paracasei, cepa: NRIC 1944
Lactobacillus paracasei, cepa: NRIC 1942
Lactobacillus paracasei, cepa: NRIC 1938
30 *Lactobacillus paracasei*, cepa: NRIC 1934
Lactobacillus paracasei, cepa: NRIC 0638
Lactobacillus casei ATCC 334
Lactobacillus paracasei cepa DJ1
Lactobacillus casei cepa Ru2-2i
35 *Lactobacillus paracasei* aislado 3C
Lactobacillus paracasei aislado 2C
Lactobacillus paracasei
Lactobacillus casei cepa MCRF-284
Lactobacillus sp. L02
40 *Lactobacillus paracasei*
Lactobacillus paracasei, cepa SM20
Lactobacillus casei cepa BL23
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei*
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei*
45 *Lactobacillus casei*
Lactobacillus paracasei subsp. *tolerans*

Con estos resultados, se seleccionó de este segundo grupo una bacteria con los mejores valores en las pruebas de resistencia (Ejemplos 7 y 9) y se denominó inicialmente como *Lactobacillus paracasei* HERO 7 (posteriormente numerada por el Instituto Pasteur [CNCM National Collection of Microorganism Culture PASTEUR INSTITUTE 25, Rue du Docteur Roux F-75724 París] como *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-4034, donde se la depositó el 2 de julio de 2008).

Posteriormente, se realizó lo mismo con el grupo de las bifidobacterias, habiéndose encontrado un único grupo que tenía una homología del 100 % de un fragmento de 1136 pb del gen ADNr 16s con:

Clon de bacteria no cultivadas ARNr 235
Bifidobacterium breve, cepa: ATCC 15700

60 Con estos resultados, se seleccionó una bacteria del grupo de bifidobacterias con los mejores resultados de resistencia (139,6 % a pH 2,5) (Ejemplos 7 y 9) y se denominó inicialmente *Bifidobacterium breve* HERO 15B (posteriormente renombrada por el Instituto Pasteur [CNCM National Collection of Microorganism Culture PASTEUR INSTITUTE 25, Rue du Docteur Roux F-75724 París] como *Bifidobacterium breve* CNCM 1-4035, donde se depositó el 2 de julio de 2008).

Por la tanto, estas bacterias clasificadas como:

- 5 *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A
Lactobacillus paracasei HERO 7
Bifidobacterium breve HERO 15B.

se enviaron al Instituto Pasteur para su depósito, donde se reconocieron como únicas, y se les asignó la siguiente denominación final:

Denominación inicial:	Denominación final:
<i>Lactobacillus paracasei</i> HERO 7	CNCM 1-4034
<i>Bifidobacterium breve</i> HERO 15B	CNCM 1-4035
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HERO 22A	CNCM 1-4036

10

Resultados de resistencia a pH, sales biliares y adhesión celular

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

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

30 La viabilidad de cultivos probióticos a pH 3,0 durante 2 horas y en medios que contengan 500-1000 mg (0,05-0,1 %) de ácidos biliares por litro, se consideran pruebas convencionales de tolerancia al ácido y a las sales biliares (Snelling 2005), aunque concentraciones de sales biliares al 0,3 % sería adecuada para seleccionar probióticos. Las pruebas de sales biliares realizadas a distintas concentraciones (0,3 % y 0,7 %), presentaron valores superiores al 100 % en todos los casos para las bacterias objeto de la invención y superiores que las bacterias comerciales utilizadas como controles (Ejemplo 12, Figuras 2 y 5). En conclusión las cepas de lactobacilos de la invención son más resistentes al pH y a las sales biliares que otras bacterias utilizadas hoy día como probióticos.

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

40 Como también se ha mencionado anteriormente, otro aspecto muy importante para la entrada de los probióticos en la microbiota intestinal es la capacidad de adhesión en las células epiteliales intestinales, dado que evitan que las cepas probióticas se eliminen debido a los movimientos peristálticos y a otras bacterias que forman la microbiota intestinal. Adicionalmente, la adhesión es la primera etapa en la colonización y es probablemente un prerrequisito para la exclusión competitiva de enteropatógenos (Forestier *et al.* 2001; Lee *et al.* 2003) y para la inmunomodulación del hospedador (Ouwehand *et al.* 1999; Plant y Conway 2002).

50 En la presente invención, las propiedades de adhesión de las distintas cepas se estudiaron utilizando células HT-29 como un modelo *in vitro* de epitelio intestinal (Ejemplo 12, Figuras 3 y 6). El patrón de adhesión mostró ser específico para cada cepa, dado que presentaron valores muy distintos a pesar de ser de la misma especie. Esto se puede comprender comparando la capacidad de adhesión de distintos probióticos descritos, por ejemplo, el *Lactobacillus casei* (Fyos[®]) presenta una adhesión del 14,4 %, mientras que *Lactobacillus casei* (Lactophilus[®]) presenta una adhesión del 2,6 % (Morata De Ambrosini *et al.*, 1999). Como se indica anteriormente, la adherencia de las cepas de lactobacilos de la presente invención es muy superior (el 7,5 % para *L. rhamnosus* CNCM 14036 y el 15,5 % para *L. paracasei* CNCM 1-4034) a la de otras bacterias, tales como *Lactobacillus rhamnosus* GG, que es del orden del 5 % en células HT-29 (Dunne *et al.*, 2001) (Tabla 3). Asimismo, la bifidobacteria que es el objeto de la presente invención, *B. breve* CNCM 1-4035, también se adhiere a dichas células con un valor mucho mayor que el 16,7 % (Figura 5), en comparación con el 9 % de las bacterias utilizadas como controles.

Estos datos confirman los resultados de la presente invención, que muestran la variabilidad existente en las distintas cepas probióticas. En este caso concreto, los controles de los lactobacilos presentan una adhesión (4 %) que corresponde a la mitad de la de los controles de las bifidobacterias (8 %), sin embargo, las cepas aisladas en la presente invención presentan una adhesión mayor que sus controles, debido a que cuando se alinearon los ARNr 16s de los distintos grupos se seleccionaron las que tenían los mejores valores de adhesión epitelial.

Por lo tanto, en el caso de los lactobacilos se seleccionaron las cepas que presentaban una adhesión en el orden del 7,48 y 11,55 %, con respecto al 4,80 y 4,09 % de sus controles (Figura 3), y en el caso de las bifidobacterias se seleccionaron las que presentaban una adhesión del 16,7 %, con respecto al 8,8 y 9,1 % de sus controles (Figura 6). En otras palabras, las bacterias que constituyen los distintos objetos de la presente invención tienen una mayor capacidad de colonización y permanencia en el intestino y, por lo tanto, conducen a un mejor efecto probiótico.

Resultados de la caracterización de las bacterias aisladas

Estudio del ARN 16s

Han aparecido distintas técnicas moleculares para la identificación, composición y enumeración de la comunidad bacteriana completa del intestino, la mayoría se basan en el estudio del gen del ARN ribosómico (ARNr) 16S, debido a que durante la última década, el gen del ARNr 16s ha revolucionado la manera en que los taxonomistas clasifican e identifican las bacterias. El gen del ARNr 16s comprende regiones que varían desde altamente variables a altamente conservadas, y la diferencia de las secuencias se utilizan para determinar las relaciones filogenéticas y distinguir bacterias desde especies hasta cepas. Existen disponibles base de datos con más de 200.000 genes del ARNr 16s, tales como, por ejemplo, NCBI/BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), base de datos ribosómica del project-RPD (<http://rpd.cme.msu.edu/html>) y EMBL (<http://www.embl-heidelberg.de/>), estas bases de datos comparan las secuencias del gen del ARNr 16s existentes, con las nuevas secuencias obtenidas. Como se muestra en el Ejemplo 2, las cepas aisladas en la presente invención presentaron una alta homología con *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium breve*, lo que concuerda con documentos anteriores que afirman que en un niño alimentado con leche materna hay altos niveles de bifidobacterias en las heces, entre el 40-60 % del total de la microbiota, en donde *Bifidobacterium breve* se encuentra en porcentaje considerable (Harmsen *et al.* 2000). Además, existe un alto porcentaje de lactobacilos, principalmente *L. casei*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, entre otros (Heiling *et al.* 2002, Satokari *et al.* 2002).

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

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

Para ampliar la información genómica de las cepas bacterianas estudiadas, se amplificó el espacio intergénico presente entre los genes 16s y 23s, siendo conocido este espacio por tener una gran variabilidad de tamaño (Barry *et al.* 1991 y Navarro *et al.* 1992), la que se ha utilizado para diferenciar especies de procariontes (Barry *et al.* 1991). En las cepas aisladas los fragmentos del espacio intergénico varían en longitud entre las 579 pb de *Lactobacillus rhamnosus* 22A HERO (CNCM 1-4036), las 512 pb de *Lactobacillus paracasei* 7 HERO (CNCM 1-4034) y las 182 pb de *Bifidobacterium breve* 15B HERO (CNCM 1-4035). Los fragmentos intergénicos de 16s-23s se compararon con los de la base de datos del NCBI/BLAST y los resultados muestran una homología de 100 % para la cepa *Lactobacillus rhamnosus* 22A HERO (CNCM 1-4036) con el aislado *Lactobacillus rhamnosus* TS1 y con

Lactobacillus rhamnosus PS1 16S. Cuando se comparan los resultados de homología mostrados para el ARNr 16s, los resultados son totalmente distintos, por lo tanto, es posible que sea una cepa que no está en la base de datos o que la base de datos NCBI/BLAST tenga más información sobre el ARNr 16s y no sobre el espacio intergénico 16s-23s. Estos resultados indican que la bacteria aislada es única, lo que ha confirmado el Instituto Pasteur al proporcionarle el nombre específico *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-4036.

En el caso de la cepa *Lactobacillus paracasei* 7 HERO (CNCM 1-4034), los resultados del espacio intergénico 16s-23s muestran una homología del 100 % para *Lactobacillus casei* ATCC 334. La base de datos NCBI/BLAST contiene el genoma completo y está en la lista de *L. casei* que muestra una homología de 100 % para el ARNr 16s, por lo tanto, es muy probable que la cepa aislada sea *L. casei* ATCC 334; en cualquier caso, al secuenciar otros fragmentos de su genoma, tal como los genes 23s o 5s, u otros, se podría ratificar o descartar la idea de que corresponde exactamente a esta cepa. En este sentido, tras los análisis pertinentes, el Instituto Pasteur ha reconocido la cepa como única.

Para el caso de la cepa de bifidobacteria, el fragmento es bastante pequeño, por lo tanto se amplificó el espacio intergénico de los controles, proporcionando 165 pb para *Bifidobacterium longum* y 298 pb para *Bifidobacterium bifidum*, lo cual ratifica la existencia de una gran variación en el tamaño del fragmento. Se alinearon las cepas de control, la cepa aislada, *Bifidobacterium breve* 15B HERO (CNCM 1-4035) y la cepa que mostró una homología del 99 % (NCBI/BLAST) con la cepa de la invención, observándose una gran diferencia entre los controles y las cepas de *Bifidobacterium breve*, sin embargo, hay una diferencia de solo base entre la cepa de la invención y la cepa que presenta una homología del 99 % (Espacio transcrito interno (ITS, sigla del inglés *internal transcribed spacer*) 16S-23S de *Bifidobacterium breve*, cepa Y8). Esta cepa es totalmente distinta de la cepa con una homología del 100 % para el ARNr 16s, por lo tanto, podría ser una cepa que no está registrada en esta base de datos.

Todos estos resultados demuestran que las tres cepas aisladas son nuevas, dado que no se han descrito anteriormente en el estado de la técnica.

Identificación fenotípica

Como se muestra en el Ejemplo 11, para analizar las capacidades bioquímicas de las especies aisladas la presente invención utilizó un kit de fermentación de hidratos de carbono (API 50CH) (Figura 8) y un kit de actividad enzimática (API Zym) (Figura 9). Constituyen un método rápido y teóricamente reproducible para la identificación fenotípica de cultivos bacterianos puros. Estas pruebas se han utilizado para la caracterización e identificación de lactobacilos en leche (Medina *et al.* 2001), yogur y otros productos lácteos fermentados (Andrighetto *et al.* 1998), y quesos (Andrighetto *et al.* 1998, Bouton *et al.* 1998 y De Angelis *et al.* 2001). Sin embargo, la fiabilidad de estas pruebas ha sido cuestionada, en especial para API 50CH, debido a que inicialmente se desarrolló para identificar cepas de lactobacilos para el uso clínico y debido a que la base de datos del fabricante no está actualizada para algunas especies de lactobacilos, mostrando resultados ambiguos para su identificación (Andrighetto *et al.* 1998 y Collins *et al.* 1993), sin embargo, la información ofrecida es valiosa para caracterizar fenotípicamente las cepas aisladas.

Como se observa en la Figura 8, las cepas aisladas, así como los controles, presentan una baja actividad proteolítica que funciona como tripsina y α -quimotripsina, aunque presentaron una actividad que era distinta de leucina, para valina presentan una actividad mínima en bifidobacterias y muy alta en lactobacilos.

Las bifidobacterias también presentan una alta actividad para α y β -galactosidasa, y para α -glucosidasa. La actividad α -galactosidasa y α -glucosidasa podría diferir de las bifidobacterias de otras bacterias lácticas, como describe Desjardins *et al.* (1990).

Se observó que en las bifidobacterias y en la cepa aislada *Lactobacillus rhamnosus* 22A HERO (CNCM 1-4036) existe una alta actividad de α -galactosidasa. En otras palabras, una actividad importante debido a que la hidrólisis de un azúcares específico tal como α -D-galactosil-oligosacárido permite una proliferación selectiva de bifidobacterias en el tracto intestinal (Gopal *et al.* 2001; Gulewicz *et al.* 2002), debido a que las bifidobacterias pueden utilizar galactooligosacáridos. La evaluación de las características fenotípicas de las bifidobacterias ha permitido confirmar su clasificación anterior realizada por medios genéticos y determinar que sus acciones enzimáticas permiten utilizar varios sustratos de hidrato de carbono, preferentemente polímeros de glucosa con enlaces α para la producción de ácido láctico.

Se ha descrito que algunas cepas de otros orígenes y géneros, incluyendo los lactobacilos, presentan capacidad β -glucuronidasa (Gopa *et al.* 2001; Hopkins *et al.* 1998). Por lo tanto, las cepas de lactobacilos y bifidobacterias de la presente invención, así como sus controles, no presentan niveles de actividad de β -glucuronidasa, lo que se interpreta como una característica favorable. La ausencia de actividad β -glucuronidasa es una característica que deben tener todos los probióticos considerados como buenos, debido a que esta enzima es producida por las enzimas fecales (nitrorreductasa, azorreductasa) de origen microbiano, que provocan que los procarcinógenos se conviertan en carcinógenos (Kurman 1988). Nanno *et al.* (1986) demostraron que extractos de bacterias positivas

para β -glucuronidasa aumentan la activación mutagénica de metabolitos biliares de benzopireno, mientras que extractos negativas para β -glucuronidasa no presentan esta actividad. En resumen, se puede decir que dado que estas bacterias presentan baja actividad para otras fuentes de carbono como son manosa, fucosa y glucurónidos, prefieren la lactosa y glucosa como fuentes de carbono para el metabolismo, aunque la cepa aislada *Lactobacillus rhamnosus* 22A HERO (CNCM 1-4036) presenta actividad enzimática para α -fucosa, lo que implica un efecto favorable en la fermentación de derivados de fucosil-lactosa como los presentes en leche materna, que tienen un conocido efecto favorecedor del crecimiento de bifidobacterias. Esta propiedad significa que los probióticos de la presente invención tienen una aplicación muy particular en alimentación de lactantes, aunque también pueden aplicarse en alimentación adultos y dietas especiales.

Otro aspecto que debe mencionarse es el resultado de API 50CH (figura 9B), donde la cepa *Lactobacillus paracasei* 7 HERO (CNCM 1-4034) fermenta inulina, una capacidad que no tienen sus controles. La capacidad de fermentar inulina no es una propiedad común entre lactobacilos (Cebeci y Gurakan 2003; Makras *et al.* 2005). Esto indica que la cepa de la invención tiene capacidad de fermentar fructooligosacáridos (FOS), ampliamente utilizados como prebióticos, en alimentación de lactantes, promoviendo el desarrollo de la microbiota intestinal en la que predominan los lactobacilos y las bifidobacterias. Esta característica de las bacterias de la invención refuerza el hecho de que los probióticos de la presente invención tengan una aplicación muy particular en alimentación de lactantes, aunque también pueden aplicarse en alimentación de adultos y dietas especiales. Se ha demostrado la capacidad de la inulina y los FOS de aumentar el número de bifidobacterias en el colon (Roberfroid *et al.* 1998; Van Loo *et al.* 1999).

Actividad probiótica

Una vez cumplidos los requisitos mencionados anteriormente respecto a la resistencia al pH, la resistencia a las sales biliares, la adherencia a células epiteliales intestinales y la secuenciación del 16S, se tiene el microorganismo probiótico aislado y definido. La siguiente etapa consiste en caracterizar sus actividades como probiótico, en concreto, sería necesario caracterizar las propiedades como probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A (CNCM 1-4036) y/o *Lactobacillus paracasei* HERO 7 (CNCM 1-4034), y/o *Bifidobacterium breve* HERO 15B (CNCM I-4035).

Teniendo en cuenta que las bacterias de la invención cumplen los requisitos de un probiótico en relación con la resistencia al pH, a las sales biliares y la adherencia, dichas bacterias pueden aplicarse en las distintas áreas en las que es conocido el uso de probióticos en el estado de la técnica, entre otros en el tratamiento y prevención de distintas patologías, como la malabsorción de lactosa, la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol, distintos tipos de diarreas, enfermedades inflamatorias intestinales, cáncer, trastornos provocados por bacterias patógenas, etc. Por lo tanto, dichos probióticos serán aplicables en distintos campos, como en la acción sobre los principales patógenos digestivos y en la estimulación del sistema inmunitario, entre otros.

Bacterias patógenas

Entre los distintos tipos de estudios realizados con los probióticos, son de especial interés los que implican bacterias patógenas del sistema gastrointestinal. Cuando se escogen bacterias patógenas se debe tener en cuenta su mecanismo de patogenia, el cual varía entre una y otra. Una bacteria de interés es la *Escherichia coli* enterotoxigénica, debido a que la producción de su enterotoxina es una causa importante de diarrea en seres humanos. Estudios recientes han descrito que determinadas bacterias lácticas tienen un efecto antagonista con respecto a *Escherichia coli* enterotoxigénica (Gopal *et al.* 2001; Todoriki *et al.* 2001; Chu *et al.* 2005; Tsai *et al.* 2007) y con respecto a otras bacterias patógenas tales como *Salmonella typhimorium* y *Shigella flexneri* (Tien *et al.* 2006; Jankowska *et al.* 2008).

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

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

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

Por lo tanto, algunos probióticos podrían modular las propiedades de las CD, incluyendo su capacidad de activar una

respuesta inmunitaria específica (Kelsall *et al.* 2002). Un equilibrio entre estímulo y tolerancia después del contacto con bacterias probióticas en el intestino podría ser importante para mantener su homeostasis y ser capaces de llevar a cabo sus funciones beneficiosas de protección con respecto a bacterias patógenas en el sistema digestivo del hospedador.

5 Las cepas probióticas de la presente invención demuestran tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de microorganismos intestinales patógenos, tales como bacterias patógenas, entre otras, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Escherichia coli* enteropatógena, *Salmonella* entérica, así como virus entéricos, tales como *Rotavirus*.

10 Malabsorción de lactosa

Los mamíferos nacen con suficiente actividad lactasa como para usar la lactosa procedente de la leche materna. Tras el destete esta actividad se va reduciendo de forma gradual con la edad y la ingestión de alimento que la contenga conduce a signos y síntomas relacionados con la intolerancia a la lactosa (aumento anómalo de gases, dolor abdominal, diarrea, etc.). Es conocido que el uso de probióticos que liberan lactasa favorece la digestión de la lactosa en la luz del intestino, combatiendo los síntomas de intolerancia a la lactosa.

20 Reducción de los niveles de colesterol

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

Por lo tanto, se ha observado en distintos estudios en animales (Akalin *et al.* 1997; Fukushima y Nakano 1996) y en seres humanos (Lin *et al.* 1989), que la administración de probióticos puede disminuir la concentración sérica de colesterol.

30 Diarrea

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

En estos casos, el probiótico utilizado como agente bioterapéutico afecta la expresión y la actividad de un gran número de enzimas y proteínas, regulando el epitelio intestinal y, posiblemente, la microbiota.

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

La diarrea provocada por *Clostridium difficile*, que es un patógeno oportunista que aprovecha la alteración de la microbiota intestinal debida a la toma de antibióticos, presenta un amplio espectro de síntomas clínicos, que varían de la diarrea leve benigna a una colitis intensa con desarrollo de megacolon tóxico, complicaciones intrabdominales y generalizadas que pueden conducir a la muerte del paciente. Las diarreas habitualmente aparecen unas pocas semanas después del inicio de la terapia con el antibiótico. La secuencia patogénica comienza con una alteración de la microbiota bacteriana intestinal, inducida por los antibióticos, lo que permite la colonización por *C. difficile* si la persona se expone a la ingestión de este agente. Posteriormente, la bacteria libera toxinas que provocan el daño tisular. Las cepas patógenas de *C. difficile* producen toxinas, denominadas A y B. *S. Boulardii* inhibe las toxinas A y B por la liberación de una proteasa de 54 kDa que corta estas toxinas y sus receptores de membrana (Castagliuolo *et al.* 1999).

Se ha observado que la administración oral de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Saccharomyces boulardii* ha sido eficaz en el restablecimiento de la microbiota normal de los pacientes.

La diarrea del turista se debe a una infección bacteriana, vírica o parasitaria. Hay muchos microorganismos que la provocan y probablemente son distintos de un país a otro. Por frecuencia, estos incluyen: *E. coli*, *Shigela*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Rotavirus* y *Giardia lamblia*. La diarrea del turista afecta a la mitad de los turistas que

van a zonas de alto riesgo. Las bacterias usadas como probióticos en distintos estudios son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococci* y *Enterococci*. *Lactobacillus* GG ha sido el probiótico que más eficaz con respecto a la diarrea del turista.

5 Enfermedades inflamatorias intestinales

Uno de los principales usos de los probióticos implica un desequilibrio en la microbiota y el sistema inmunitario. De acuerdo con este interés, el estudio de las enfermedades inflamatorias intestinales es uno de los focos más interesantes para el posible uso de los probióticos como terapias clínicas. Los estudios realizados en esta área han proporcionado información importante sobre el uso clínico de los probióticos y la expresión génica de distintos intermediarios implicados en estas enfermedades.

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son trastornos inflamatorios crónicos del intestino de origen desconocido (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), la patogenia es compleja e implica al menos 3 elementos importantes: factores de susceptibilidad genética, la microflora entérica y el daño mediado por la inmunidad. Se ha formulado la hipótesis de que las EII se producen debido a una respuesta anómala de los linfocitos T con respecto a la microbiota, también se ha especulado que la presencia de organismos patógenos podrían provocar estas enfermedades.

Existe un nivel reducido de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en biopsias de colon de pacientes con EII (Fabia *et al.* 1993; Favier *et al.* 1997). Los tratamientos convencionales para tratar las EII están enfocados a suprimir o modular la inmunidad del hospedador y, entre estos tratamientos, el uso de antibióticos es un tratamiento eficaz para la enfermedad de Crohn. Esto indicaría que el uso de probióticos para modificar la microflora puede ser importante en el tratamiento de la EII.

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

Cáncer

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

La microbiota intestinal y el sistema inmunitario desempeñan un papel importante en la regulación de la carcinogénesis. Los probióticos pueden tener un efecto en ambos, por lo tanto, se han hecho grandes esfuerzos en este campo para actuar contra el cáncer de colon. Se ha descubierto que los probióticos pueden disminuir las concentraciones de enzimas, mutágenos, sales biliares secundarias, los que posiblemente estén implicados en el proceso cancerígeno del colon (Wollowski *et al.* 2001). Los datos epidemiológicos sustentan que el consumo diario de productos fermentados tiene un efecto protector frente a los adenomas o cáncer de colon (Rafter y Glinghammar 1995).

Se han utilizado una combinación simbiótica para el estudio de la prevención del cáncer, lo cual es una mezcla de un probiótico y un prebiótico. Esta combinación aumentó los niveles de ácidos grasos de cadena corta, que son los principales productos de la fermentación bacteriana, siendo su papel principal actuar como una fuente de nutrientes para el epitelio intestinal. Están asociados con una inducción de la diferenciación, la supresión de proliferación y el aumento de apoptosis *in vitro* (Heerdt *et al.* 1997; Medina *et al.* 1997), y pueden desempeñar un papel en la prevención de algunas enfermedades tales como los trastornos gastrointestinales y el cáncer (Julia *et al.* 2006).

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

Los resultados han mostrado en todos los casos que las propiedades probióticas de las bacterias de la invención son mejores que dichas bacterias control. Se sabe así que la actividad de las bacterias utilizadas como controles está enfocada en los siguientes campos:

L. casei immunitas de Danone

Los efectos beneficiosos asociados con las composiciones probióticas que contienen *L. casei immunitas* (Actimel®)

tienen la mejor respuesta inmunitaria frente a distintos agentes infecciosos, aumentando el nivel de citocinas activadoras del sistema inmunitario, mejorando la respuesta proliferativa de los linfocitos T y modulando la expresión de los linfocitos NK. Se ha observado que beber Actimel® mejora el pronóstico de las diarreas infantiles asociadas con infecciones, reduciendo la gravedad y duración de las mismas.

5 A su vez, las composiciones que contienen *L. casei immunitas* tienen efectos antiinflamatorios positivos sobre la mucosa del colon humano debido a que aumentan la respuesta inmunitaria del hospedador, lo cual es beneficioso para individuos con enfermedades inflamatorias intestinales y para la prevención del cáncer de colon.

10 A la vista de lo anterior y de los distintos experimentos comparativos realizados, los que han mostrado las mejores propiedades probióticas de *Lactobacillus paracasei* HERO 7 (CNCM 1-4034) con respecto a *L. casei immunitas*, *Lactobacillus paracasei* HERO 7 (CNCM 1-4034) tiene una excelente aplicación, entre otros, en la prevención de distintas patologías tales como la malabsorción de lactosa, reducción de los niveles plasmáticos de colesterol, distintos tipos de diarreas, enfermedades inflamatorias intestinales, cáncer, etc., en la mejora de la respuesta
15 inmunitaria con respecto a distintos agentes infecciosos, en la mejora de las diarreas infantiles, como un antiinflamatorio de la mucosa del colon humano (y, por consiguiente, en la prevención del cáncer de colon).

LGG

20 *Lactobacillus GG* se adhiere a las células intestinales, estimulando la respuesta inmunitaria y previniendo la diarrea patógena. Distintos estudios han demostrado que el consumo de composiciones que contienen LGG, tales como Bioactif de Kaiku®, inhibe la colonización competitiva del intestino por microorganismos patógenos. A su vez, estos microorganismos producen compuestos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de cepas patógenas, con la posterior inhibición del crecimiento de cepas patógenas. Por lo tanto, el consumo de composiciones con LGG
25 mantiene o restaura el equilibrio de la microflora intestinal, optimizando los procesos de absorción de la función de la mucosa intestinal.

A la vista de lo anterior y de los distintos experimentos comparativos realizados que han mostrado las mejores propiedades probióticas de *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A (CNCM 1-4036) con respecto a *Lactobacillus GG*,
30 *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A (CNCM 1-4036) tiene una excelente aplicación, entre otros, la estimulación de la respuesta inmunitaria y la prevención de la diarrea patógena, y en el mantenimiento o restablecimiento del equilibrio de la microflora intestinal.

Bifidobacterium longum y *Bifidobacterium bifidum*

35 Sabe a partir del estado de la técnica que *Bifidobacterium longum* es resistente a los antibióticos, por lo tanto su consumo en periodos en los que los individuos están en tratamiento con antibióticos previene la diarrea que se produce ocasionalmente en los pacientes. Otras aplicaciones de estos microorganismos están dirigidas a reducir el colesterol, aliviar los síntomas de la intolerancia a la lactosa, estimular el sistema inmunitario y prevenir el cáncer.

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

45 A la vista de lo anterior y de los distintos experimentos comparativos realizados que han mostrado las mejores propiedades probióticas de *Bifidobacterium breve* HERO 15B (CNCM 1-4035) con respecto a *Bifidobacterium longum* y *B. bifidum*, *Bifidobacterium breve* HERO 15B (CNCM 1-4035) tiene una aplicación excelente, entre otros, en la estimulación de la respuesta inmunitaria y la prevención de la diarrea provocada por antibióticos, en la reducción del colesterol, la mejora de los síntomas de la intolerancia a la lactosa, en la prevención del cáncer, etc.

50 Probióticos en alimentos, bebidas, fármacos, etc.

La incorporación de microorganismos viables en los alimentos es una práctica antigua. El yogur y otras leches fermentadas son alimentos que tradicionalmente incluyen microorganismos vivos. El desarrollo de los alimentos
55 funcionales en los últimos años ha propiciado el desarrollo de nuevas aplicaciones basadas en el uso de microorganismos capaces de producir efectos beneficiosos para el organismo.

El área de la alimentación infantil no ha sido una excepción dentro del campo de los alimentos funcionales y en los últimos años los ingredientes de este tipo han comenzado a incluirse en los distintos tipos de alimentos para
60 lactantes. Los probióticos han sido una de las principales líneas de desarrollo, habiéndoselos aplicado sobre todo en el campo de las leches de fórmula, principalmente de continuación y en las fórmulas de crecimiento. El objetivo que se busca con la incorporación de probióticos a los alimentos es su implantación en el colon del hospedador y la obtención de una serie de efectos beneficiosos (reducción de la flora patógena, producción de vitaminas y otras sustancias nutricionales, reducción del pH del medio, etc.).

A todas las bacterias probióticas de la presente invención se las reconoce como especies comprendidas dentro del grupo de bacterias lácticas, y se las conoce desde hace cierto tiempo a nivel internacional por su nulo poder patógeno. Por lo tanto, son susceptibles de ser utilizadas para la fermentación de productos lácteos, entre otros, de manera aislada o en conjunción con otras bacterias lácticas, por ejemplo *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus lactis*, etc. Asimismo, su empleo en leches para lactantes, como cualquier otra bacteria láctica, no implica ningún problema potencial de seguridad alimentaria.

La incorporación de estos probióticos en alimentos y bebidas debe asegurar una cantidad particular de bacterias vivas en el producto final tras el periodo de semivida máximo del producto, mediante el uso de un procedimiento de mezcla (o de fermentación, cuando sea apropiado) adecuado.

Los probióticos de la presente invención pueden aplicarse en la alimentación de lactantes y en la de adultos, y en dietas especiales. Dichos probióticos pueden utilizarse en forma de polvo, solos o mezclados con otros excipientes conocidos en el estado de la técnica tales como azúcares, proteínas, leche en polvo, etc, o como ingredientes activos en la fermentación de productos preferentemente lácteos. Por lo tanto, dichos probióticos pueden incorporarse en los alimentos utilizados por la población general en una forma en polvo o líquida, en particular leches y productos derivados de la leche, en especial leches fermentadas y quesos; cereales y derivados, incluidas masas de pan; sopas y otros productos similares en forma deshidratada; productos cárnicos fermentados; derivados de frutas, zumos y refrescos; alimentos para usos nutritivos específicos, incluyendo leches para lactantes, cereales para lactantes, alimentos infantiles listos para el uso, etc. También pueden encontrarse en complementos alimenticios y en fórmulas especiales para nutrición oral y entérica para el uso clínico.

Si están en un producto en polvo (leche para lactantes, cereales...), los probióticos se incorporarán mezclándolos en seco en el producto final. Por lo tanto, los probióticos de la presente invención pueden incorporarse en alimentos en polvo destinados a la reconstitución con agua u otro líquido tal como la leche (leches en polvo para lactantes, cereales...).

En su uso para la fermentación de leche o en productos lácteos, y para la preparación de leche acidificada, los probióticos se añaden a la base de leche líquida durante una etapa intermedia del procedimiento y que produce una fermentación a temperatura y tiempo controlados para obtener leche acidificada.

Los probióticos de la invención también pueden aplicarse en complementos alimenticios e incluso en productos farmacéuticos, que podrían presentarse en forma de preparados en polvo, comprimidos, grageas, etc. Estos productos tienen un campo de uso en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales, úlceras gástricas, diarrea aguda y otras enfermedades del tracto gastrointestinal.

Ejemplos

40 Ejemplo 1. Amplificación de fragmentos intergénicos 16S-23S

Se amplificaron los segmentos intergénicos de las cepas seleccionadas, se secuenciaron y se realizó la búsqueda de homología en la base de datos del NCBI (BLAST), lo cual suministró los siguientes resultados:

45 • *Lactobacillus rhamnosus* 22A (CNCM 1-4036) tiene una homología del 100 % de un fragmento de 579 pb con:

- *Lactobacillus rhamnosus* aislado TS1
- *Lactobacillus rhamnosus* aislado PS1 16S

50 • *Lactobacillus paracasei* 7 (CNCM 1-4034) tiene una homología del 100 % de un fragmento de 512 pb con:

- *Lactobacillus casei* ATCC 334

55 • *Bifidobacterium breve* 15B (CNCM 1-4035) tiene una homología del 99 % del espacio intergénico 16s-23s de un fragmento de 182 pb con:

- *Bifidobacterium breve* (ITS), cepa Y8
- *Bifidobacterium longum* (ITS), cepa Y10

60 Ejemplo 2. Alineamiento de secciones secuenciadas

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

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

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

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

De hecho, la secuenciación del espacio intergénico 16S-23S es única y no coincide con nada descrito anteriormente para una bifidobacteria, lo que indica que la cepa de la invención es única, un aspecto reconocido por el Instituto Pasteur al proporcionarle una denominación que también es única.

15

Ejemplo 3. Toma y procesamiento de las muestras

Toma de muestras.

- 20 En la consulta del pediatra JM, el inventor de la presente patente, se tomaron en condiciones anaeróbicas heces de niños de entre 2 y 4 meses de edad, alimentados exclusivamente con leche materna. Se pidió a los padres que llevaran a sus hijos a la consulta a primera hora de la mañana, se esperó a que los niños evacuaran tras estimulación y tras la evacuación se recogieron las heces en un recipiente estéril mediante una cucharilla de plástico que tiene adherida a su tapa. Una vez terminada la recolección, el recipiente con la muestra se introdujo en una jarra de anaerobiosis (Anaerojan®, Oxoid, Hampshire, Reino Unido) acompañada de un sobrecito generador de atmósfera anaeróbica (Anaerogen®, Oxoid, Hampshire, Reino Unido) y la jarra se selló de forma hermética y se transportó al laboratorio, en donde las muestras se procesaron en un tiempo de no más de 2 horas.

25

Procesamiento y siembra de las muestras

30

Las muestras a analizar se pueden manipular una vez recogidas o antes de enfriar -80 °C en tubos eppendorf identificados de forma correcta.

- 35 Por lo tanto, se prepara una suspensión de heces al 10 % en PBS (tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS, Sigma-Aldrich, Madrid, España)) y clorhidrato de L-cisteína (Scharlau CEIME, Barcelona, España) (0.05 %). Se realizan 7 diluciones de esta preparación, de 10^1 a 10^7 , finalmente se siembran 50 μ l de cada dilución en los dos medios de cultivo seleccionados y se incuban en anaerobiosis para el cultivo de bifidobacterias (Anaerogen®) y en medio rico en CO₂ para lactobacilos (CO₂Gen) durante 72 horas a 37 °C.

Ejemplo 4. Preparación de medios de cultivo.

- A continuación se indican 3 medios de cultivo específicos para bifidobacterias y un medio de cultivo específico para lactobacilos: 1. Medio de Beerens (Beerens 1990): este medio se utiliza para determinar bifidobacterias.

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

50

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

- 55
- extracto de carne 2 g
 - extracto de levadura 7 g
 - almidón 2 g
 - clorhidrato de L-cisteína 0,5 g
 - cloruro de sodio 5 g
 - peptona 5 g

60

 - triptona 2 g
 - lactulosa 5 g
 - riboflavina* 1 mg
 - tiamina* 1 mg
 - azul de metileno 16 mg

- cloruro de litio 2 g
- ácido propiónico 5 ml
- agar 15 g

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

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

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

20 Para preparar 1000 ml de este medio selectivo para bifidobacterias se utilizan las cantidades anteriormente indicadas. La mezcla se calienta con agitación constante en una placa agitadora con calor, durante un par de minutos hasta que se funda, después, la solución se autoclava. Para finalizar, cuando la solución alcanza aproximadamente los 55 °C se añade el ácido propiónico al medio de cultivo y se ajusta el pH a 5,0 con una solución de NaOH 1N. 4. Medio Rogosa Agar: este medio se utiliza para determinar lactobacilos. Para su preparación se siguen las especificaciones suministradas por la casa comercial.

25 Se prepara siguiendo las especificaciones suministradas por la casa comercial.

Ejemplo 5. Siembra de las muestras

30 Una vez realizadas las diluciones, cada una de ellas se siembra por triplicado mediante un asa de siembra. Después, todas las placas con los distintos medios de cultivo se incuban en un incubador con temperatura controlada a 37 °C.

35 Las placas con los medios de cultivo para bifidobacterias son introducen previamente en jarras de anaerobiosis a las que se les incorpora un sobrecito de Anaerogen® (sistema generador de atmósfera anaeróbica) y en las que contienen las placas de cultivo para lactobacilos, un sobrecito de CO2Gen® (sistema generador de atmósfera de CO₂), para finalizar, se incuban durante 72 horas a 37 °C.

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

40 Después de la incubación, se seleccionan las diluciones que tengan un crecimiento mayor a 10 unidades formadoras de colonia (UFC) y se recuentan las UFC en cada uno de los medios a través de un lápiz contador de colonias electrónico (contador de colonias modelo 608702, Bio Co, Kobe, Japón). Para finalizar, se calcula el número total de UFC mediante la siguiente formula:

45
$$UFC = N.^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución} \times \text{dilución}$$

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

Ejemplo 7. Determinación de la resistencia al pH y a las sales biliares.

50 Después de 72 horas de incubación, se seleccionan 100 colonias de cada uno de los medios de cultivo por niño, teniendo en cuenta la morfología observada a simple vista. Dichas colonias, tanto lactobacilos como bifidobacterias, se incuban en medio líquido Man Rogosa Shape (MRS) y en condiciones anaeróbicas durante 48 horas. 55 Posteriormente, se hace de forma inmediata una reserva en glicerol de cada una de ellas (MRS+ Glicerol al 10 %).

Al mismo tiempo que se hacen los stocks en glicerol de las distintas colonias, se analizan su viabilidad tanto a pH 3,0 como a una concentración de sales biliares al 3 % (extracto de bilis, Sigma-Aldrich, España). Para ello, la operación se realiza de la siguiente manera:

- 60
1. Las colonias se centrifugan a 5000 rpm durante 5 minutos.
 2. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en PBS estéril.
 3. Centrifugar otra vez en las mismas condiciones anteriores.
 4. Las etapas del 1 al 3 se repiten tres veces.

5. Para finalizar se resuspende en 1 ml de PBS estéril.

6. Inocular 100 ml de la suspensión anterior en 900 ml de PBS a pH 7,0 y a pH 3,0, y en extracto de bilis al 0,3 % disuelto en PBS.

7. Incubar en condiciones anaeróbicas durante 3 horas a 37 °C.

5 8. Se realizan distintas diluciones (10^1 a 10^5) para cada una de las condiciones en las que se han realizado las incubaciones.

9. Sembrar 50µl de cada dilución.

10. Incubar 72 horas a 37 °C en anaerobiosis.

10 11. Determinar mediante recuento el número de colonias presentes tanto en el control como con pH y extracto de bilis.

12. Determinar la viabilidad de cada colonia mediante el cociente:

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{N.º de colonias a pH/extracto de bilis}}{\text{N.º de colonias de control}} \times 100$$

15 Todas las colonias que muestran una viabilidad tanto a pH 3.0 como con extracto de bilis al 0,3 % mayor al 90 % se consideran como positivas, colonias que se conservan para realizar el resto de las pruebas. Las demás colonias se eliminan.

Ejemplo 8. Bacterias de controles

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

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

Para Lactobacilos: 2 lactobacilos comerciales: se utilizaron *Lactobacillus casei* (Danone®) y *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) (KAI KU®).

25 Una vez concluida la exploración inicial con las colonias seleccionadas se realizó una segunda exploración. En este caso, se verifica la viabilidad a pH 2,5 y 2,0, y con extracto de bilis al 0,5 % y 0,7 %. El protocolo a seguir es similar al utilizado en el primer ensayo. Una vez determinada la viabilidad, se determinan intervalos de viabilidad. En esta segunda exploración, los controles de bacterias comerciales presentaron valores menores a cero, por lo tanto se determinó como intervalo inicialmente óptimo para la selección de colonias positivas el que tuviera porcentajes de viabilidad mayores al 4 %. Se dividieron las colonias en 3 grupos:

Grupo 1 Colonias con viabilidad mayor al 66 %.

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

35 Grupo 3 Colonias con viabilidad mayor del 4 %.

40 Las Figuras 1 y 4 muestran los resultados de resistencia y supervivencia al pH de las cepas objeto de la invención. En el caso de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* 22A (CNCM 1-4036) y *Lactobacillus paracasei* 7 (CNCM I-4034), los resultados se ilustran en la Figura 1 y demuestran que a pH 3,0 las cepas tienen una resistencia similar o ligeramente mayor que las cepas comerciales analizadas. No obstante, a pH 2,0, la cepa 22A tiene una viabilidad muy alta en comparación con el resto de las cepas, que no sobreviven a ese pH. En el caso de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, los resultados se ilustran en la Figura 4, en donde se puede observar que a pH 3,0 la cepa 15B muestra una resistencia significativamente mucho mayor que la de las otras dos bifidobacterias analizadas, siendo su viabilidad mayor al 100 %, lo que indica que las bacterias pueden reproducirse a este pH.

45 Las Figuras 2 y 5 muestran los resultados de la influencia de las sales biliares en la supervivencia de las cepas de la presente invención. En la Figura 2 se presentan los resultados relacionados con las cepas CNCM 1-4036 y CNCM 1-4034. Como se puede concluir, ambas cepas muestran un porcentaje de supervivencia mucho mayor que las cepas comerciales analizadas, siendo el porcentaje de supervivencia mayor al 100 %, lo que indica que pueden reproducirse incluso en presencia de estas sales. En la Figura 5 se presentan los resultados relacionados con la cepa CNCM 1-4035. Como se ilustra en este dibujo, esta cepa muestra una supervivencia mayor a concentraciones superiores si se compara con las bifidobacterias de control del estado de la técnica.

Ejemplo 9. Prueba de adhesión a células epiteliales intestinales

55 Con las colonias ya seleccionadas por la resistencia al pH y a las sales biliares, se realiza el ensayo de adhesión celular. Dicho ensayo se ha realizado con células epiteliales intestinales HT29. En primer lugar se realizó una serie de intentos para determinar la adhesión celular mediante distintas tinciones: tinción de Gram, tinción de azul de metileno, tinción de giemsa, etc. Se observó que era muy difícil determinar el porcentaje de adhesión a las células HT29 a través de este medio.

60 Se planteó la cuestión de cuál podría ser el mejor método para determinar el porcentaje de adhesión, llegando a la

conclusión de que probablemente el mejor método sería el que permita recuperar todas las bacterias adheridas. Por lo tanto, se eligió el método de tripsinización y para ello se procedió de la siguiente manera:

- 5 1. Incubar las células HT29 a 37 °C y CO₂ al 5 % hasta la confluencia en placas de 24 pocillos.
2. Incubar en anaerobiosis las distintas colonias a ensayar.
3. Poner en contacto las bacterias con las células siguiendo las etapas descritas a continuación:
 - 10 a. Centrifugar las bacterias a 5000 rpm durante 5 minutos.
 - b. Eliminar el sobrenadante y resuspender las bacterias en 1 ml de PBS estéril.
 - c. Repetir las etapas a y b dos veces más.
 - d. Determinar la D.O. de cada bacteria a 600 nm.
 - e. Diluir el cultivo bacteriano hasta una D.O. de 0,8 en medio de cultivo de células, preparado previamente sin SFB (suero bovino fetal) y antibióticos (1 a 5x10⁶ UFC/ml)
 - f. Eliminar el medio de cultivo de las células.
 - 15 g. Lavar varias veces con PBS estéril para eliminar los restos de SFB y antibióticos.
 - h. Añadir 250 ml de la suspensión bacteriana a cada pocillo. Se realiza el experimento por triplicado.
 - i. Incubar a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 90 minutos.
4. Una vez incubada las bacterias con las células se realiza lo siguiente:
 - 20 a. Eliminar el medio por aspiración con una pipeta pasteur.
 - b. Lavar 4 o 5 veces con PBS 1X (pH 7,0).
 - c. Añadir 100 µl de tripsina e incubar 10-15 minutos a 37 °C.
 - d. Recuperar todo el volumen del pocillo y pasar a un tubo eppendorf.
 - 25 e. Lavar el pocillo con 150 µl de PBS e incorporar al mismo tubo eppendorf.
 - f. Hacer varias diluciones de cada muestra (4 o 5).
 - g. Sembrar 50 µl de cada dilución.
 - h. Incubar en anaerobiosis a 37 °C durante 72 horas.
 - i. Contar el número de colonias.

5. Determinar el % de adhesión.

$$\% \text{ Adhesión} = \frac{\text{N.º de colonias adherentes}}{\text{N.º de colonias inoculadas}} \times 100$$

35 La Figura 3 muestra los resultados de adhesión de las cepas CNCM 1-4036 (cepa 22A) y CNCM 1-4034 (cepa 7), objeto de la invención. Ambas cepas tienen porcentajes de adhesión mucho mayores que los porcentajes mostrados por las cepas de control (en el caso de la cepa 22A, es dos veces mayor), lo que indica su posible acción en la modulación de las actividades de las células intestinales incluyendo la inmunomodulación.

40 La Figura 6 muestra los resultados de adhesión de la cepa CNCM 1-4035 (cepa 15B), que también indican un porcentaje de adhesión celular mucho mayor que el de las cepas de control.

Ejemplo 10. Identificación de bacterias lácticas

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

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

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

1. Las colonias se centrifugan a 5000 rpm durante 5 minutos.
2. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento bacteriano en 1 ml de PBS estéril.
3. Repetir tres veces las etapas 1 y 2.
- 55 4. Para finalizar, resuspender el sedimento en 1 ml de PBS estéril.

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

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

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

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

- 20 • Oligonucleótidos utilizados:

Para amplificar el gen ADNr 16s se utilizaron los siguientes conjuntos de oligonucleótidos universales:

- 25 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (M = A + C) (SEQ. ID. NO. 1)
- 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' (Y = C + T) (SEQ. ID. No. 2)

Se amplifica un fragmento de aproximadamente 1450 pb a una temperatura de hibridación de 55 °C, tiempo de amplificación de 90 s y 35 ciclos.

- 30 39F 5'-TGGCTCAGRWYGAACGCTRG-3' (R = A + G, W = A + T, Y = C + T) (SEQ. ID. No. 3)
- 1391 R 5'-GACGGGCGGTGWGTRCA-3' (SEQ. ID. No. 4)

Se amplifica un fragmento de aproximadamente 1350 pb a una temperatura de hibridación de 52 °C, tiempo de amplificación de 90 s y 35 ciclos.

- 35 Adicionalmente se diseñaron oligonucleótidos específicos para bifidobacterias; estos son:

- 40 Bif 250 bp F 5'-CTCGTAGGCGGTTTCGTCG-3' (SEQ. ID. No. 5)
- Bif 250 bp R 5'-AACGGGCCCCACATCCAG-3' (SEQ. ID. No. 6)
- Se amplifica un fragmento de aproximadamente 250 pb a una temperatura de hibridación de 65 °C, tiempo de amplificación de 20 s y 30 ciclos.

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

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

- 50 Oligonucleótidos específicos para lactobacilos. Se amplifica un fragmento de aproximadamente 600 pb a una temperatura de hibridación de 65 °C, tiempo de amplificación de 30 s y 30 ciclos.

- ISBif F 5'-GGGATGCTGGTGTGGAAGAGA-3' (SEQ. ID. No. 9)
- ISBif R 5'-TGCTCGCTCCACTATCCAGT-3' (SEQ. ID. No. 10)

- 55 Oligonucleótidos específicos para bifidobacterias. Se amplifica un fragmento de aproximadamente 240 pb a una temperatura de hibridación de 60 °C, tiempo de amplificación de 30 s y 30 ciclos.

- 60 Para amplificar el gen ADNr 16s y espacio intergénico 16s-23s, se cargaron entre 50-100 ng de ADN para una PCR de volumen final de 50 µl, en cada ciclo se utilizó una temperatura de desnaturalización de 94 °C durante 30 s. Después se programó de acuerdo con las condiciones de cada conjunto de oligonucleótidos especificadas anteriormente.

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

Las amplificaciones que fueron negativas se repitieron, las que fueron positivas se amplificaron con el kit de GE healthcare: Ilustra™ GFX™ PCR DNA y kit gel Band Purification, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificadas, las muestras se resuspendieron en 25 ml de agua y se confirmó la purificación por visualización en un nuevo gel de agarosa al 1.3 %.

Después, las muestras se llevaron al Servicio de Secuenciación de ADN del Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra" (CSIC).

Ejemplo 11. Identificación mediante pruebas de fermentación

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

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

Cepas de estudio y condiciones de cultivo y almacenamiento

En el presente estudio se han analizado un total de 3 cepas que pertenecen al género *Lactobacillus* y *Bidifobacterium* (Tabla 1).

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

Especie	Cepa	Medio de cultivo	Temperatura	Aireación
<i>L. paracasei</i>	CNCM 1-4034	MRS	37 °C	Anaerobiosis
<i>B. breve</i>	CNCM 1-4035	MRS-cisteína al 0,05 %	37 °C	Anaerobiosis
<i>L. rhamnosus</i>	CNCM 1-4036	MRS	37 °C	Anaerobiosis

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

Tabla 2. Cepas de los microorganismos patógenos utilizados

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

Tabla 3. Cepas de los microorganismos patógenos utilizados

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

En el caso de las bacterias, estas se almacenaron en una solución de MRS a la que se añadió glicerol al 20 % (p/v) mediante congelamiento a -80 °C. Los virus se almacenaron congelados en medio MEM a -190 °C.

Obtención de los sobrenadantes sin células para el estudio

Para obtener sobrenadante concentrado para los distintos ensayos, las cepas se cultivaron en medio de cultivo durante 17 horas y 24 horas, en medio MRS (CNCM 1-4034 y CNCM 1-4036) o MRS al que se añadió cisteína al 0,05 % (CNCM 1-4035), a 37 °C. El sobrenadante de cada una de las cepas se recogió mediante centrifugación y se liofilizó. El concentrado obtenido se disolvió hasta obtener una solución concentrada 10x, el pH se neutralizó hasta un valor de 6,0 y se esterilizó mediante filtración a través de 0,22 µm. Se almacenaron congeladas a -20 °C alícuotas

del sobrenadante neutralizado y esterilizado hasta su uso.

Ensayos de actividad en medio líquido con respecto a los patógenos digestivos bacterianos

- 5 Para llevar a cabo los ensayos de inhibición en medio líquido se utilizó una modificación del protocolo de Spinier *et al.* (2008). Brevemente, se añadieron a placas de multipocillos, por separado, 250 µl de volumen de los sobrenadantes obtenidos en porcentajes crecientes (0,2 % al 4 %) (v/v) al medio de cultivo inoculado al 5 % con el cultivo de una noche de cada uno de los patógenos. Las curvas de crecimiento se obtuvieron de una manera controlada mediante la medición de la DO a 595 nm, utilizando el lector de placas Multiskan 5 Ascent. A partir de los resultados obtenidos en los distintos duplicados se evaluó la inhibición ejercida de forma cuantitativa, en la forma de porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al control sin la adición del sobrenadante de la cepa inhibidora.

Ensayos de actividad en medio líquido con respecto a los patógenos digestivos virales

- 15 Los ensayos de reducción de la infección viral por el sobrenadante de las cepas del estudio se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo publicado por Botic *et al.* (2007), con modificaciones para la adaptación del mismo al trabajo a realizarse en este proyecto. En este caso, para realizar estos ensayos, se utilizó la línea de células intestinales humanas HT-29.

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

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

- 25 Los resultados variaron en enormemente dependiendo tanto de la cepa probiótica como de la patógena. En el caso de *L. monocytogenes*, la adición del sobrenadante obtenido tras el cultivo durante 17 horas de *L. paracasei* tuvo un efecto inhibitor (Figura 10A). En el caso de *L. rhamnosus*, los mejores resultados se obtuvieron a partir de la adición del sobrenadante de 24 horas de cultivo. En el caso de *B. breve* destacó la inhibición de *L. monocytogenes* CECT 4031 T (Figura 10B). Los resultados obtenidos para *S. sonnei* fueron similares a los de *L. monocytogenes*, dado que para *L. paracasei* los mejores resultados se obtuvieron a partir de la adición del sobrenadante obtenido tras el crecimiento durante 17 h y en *L. rhamnosus* los mejores resultados se obtuvieron a partir de la adición del sobrenadante de 24 horas de cultivo (Figura 10C). En el caso de *H. pylori*, se obtuvo una reducción significativa del crecimiento del patógeno con los sobrenadantes de 17 h y 24 h de *L. paracasei* y *B. breve*, observándose la mayor inhibición en los sobrenadantes que procedían del cultivo de 24 h. Los porcentajes de inhibición obtenidos se describen en la siguiente tabla (Tabla 4).

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

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

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

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

15 El sobrenadante de la bacteria *B. breve* ejerce una inhibición del crecimiento en la bacteria *Salmonella typhi* (CECT 725). Este efecto se observa utilizando el sobrenadante en todas las condiciones (17 y 24 h, neutralizado y no neutralizado; al 1 % y al 4 %); otra vez, no se descarta la producción de cualquier tipo de bacteriocina u otro factor de naturaleza distinta (Figura 12).

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

25 Aunque en el caso de *E. coli* EPEC (CECT 742) y *Salmonella thyphimurium* (CECT 4594) se observa inhibición con el sobrenadante neutralizado de las 24 h, este efecto puede atribuirse, como en el caso anterior, a la presencia de cualquier tipo de factor o de bacteriocina que procede del medio de crecimiento de la bacteria probiótica (Figura 13).

Resultados de los ensayos de actividad en medio líquido con respecto a los patógenos digestivos virales: rotavirus humanos Ito, Wa y Va70

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

35 Una vez que el virus se amplifica en células MA-104, puede titularse en la línea HT-29. Los títulos obtenidos en unidades formadoras de focos de infección fueron de $2,02 \times 10^6$ uff/ml para el virus Ito, de $6,80 \times 10^4$ uff/ml para el virus Wa y de $2,33 \times 10^5$ uff/ml para el virus Va70. A partir de los resultados de titulación obtenidos los virus se llevaron a las concentraciones adecuadas para la infección. Para asegurar la corrección de los ensayos, los ensayos de infección se realizaron utilizando tres diluciones en serie con factor diez consecutivas y los ensayos se realizaron por triplicado. La Figura 14 resume los resultados de reducción de focos de infección obtenidos en los sobrenadantes, sin concentrar previamente los sobrenadantes neutralizados, que procedían de cultivos de 24 h. Estos resultados indican que las cepas de la presente invención reducen el foco de infección de todos los virus analizados (Wa, Ito y Va70).

Bibliografía

- 45
- Adolfsson O, Meydani SN, Russell RM. Yogurt and gut function. Am J Clin Nutr 2004; 80:245-256.
 - Agarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti AC. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2002; 1 :327-41.
 - Akalin AS, Gonc S, Duzel S, Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levéis in mice j Dairy Sci 1997; 80:2721-25.
- 50
- Andrighetto C, De Dea P, lombardi A, Neviani E, Rossetti L, Giraffa G. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. Res Microbiol 1998; 149:631-643.
 - Archer SY, Meng S, Shei A, et al. P21 (WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:6791- 96.
 - Arhné S, Molin G, Stahl S. Plasmids in *Lactobacillus* strain isolated from meat and meat products. Syst Appl Microbiol 1989; 11 :320-325.
- 55
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science.2005; 307:1915-1920.
 - Bai AP, Ouyang Q, Xiao X, Li SF. Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. Int j Clin Pract 2006; 60:284-88.
- 60
- Barry T, Collieran G, Glenon M, Dunican L, Gannon F. The 16S/23S ribosomal spacer as a target for DNA probes to identify eubacteria. PCR Methods Appl 1991; 1:51-56.
 - Beerens. Detección of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. Appl Env Microbio 1991; 57:2418-19.
 - Berg RD. Probiotics, prebiotics or "conbiotics." Trends Microbiol 1998; 6:89-92.

- Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA-1 binds to cultured human intestinal cell-lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994; 35:483-9.
- Bezirtzoglu E. The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe* 1997;3:173-177.
- 5 • Biller JA, Katz AJ, Flores AF, Buie TM, Gorbach SL. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with Lactobacillus GG. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1995; 21:224-6.
- Black FT, Andersen PL, Orskov J, *et al.* Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveler's diarrhea. *Travel Med* 1989; 7: 333-5.
- BotesM, Loos B, van Reenen CA. Adhesion fo the probiotics strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and Lactobacillus plantarum 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of
10 antibiotics and antiinflammatory medicaments. *Arch Microbiol* 2008; 190: 573-584.
- Botic, T., Klingberg, T.D., Weingartl, H., Cencic, A. (2007) A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology.* 115 (2): 227-234.
- Bouton Y, Guyot P, Grappin R. Preliminary characterization of microflora of comte cheese. *J Appl Microbiol* 1998; 85:123-131.
- 15 • Brownlee IA, Havler ME, Dettmar PW, Alien A, Pearson JP. Colonic mucus: secretion and tumover in relation to dietary fibre intake. *Proc Nutr Soc* 2003; 62:245-249.
- Butler M, Ng C, van Heel D, Lombarda G, Lechler R, Playford R, Ghosh S. Modulation of dendritic cell phenotype and function in an in vitro model of the intestinal epithelium. *Eur j Immunol* 2006; 36:864-74.
- Buts JP, De Keyser N. Effects of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. *Dig Dis Sci* 2006; 51:1485-92.
- 20 • Buts JP, DeKeyser N, Marandi S, Hermans D, Chae YHE, Lambotte L, Chanteux H, Tulkens PM. Saccharomyces boulardii up-grades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. *Gut* 1999; 45:89-96.
- Castagliuolo I, Riegler MF, Valenick L, LaMont JT, Pothoulakis C. *Sacharomyces boulardii* protease inhibits the effects of Clostridium difficile toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect Immu* 1999; 67:302-7.
- Cebeci A, Gurakan C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiol* 2003; 20:511-518.
- 25 • Cetina-Sauri G, Sierra Basto G. Evaluation therapeutique de *Saccharomyces boulardii* chez des enfants souffrant de diarrhee aigué. *Ann Pediatr* 1994 ; 41 :397-400.
- Chai F, Evdokiou A, Young GP, *et al.* Involvement of p21 (Waf1/Cip1) and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate. *Carcinogenesis* 2000; 21:7-14.
- 30 • Chu H, Kang S, Ha S, Cho K, Park SM, Han KH, *et al.* *Lactobacillus acidophilus* expressing recombinant K99 adhesive fimbriae has an inhibitory effect on adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* 2005; 49:941-8.
- Clements ML, Levine MM, Black RE, Robins-Browne RM, Cisneros LA, Drusano GL, Lanata CF, Saah AJ. Lactobacillus prophylaxis for diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1981 ; 20:104-8.
- 35 • Coconnier M, Lievin V, Bernet-Camard MF, Hudault S, Servin A. Antibacterial effect of the adhering human Lactobacillus acidophilus strain LB. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41 :1046-52.
- Collins M, Samelis J, Metaxopoulos J, Wallbanks S. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organims from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J Appl Bacteriol* 1993; 75:595-603.
- 40 • Coronen R, Korpela R, Moilanen E. Signalling mechanisms involved in the induction of inducible nitric oxide synthase by *Lactobacillus rhamnosus* GG, endotoxin, and lipoteichoic acid. *Inflammation* 2002; 26:207-14.
- Cui H, Chen CL, Wang JD, Yang UJ, Cun Y, Wu JB, Liu YH, Dan HL, Jian YT, Chen XQ.Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World j Gastroenterol* 2004; 10:1521-25.
- 45 • D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ* 2002; 324:1361.
- Danielson AD, Peo ER Jr, Shahani KM, Lewis AJ, Whalen PJ, Amer MA.Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J Anim ScL* 1989;67: 966-74.
- 50 • De angelis M, Corsetti A, Tosti N, Rossi J, Corbo M, Gobbetti M. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheese based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Appl Environ Microbiol* 2001 ; 67:2010-20.
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe MT. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 1960; 23:130-5.
- De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr.* 2001 ; 73:421 S- 429S.
- 55 • Desjardins ML and Roy D. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *J Dairy Sci* 1990; 73:299-307.
- Di Caro S, Tao H, Grillo A, EHa C, Gasbarrini G, Sepúlveda AR, Gasbarrini A. Effects of *Lactobacillus* GG on genes expression pattern in small bowel mucosa. *Dig Liver Dis* 2005; 37:320-29.
- Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Luinetti O, *et al.* Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2003; 46:1498-1507.
- 60 • Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, Morrissey D, Thornton G, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Quigley EM, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1999; 76:279-92.

- Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. In vitro selection criteria for probiótico bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J clin Nutr* 2001 ; 73 (supl.) 386S-92S.
- 5 • Eaden JA, Abrams KR, Matberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48:526-535.
- Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson M, Andersson R, Willen R, Jeppsson B, Molin G, Bengmark S. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat *Digestion* 1993; 54:248-255.
- FAO/ANHO (2002). Informe de un Grupo Mixto FAO/OMS de Redacción de Directrices para la Evaluación de Probióticos en los Alimentos
- 10 • Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel J, Mizon j. Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1997; 42:817-822.
- Floch MH, Binder HJ, Filburn B, Gershengoren W. The effect of bile acids on intestinal micromicrobiota. *Am J Clin Nutr* 1972; 25:1418-26.
- Forestier C, de Champs C, Valtoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res microbiol* 2001 ; 152:167-173
- 15 • Fukushima M, Nakano M. Effect of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat- and cholesterol-enriched diet. *Br j Nutr* 1996; 76:857-67.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 1989; 66:365-78.
- Fuller R., ed. Probiotics: the scientific basis. Londres: Chapman & Hall, 1992
- 20 • Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 1985; 49:377-81.
- Goldin BR, Gorbach SL. Probiotics for humans. In: Fuller R, ed. Probiotics, the scientific basis. Londres: Chapman and Hall, 1992;355-76.
- Gopal P, Sullivan P, Smart J. Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrate for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR 10 and *Lactobacillus acidophilus* DR 20. *Int Dairy J* 2001; 11 : 19-25.
- 25 • Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strain and their antagonistic activity against an eterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 2001 ; 67:207-16.
- 30 • Gorbach SL, Chang TW, Goldin B. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *Lancet.* 1987; 2:1519.
- Gordon JI, Hooper LV, McNevin MS, Wong M, Bry L. Epithelial cell growth and differentiation. III. promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1997; 273:G565-G70.
- 35 • Gotz V, Romankiewicz JA, Moss J, Murray HW. Prophylaxis against ampicillin- associated diarrhea with a lactoba-cillus preparation. *Am J Hosp Pharm.* 1979 ;36:754- 7.
- Grupa P, Andrew H, Kirschner BS, *et al.* Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31:453-457.
- 40 • Gulewicz P, Szymaniec S, Bubak B, Frias J, Vidal-Valverde C, Trajanowska K, Gulewicz K. Biological activity of a-galactoside preparations from *Lupinus angustifolius* L and *Pisum sativum* L seeds. *J Agr food chem* 2002; 50:384-389.
- Harms HK, Bertele-Harms RM, Bruer-Kleis D. Enzyme-substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *N Engl J Med.* 1987 ;316:1306-9.
- 45 • Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30:61-67.
- Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function. *Cell Growth Differ* 1997; 8:523-532.
- 50 • Heiling HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteu P, Akkermans AD, and de Vos WM. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. And other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:114-123.
- Henriksson A, Khaled AKD, PL Conway. *Lactobacillus* colonization of the gastrointestinal tract of mice after removal of the non secreting stomach region. *Microb Ecol Health Dis* 1999; 11 :96-9.
- Hilton E, Kolakowski P, Singer C, Smith M. Efficacy of *Lactobacillus* GG as a Diarrheal Preventive in Travelers. *J Travel Med.* 1997; 4:41-43.
- 55 • Hóchter W, Chase D, Hegenhoff G. *Saccharomyces boulardii* in treatment of acute adult diarrhea. Efficacy and tolerance of treatment. *Munch Med Wochen* 1990; 132:188-92.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huisin't Veld, J.H.J., Overv;ewof gutflora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 1998; 41, 85-101.
- 60 • Hopkins M, Cummings H, McFarlane G. Interspecies differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate source. *J Appl Microbiol* 1998; 85:381-386.
- Isolauri E, Salminen S,. Probiotics, gut inflammation and barrier function. *Gastroentero Clin North Am* 2005; 34:437-450.

- Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, *et al.* Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 1996; 180:152-159.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol Rev* 1995; 59:171-200.
- 5 • Jankowska A, Laubitz D, Antushevich H, Zabielski R, Grzesiuk E. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *J Biomed Biotechnol* 2008; 2008:357964.
- Jin LZ, Ho WY, Abdullah N, Jalaludin S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998; 27:183-185.
- Jobin C, Sartor RB. The I κ B/NF- κ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278:C451-C462.
- 10 • Julia M, Wong RD, Russell de Souza RD, Cyril W, *et al.* Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40:235-243.
- Kalliomaki MA, Isolauri E. Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004; 24:739-752.
- 15 • Kelsall B, Biron C, Sharma O, Kaye P. Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nat Immunol* 2002; 3:699-702.
- Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by acid lactic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 12:39-85.
- Ko JS, Yang HR, Chang JY, Seo JK. *Lactobacillus plantarum* inhibits epithelial barrier dysfunction and interleukin-8 secretion induced by tumor necrosis factor- α . *World J Gastroenterol* 2007; 13:1962-65.
- Kollaritsch H, Holst H, Grobara P, *et al.* Prophylaxe der reisediarrhoe mit *Saccharomyces boulardii*. *Forst Chr Med* 1993; 111 : 152-56.
- 20 • Koshiji M, Adachi Y, Sogo S. Apoptosis of colorectal adenocarcinoma (COLO201) by tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and/or interferon -gamma (IFN- γ), resulting from down-regulation of Bcl-2 expression. *Clin Exp Immunol* 1998; 111 : 211- 218.
- Kulkarni N, Zang E, Kelloff G. Effect of the chemopreventive agents piroxicam and D,L-alpha-difluoromethylornithine on intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1992; 13:995-1000.
- 25 • Kurmann J. Started for fermented milk: Started with selected intestinal bacteria. *Bull Int Dairy Fed* 1988; 227:41-45.
- Lee Y-K, Salminen S. The coming age of probiotics. *Trends Food Sci Technol* 1995; 6:241-5.
- Lee, Y.K., Puong, K.Y., Ouwehand, A.C, Salminen, S., . Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli *J Med Microbiol* 2003; 52:925-930.
- 30 • Lewis R, Gorbach S. Modification of bile acids by intestinal bacteria. *Arch Intern Med* 1972; 130:545-9.
- Lin MY, Yen CL, Chen SH. Management of lactose maldigestion by consuming milk containing lactobacilli. *Dig Dis Sci.* 1998; 43:133-7.
- Lin SY, Ayres JW, Winkler W, Sandine WE. *Lactobacillus* effects on cholesterol: in vitro and in vivo results. *J Dairy Res* 1989; 72:885-9.
- 35 • Madsen K, Cornish A, Soper P, *et al.* Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001 ; 121 :580-591.
- Mahé S, Marteau P, Huneau JF, Thuillier F, Tome D. Intestinal nitrogen and electrolyte movements following fermented milk ingestion in man. *Br J Nutr.* 1994; 71 :169-80.
- 40 • Makras L, Van Acker G, De Vuyst L. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71 :6531-6537.
- Marini M, Bamias G, Rivera-Nieves J. TNF-D neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8366-8371.
- Marteau P, Flourie B, Pochart P, Chastang C, Desjeux JF, Rambaud JC. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br J Nutr.* 1990; 64:71-9.
- 45 • McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, *et al.* Prevention of β -lactam associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:439-48.
- Medina R, Katz M, González S, Oliver G. Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from northwest Argentina. *J Food Prot* 2001 ; 64:559-563.
- 50 • Medina V, Edmonds B, Young G, James R, Appleton S, Zalewski P. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): Dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. 1997; 57:3697-3707.
- Metchnikoff E. Etudes sur la flore intestinale. *Ann. Inst. Pasteur Paris* 1908; 22:929-55.
- 55 • Morata De Ambrosini, Ganzalez, S.N., Oliver, G. Study of adhesion of *Lactobacillus casei* CRL431 to ileal intestinal cells of mice. *J. Food Prot.* 1999; 1430-1434.
- Nanno M, Morotomi M, Takayama H, Kuroshima T, Tanaka R, Mutai M. Mutagenic activation of biliary metabolites of benzo(a)pyrene by β -glucuronidase-positive bacteria in human faeces. *J Med Microbiol* 1986; 22:351.
- 60 • Navarro E, Simonet P, Normard P, Bardin R. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analyses of the ribosomal intergenic spacer. *Arch Microbiol* 1992; 157:107-115.
- Nebra Y, Blanch AR. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:5173-6.
- Niedergang F, Kweon M. New trends in antigen uptake in the gut mucosa. *Trends Microbiol* 2005; 13:485-90.
- O'Hara A, O'Regan P, Fanning A, O'Mahony C, MacSharry J, Lyons A, Bienenstock J, O'Mahony L, Sanan F.

- Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. Immunology 2006; 118:202-15.
- Otlés S, Cagindi O & Akcicek E Probiotics and health. Asian Pac J Cancer Prev 2003; 4:369-372.
 - Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., Salminen, S. Probiotics: mechanisms and established effects. Intern Dairy J 1999; 9:43-52.
 - Percy-Robb IW, Collee JG. Bile acids: a pH dependent antibacterial system in the gut? Br Med J 1972; 3:813-5.
 - Piaia M, Antoine JM, Mateos-Guardia JA, Lepigard A, Lenoir-Wijnkoop I. Assessment of the benefits of live yogurt methods and markers for in vivo studies of the physiological effects of yogurt cultures. Microb Ecol Health Dis 2003; 15:79-87.
 - Pickard KM, Bremner AR, Gordon JN, *et al.* Microbial-gut interactions in health and disease. Immune responses. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2004; 18:271-285.
 - Plant, L.J., Conway, P.L., 2002. Adjuvant properties and colonization potential of adhering and non-adhering *Lactobacillus* spp. Following oral administration to mice. FEMS Immunol Med Microbiol 2002; 34:105-111.
 - Ratajczak C, Duez C, Grangette C, Pochard P, Tonnel AB, Pestel J. Impact of lactic acid bacteria on dendritic cells from allergic patients in an experimental model of intestinal epithelium. J Biomed Biotechnol 2007; 1 :719-21.
 - Riedel C, Foata F, Philippe D, Adolfsson O, Eikmanns B, Blum S. Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF- κ B activation. World J Gastroenterol 2006; 12:3729-35.
 - Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro G, Nespoli A, Viale G, Allavena P, Rescigno M. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. Nat Immunol 2005; 6:507-14.
 - Rioux KP, Fedorak RN. Probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. J Clin Gastroenterol 2006; 40:260-263.
 - Roberfroid M, Van Loo E, Gibson R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products, J Nutr 1998; 128:11-19.
 - Ross RP, Desmond C, Fitzgerald GF, Stanton C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic food. J. Appl. Microbiol. 2005; 98:1410-17.
 - Sablón E, Contreras B, Vandamme E. Antimicrobial peptide of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. Adv Biochem Eng Biotechnol 2000; 68:21- 60. :
 - Satokari RM, Vaughan EE, Favier C, Dore J, Edwards C, y de Vos WM. Diversity of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in breast-fed and formula-fed infants as assessed by 16S rDNA sequence differences. Microbiol Ecol Health Dis 2002; 14:97-105.
 - Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Annu Rev Microbiol 1977 31 ; 31 :107-33.
 - Senmeir J, deVrese M. Probiotics, prebiotics, and Synbiotics, approaching a definition. Am J Clin Nutr 2001 ; 73:361 S-64S.
 - Servin A. Antagonistic activities of *lactobacilli* and *bifidobacteria* against microbial pathogens. FEMS Microbiol Rev 2004; 28:405-440.
 - Siitonen S, Vapaatalo H, Salminen S, Gordin A, Saxelin M, Wikberg R, Kirkkola AL. Effect of *Lactobacillus GG* yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhea. Ann Med. 1990; 22:57-9.
 - Silva M, Jacobs NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain: Antimicrob Agents Chemother. 1987; 31 :1231-33.
 - Sing J, Rvenson A, Tomita M, Shimamura S, Ishibashi N, Reddy B. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. Carcinogenesis 1997; 18:833-41.
 - Sinocrope FA, Roddey G, Mc Donnell TJ. Increased apoptosis accompanies neoplastic development in the human colorectum. Clin Cancer Res 1996; 2:1999-2006.
 - Snelling AM Effects of probiotics on the gastrointestinal tract. Curr Opin Infect Dis 2005; 18:420-426.
 - Spinier, J. K., Taweetotipatr, M., Rognerud, C. L., Oub, C. N., Tumwasorn, S., Versalovic, J. (2008) Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. Anaerobe 14: 166- 171.
 - Steiner TS, Nataro JP, Poteet-Smith CE, Smith JA, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. J Clin Invest 2000; 105:1769-77.
 - Stewart L, Pellegrini CA, Way LW. Antibacterial activity of bile acids against common biliary tract organisms. Surg Forum 1986; 37:157-9.
 - Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, McFarland LV, Chinn J, Van Belle G. Prevention of antibiotic associated diarrhoea by *Saccharomyces boulardii*: A prospective study. Gastroenterology 1989; 96:981-88.
 - Taranto MP, Medici M, Perdígón G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. J Dairy Sci. 1998; 81 :2336-40.
 - Thornton GM. Probiotic bacteria. Selection of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from the healthy human gastrointestinal tract; characterization of a novel *Lactobacillus*-derived antibacterial protein. PhD thesis. National University of Ireland, Cork, Ireland, 1996.
 - Tien MT, Girardin S, Regnault B, Le Bourhis L, Dillies M, Coppée JY, Bourdet-Sicard R, Sansonetti P, Pédrón T. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected Human Intestinal Epithelial Cells. J Immunol 2006; 176:1228-37.
 - Todoriki K, Mukai T, Sato S, Toba T. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by

- Lactobacillus* strains. J Appl Microbiol 2001 ; 91:154-9.
- Tsai C, Lin P, Hsieh Y. Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown in vitro. Anaerobe 2008; 14:61-7.
 - 5 • Tuomola EM, Salminen SJ. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures, Int J Food Microbiol 1998; 41 : 45-51
 - Van Loo J, Cummings J, Delzenne N, Englyst H, Franck A, Hopkins M, Kok N, Macfarlane G, Newton D, Quigley M, Roberfroid M. Functional food properties of nondigestible oligosaccharides a consensus report from the ENDO project (DGXII AI- RII-CT94-1095) Br J Nutr 1999; 81 :121-132.
 - 10 • Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young RJ. *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. J Pediatr. 1999; 135:564-8. i
 - Wallace T, Bradley S, Buckley N, Green-Johnson JM. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. J food Protect 2003; 66:466-72.
 - Wang S, Ng L, Chow WL, Lee YK. Infant intestinal *Enterococcus faecalis* down-regulates inflammatory responses in human intestinal cell lines. World J Gastroenterol 2008;14:1067-76.
 - 15 • Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. Blood 1990; 76:655-66.
 - Wunderlich PF, Braun L, Fumagalli I, D'Apuzzo V, Heim F, Karly M, Lodi R, Politta G, Vonbank F, Zeltner L. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. J Int Med Res. 1989; 17:333-8.
 - 20 • Yan F, Polk D. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. J Biolog Chem 2002; 277:50959-50965.
 - Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. J Nutr 2005; 135:1752-56.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> HERO AG
- 30 <120> AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD PROBIÓTICA A PARTIR DE HECES DE LACTANTES ALIMENTADOS EXCLUSIVAMENTE CON LECHE MATERNA
- <130> AX140205EP-HER015B
- 35 <150> EP10750390.6
<151> 09-03-2010
- <160> 10
- 40 <170> BiSSAP 1.0
- <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /moL_type="ADN" /nota="Oligonucleótido 27F" /organismo="Secuencia artificial"
- 50 <400> 1
agagtttgat cmtggctcag 20
- 55 <210> 2
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>
<221> fuente
<222> 1..22
<223> /moL_type="ADN" /nota="Oligonucleótido 1492R" /organismo="Secuencia artificial"
- <400> 2

ES 2 636 944 T3

tacggytacc ttgttacgac tt 22

5 <210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_type="ADN" /nota="Oligonucleótido 39F" /organismo="Secuencia artificial"
<400> 3
tggctcagrw ygaacgctrg 20

15 <210> 4
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<222> 1..17
<223> /mol_type="ADN" /nota="Oligonucleótido 1391R" /organismo="Secuencia artificial"

25 <400> 4
gacgggcggt gwgtrca 17

30 <210> 5
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<222> 1..18
<223> /mol_type="ADN" /nota="Oligonucleótidos específicos para *Bifidobacterium* Bif 250bp F"
/organismo="Secuencia artificial"

40 <400> 5
ctcgtaggcg gttcgtcg 18

45 <210> 6
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<221> fuente
<222> 1..18
<223> /mol_type="ADN" /nota="Oligonucleótidos específicos para *Bifidobacterium* Bif 250bp R"
/organismo="Secuencia artificial"

55 <400> 6
aacgggcccc acatccag 18

60 <210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_type="ADN" /nota="Oligonucleótido lactoF" /organismo="Secuencia artificial"

ES 2 636 944 T3

<400> 7
acaccgcccg tcacaccatg 20

5 <210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_type="ADN" /nota="Oligonucleótido lactoR" /organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 8
cchsttcgct cgccgctact 20

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<222> 1..21
25 <223> /mol_type="ADN" /nota="Oligonucleótido ISBif F" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 9
gggatgctgg tgtggaagag a 21

30 <210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<222> 1..21
<223> /mol_type="ADN" /nota="Oligonucleótido ISBif R" /organismo="Secuencia artificial"

40 <400> 10
tgctcgcgctc cactatccag t 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa de microorganismo probiótico aislada de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna **caracterizada porque** consiste en *Bifidobacterium breve* HERO 15B con número de referencia CNCM I-4035, depositada el 2 de julio de 2008 en el CNCM National Collection of Microorganism Culture, Pasteur Institute 25, Rue du Docteur Roux, F-75724 París.
- 10 2. La cepa de microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizada porque** se presenta en forma de un cultivo biológico puro.
3. La cepa de microorganismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por** estar aislada.
- 15 4. La cepa de microorganismo probiótico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizada porque** se presenta en forma de células viables.
- 20 5. La cepa de microorganismo probiótico de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, **caracterizada porque** se presenta en forma de células no viables.
- 25 6. Una formulación que comprende una cepa de un microorganismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
7. La formulación de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada porque** comprende adicionalmente otro material probiótico.
8. La formulación de acuerdo con las reivindicaciones 6 - 7, **caracterizada porque** comprende adicionalmente material prebiótico.
- 30 9. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8, **caracterizada porque** comprende adicionalmente un vehículo adecuado para la ingestión de la misma.
- 35 10. La formulación de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizada porque** dicho vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como cápsulas, comprimidos o polvo.
- 40 11. La formulación de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizada porque** dicho vehículo es un producto alimenticio.
12. La formulación de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizada porque** dicho producto alimenticio se selecciona del grupo que consiste en leche y productos derivados de la leche, en especial leche fermentada y quesos; cereales y derivados, incluidas masas de pan; sopas y productos en forma deshidratada; productos cárnicos fermentados; derivados de frutas, jugos y refrescos; alimentos para usos nutritivos específicos.
- 45 13. La cepa de microorganismo probiótico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-12 para su uso en dietas.
- 50 14. La cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 5 o la formulación de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en lactantes y/o adultos, y/o en dietas especiales.
- 55 15. La cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 5 o la formulación de acuerdo con la reivindicación 14 para su uso en la preparación de una leche de fórmula para lactantes.
16. La cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 5 o la formulación de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizada porque** la leche de fórmula consiste en leche para lactantes lista para el uso y/o cereales para lactantes, y/o alimentos para lactantes.
- 60 17. La cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 5 o la formulación de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en la preparación de complementos alimenticios.
18. La cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 5 o la formulación de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en la preparación de fórmulas especiales para la nutrición oral y/o entérica.
19. La cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 5 o la formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 - 10 para su uso en la preparación de un producto farmacéutico.

20. La cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 5 o la formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 - 10 para su uso en la estimulación del sistema inmunitario y/o en la/el prevención/tratamiento del asma, y/o en la/el prevención/tratamiento de trastornos gastrointestinales, y/o en la eliminación/modulación de los principales patógenos digestivos, y/o en la/el prevención/tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades, que incluyen el síndrome metabólico y la diabetes, y/o en las enfermedades asociadas con el envejecimiento típicas.

5
21. La cepa de las reivindicaciones 1 - 5 o la formulación de las reivindicaciones 6 - 10, para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, **caracterizada porque** dichos trastornos gastrointestinales comprenden alteraciones del tránsito intestinal, tales como el estreñimiento, y alteraciones de la biodisponibilidad de minerales, infecciones y síndromes de malabsorción.

10
22. La cepa de las reivindicaciones 1 - 5 o la formulación de las reivindicaciones 6 - 10, para uso de acuerdo con la reivindicación 21, **caracterizada porque** dichas infecciones comprenden infecciones gástricas e infecciones gastrointestinales con diarrea aguda o crónica.

15
23. La cepa de las reivindicaciones 1 - 5 o la formulación de las reivindicaciones 6 - 10, para su uso de acuerdo con la reivindicación 21, **caracterizada porque** dichos síndromes de malabsorción comprenden trastornos que afectan la anatomía del intestino, tales como el síndrome del intestino corto, y trastornos que afectan la fisiología del intestino, tales como la fibrosis quística del páncreas, la malabsorción de azúcares, en especial la lactosa, alteraciones de la absorción de los lípidos, alergias alimentarias y enfermedades inflamatorias intestinales tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

20

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

FIG 1

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

FIG 2

Muestra	Control	Adhesión	%
LGG	1,98E+08	9,50E+06	4,80
<i>L. casei</i>	3,25E+09	1,33E+08	4,09
7	1,05E+08	7,87E+06	7,48
22A	5,88E+08	6,58E+07	11,55

FIG 3

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

FIG 4

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

FIG 5

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

FIG 6

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

FIG 7

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

FIG 8

22A	7	<i>L. casei</i>	LGG	
-	-	-	-	Control
-	-	-	-	Glicerol
-	-	-	-	Eritritol
-	-	-	+	D-Arabinosa
-	-	-	-	L-Arabinosa
+	+	+	+	D-Ribosa
-	-	-	-	D-Xilosa
-	-	-	-	L-Xilosa
-	+	+	-	D-Adonitol
-	-	-	-	Metil-βD-Xilopiranosido
+	+	+	+	D-Galactosa
+	+	+	+	D-Glucosa
+	+	+	+	D-Fructosa
+	+	+	+	D-Manosa
+	+	+	-	L-Sorbosa
+	+	-	-	L-Ramnosa
-	+	+	+	Dulcitol
-	-	-	-	Inositol
+	+	+	+	D-Manitol
+	+	+	+	D-Sorbitol
-	-	-	-	Metil-αD-Manopiranosido
+	+	+	-	Metil-αD-Glucopiranosido
+	+	+	+	N-Acetilglucosamina
+	+	+	+	Amigdalina
+	+	+	+	Arbutina
+	+	+	+	Esculina citrato férrico

FIG 9 A

22A		<i>L. casei</i>	I GG	
+	+	+	+	Salicina
+	+	+	+	D-Celobiosa
v	v	+	-	D-Maltosa
+	+	+	-	D-Lactosa (de origen bovino)
-	-	-	-	D-Melobiosa
-	+	v	v	D-Sacarosa
+	+	+	+	D-Trehalosa
-	+	-	-	Inulina
+	+	-	+	D-Melezitosa
-	-	-	-	D-Rafinosa
-	-	-	-	Almidón
-	-	-	-	Glicógeno
-	-	-	-	Xilitol
v	v	v	+	Gentiobiosa
+	+	+	-	D-Turanosa
-	v	v	-	D-Lixosa
+	+	+	+	D-Tagatosa
-	-	-	-	D-Fucosa
-	-	v	+	L-Fucosa
-	-	-	-	D-Arabitol
-	-	-	-	L-Arabitol
v	v	v	v	Gluconato potásico
-	-	-	-	2-Cetogluconato potásico
-	-	-	-	5-Cetogluconato potásico

FIG 9 B

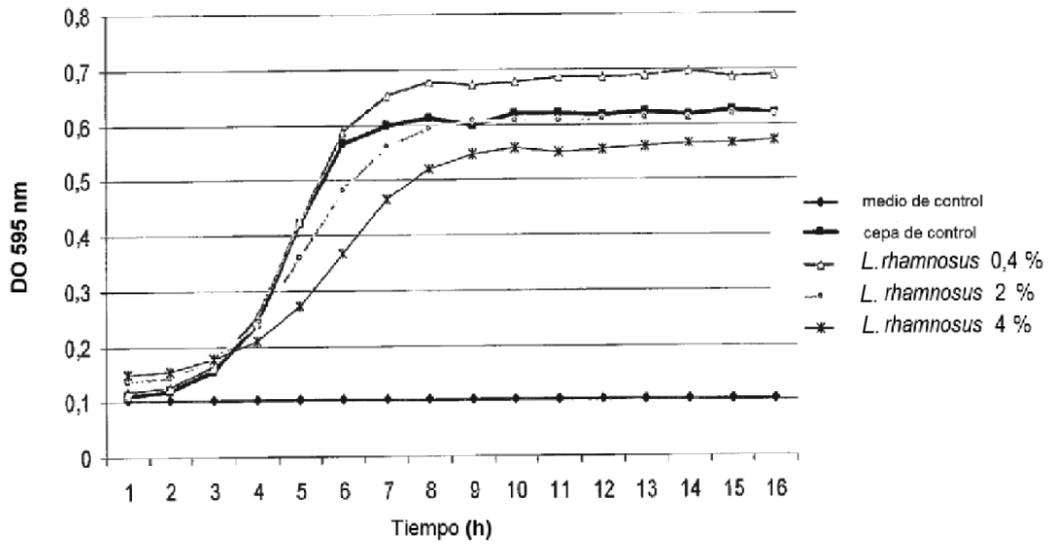


FIG 10A

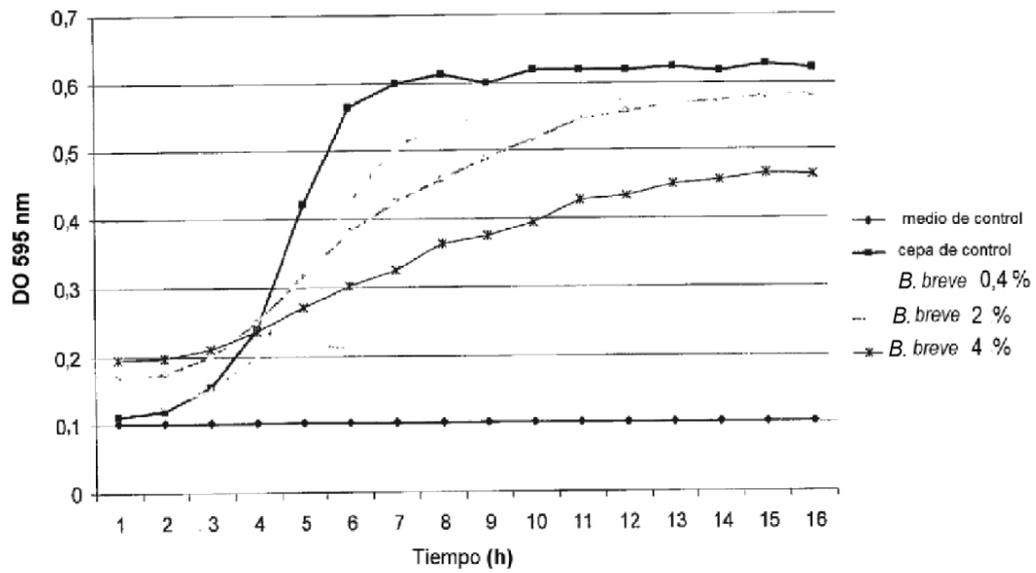


FIG 10B

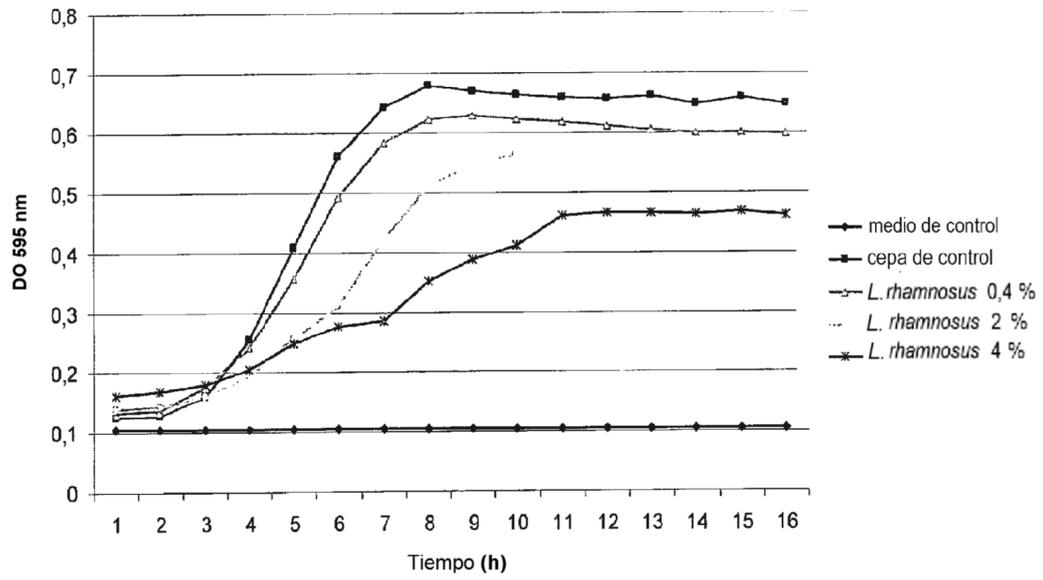


FIG 10C

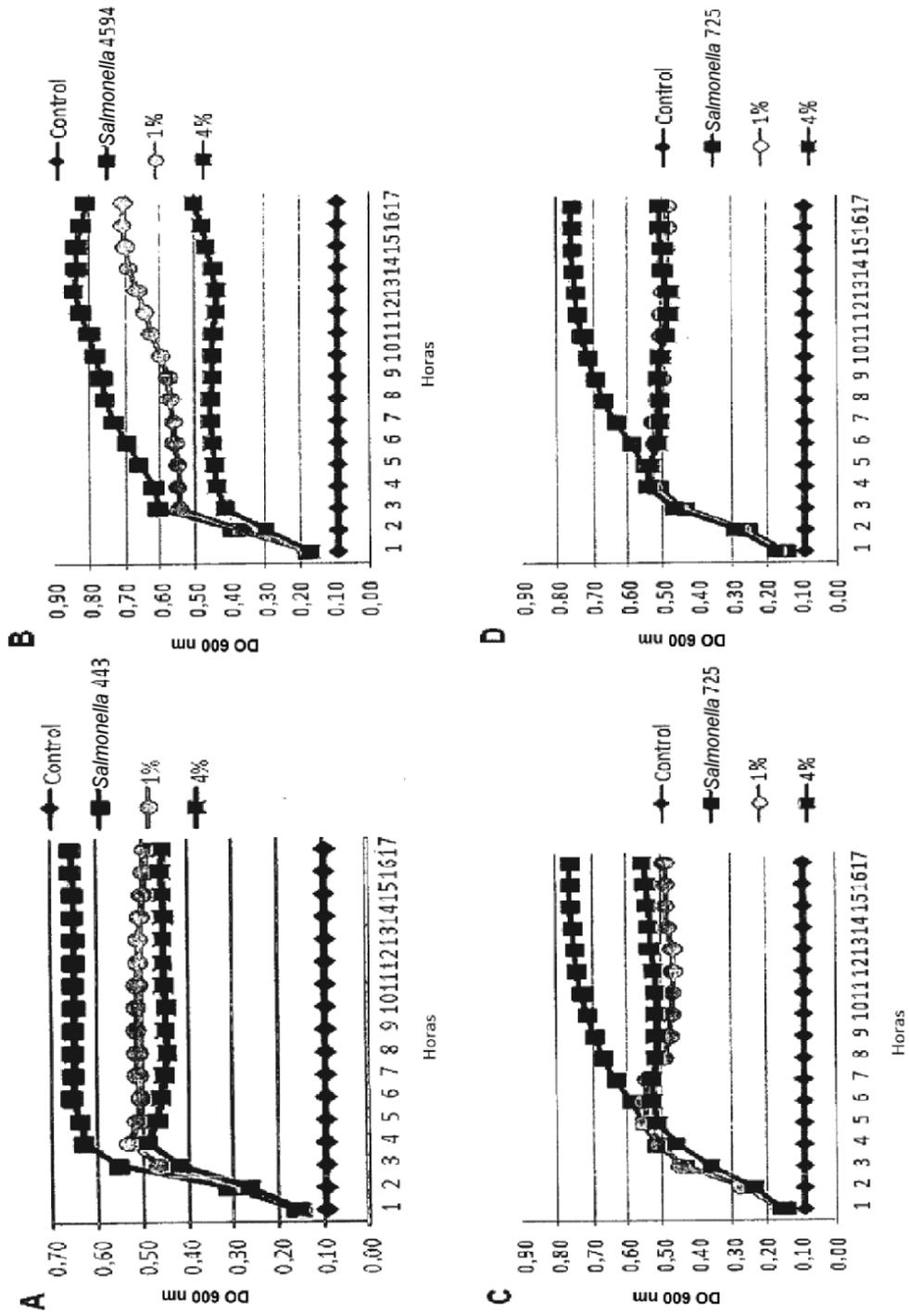


FIG 11

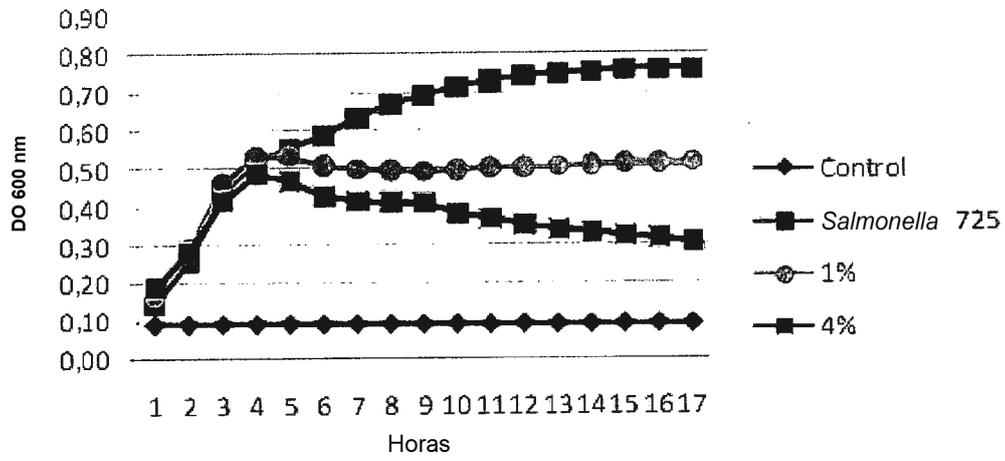


FIG 11E

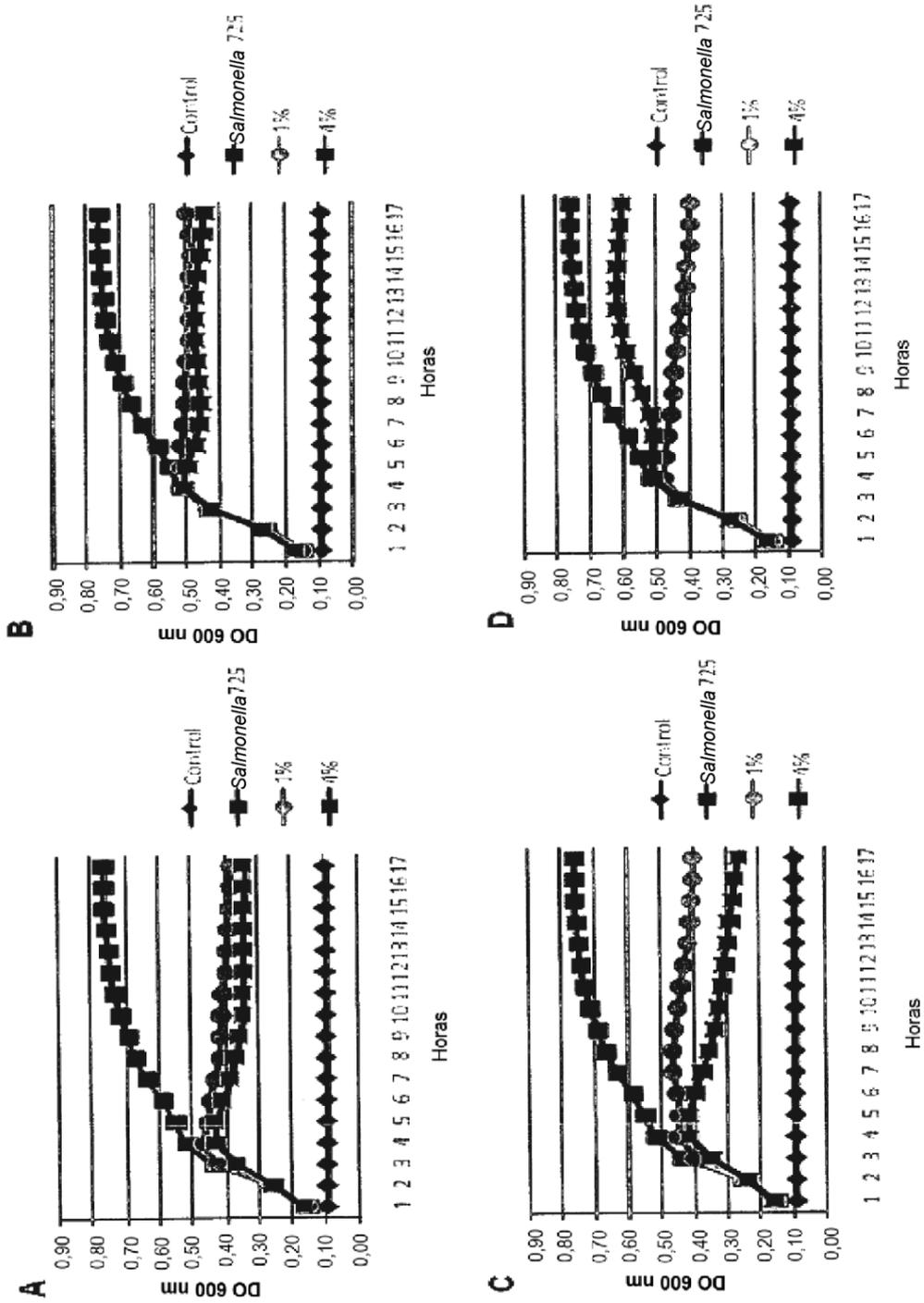


FIG 12

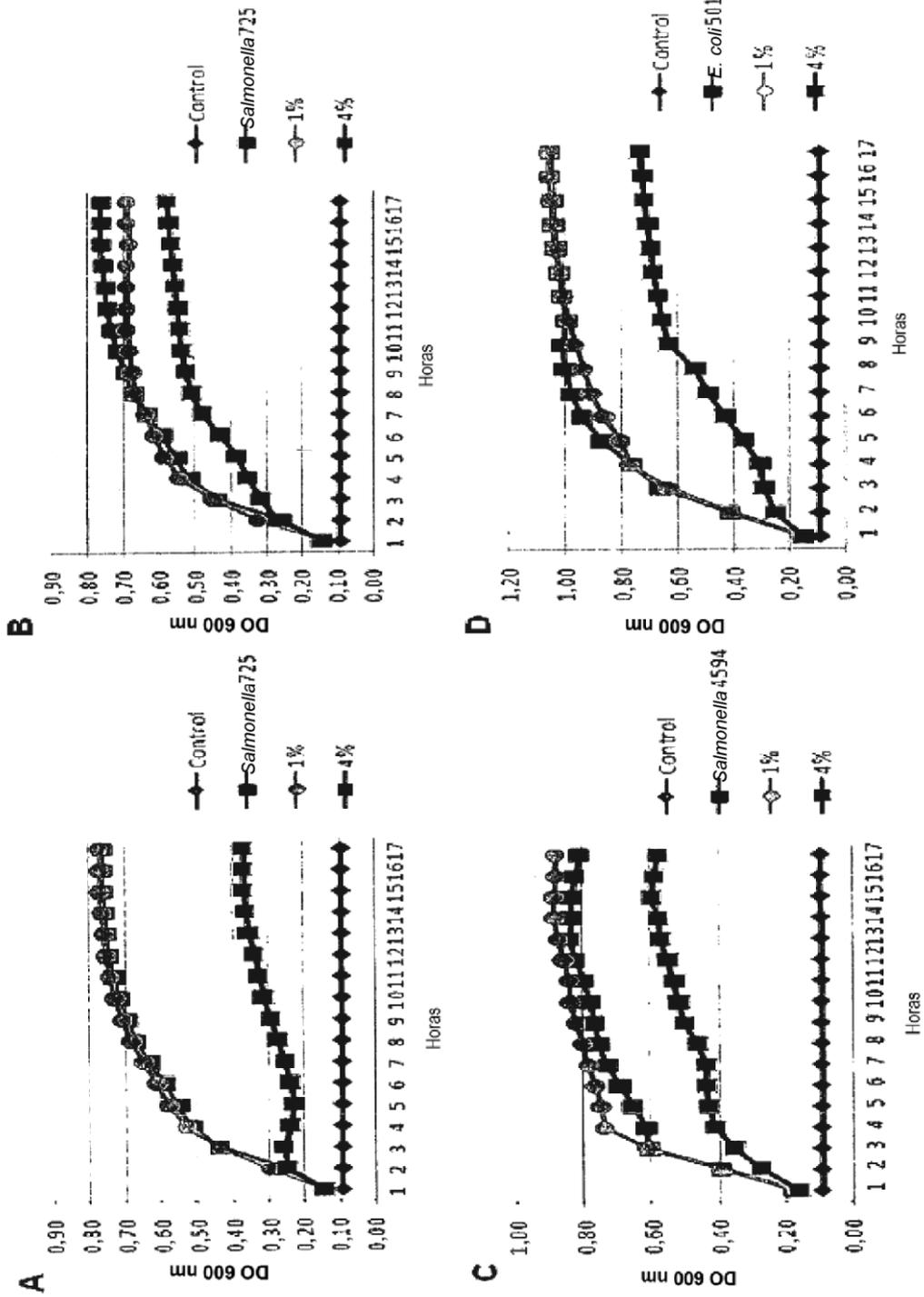


FIG 13

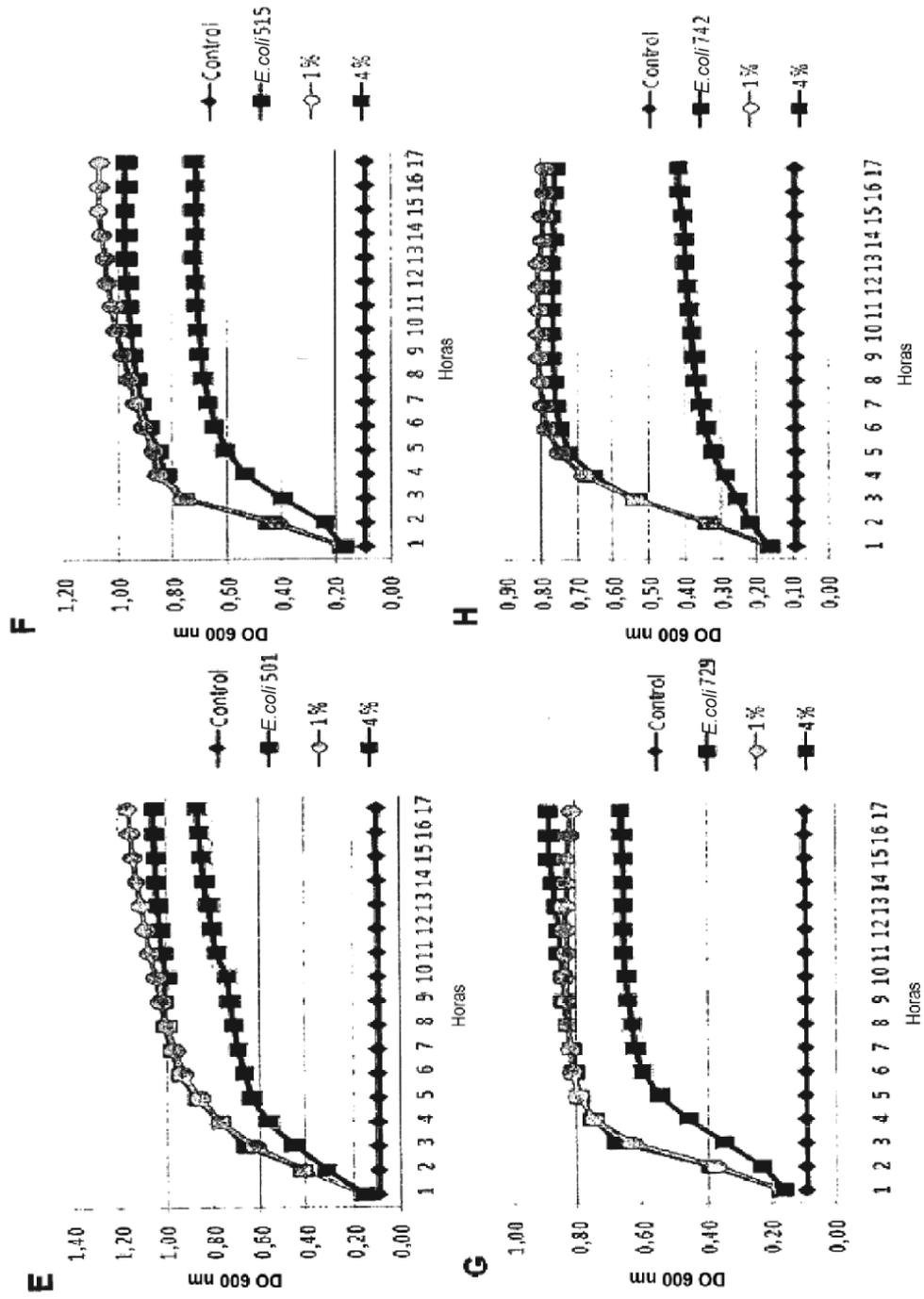


FIG 13

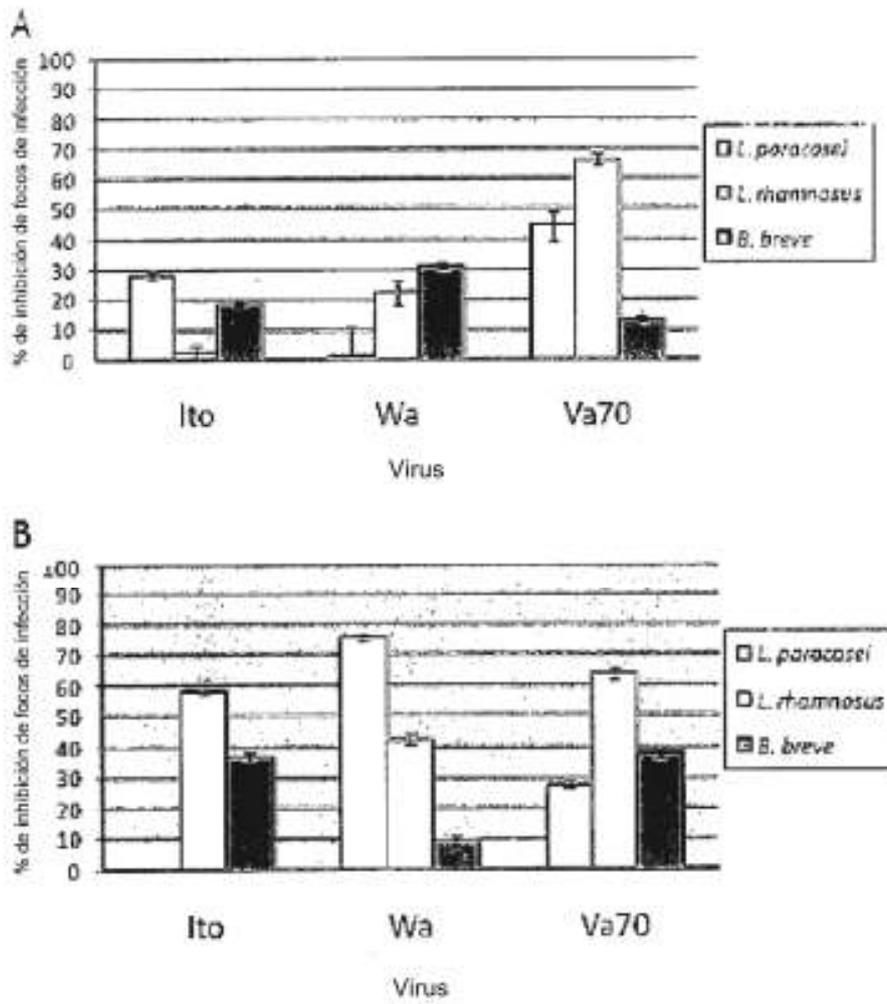


FIG. 14