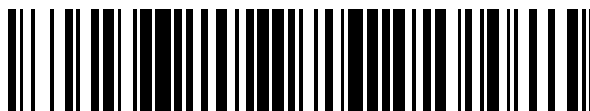


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 055**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2010 PCT/IB2010/003244**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11073769**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2010 E 10813105 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2513292**

54 Título: **Cepas de bacterias probióticas que producen ácido linoleico conjugado y uso de las mismas para la preparación de una composición farmacéutica**

30 Prioridad:

16.12.2009 IT RM20090662
03.12.2010 IT MI20102235

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.12.2017

73 Titular/es:

PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)
Via E. Mattei 3
28100 Novara, IT

72 Inventor/es:

MOGNA, GIOVANNI;
STROZZI, GIAN PAOLO y
PANE, MARCO

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 648 055 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cepas de bacterias probióticas que producen ácido linoleico conjugado y uso de las mismas para la preparación de una composición farmacéutica

La presente invención se refiere a cepas de bacterias probióticas que producen ácido linoleico conjugado (CLA). En particular, la presente invención se refiere a una selección de cepas bacterianas que pertenecen al género *Bifidobacterium* que se seleccionaron por su capacidad para producir ácido linoleico conjugado (CLA) a partir de ácido linoleico (LA). Además, la presente invención se refiere a una composición alimenticia, dietética o farmacéutica que comprende dichas cepas bacterianas y que es capaz de aumentar la cantidad de CLA *in situ*, es decir, dentro del tubo gastrointestinal.

Se conoce el uso de ácido linoleico conjugado (CLA) en la preparación de productos y complementos alimenticios.

El desarrollo de dichas preparaciones está unido a los efectos beneficiosos proporcionados por el CLA dentro del organismo.

Sin embargo, en los últimos treinta años, la ingesta alimenticia de CLA ha disminuido drásticamente por dos motivos fundamentales.

En primer lugar, el consumo de derivados de la leche y cerdo, que representan las fuentes principales de estas moléculas, ha disminuido enormemente.

En segundo lugar, las técnicas modernas de cría de ganado han conducido a que se reemplace el pasto y el forraje por piensos producidos de manera industrial, que no contienen mucho ácido linoleico natural.

Se conoce la adición de CLA a un sustrato alimenticio para preparar alimentos ricos en/complementados con CLA. Sin embargo, dichos productos alimenticios enriquecidos/complementados con CLA presentan varios inconvenientes y límites de aplicación debido al hecho de que la administración oral de los mismos no siempre representa una manera válida y eficaz de administrar CLA en el organismo; en particular la administración *in situ* de CLA en el tubo gastrointestinal de interés está muy comprometida y limitada. Además, en algunos países, no siempre se permite la adición directa de CLA, como principio activo, a productos alimenticios.

La solicitud de patente WO 2009/043856 A2 se refiere al uso de una bacteria que produce CLA para la conversión *in vivo* en el intestino de ácidos grasos poliinsaturados en CLA. La bacteria que produce CLA se selecciona de uno o más del grupo que consiste en propionibacterias, lactobacilos, lactococos y estreptococos, y bifidobacterias.

La solicitud de patente WO 2010/103374 A2 se refiere a una suspensión oleosa que contiene bacterias probióticas, particularmente adecuada para uso pediátrico.

La solicitud de patente WO 2006/039768 A1 se refiere a un alimento funcional fermentado basado en soja que contiene probióticos y prebióticos y a un proceso de producción del mismo. El alimento funcional contiene extracto de soja soluble en agua, agua, probióticos, prebióticos, edulcorante y aditivos alimenticios y agentes funcionales opcionales. El proceso comprende la preparación del inóculo y del medio de fermentación, la inoculación con los probióticos, la fermentación, tratamientos opcionales, envasado y refrigeración.

Existe, por tanto, la necesidad de tener una composición que sea capaz de superar los límites de la técnica anterior y de representar un medio válido y eficaz de administrar CLA en el organismo.

El exceso de ácido linoleico en la dieta humana moderna se debe no solo a un bajo consumo de pescado, sino también a un consumo elevado de productos ricos en aceites vegetales y semillas. Además, esta situación no es solo característica de la dieta humana, sino que se extiende más bien a la dieta de los animales usados para alimentos, a los que habitualmente se les alimenta con grano.

Todo esto se ve reflejado en una razón peor entre ácidos grasos $\omega 6$ y ácidos grasos $\omega 3$ en productos cárnicos, productos lácteos y huevos, que están entre los alimentos consumidos más ampliamente en la dieta. Sin embargo, hoy en día una mejora en la razón de $\omega 6/\omega 3$ por medios dietéticos solos presenta varias dificultades y problemas poco probables de superar, puesto que dichos problemas están unidos a los sistemas de producción y comercialización, que están controlados a escala industrial y son, por tanto, difíciles de modificar.

Por tanto, se vuelve necesario el ser capaz de reducir la cantidad de ácido linoleico (LA) que se deriva de la dieta, que se acumula en exceso en el organismo.

El objeto de la presente invención se refiere a una selección de cepas de bacterias probióticas capaces de convertir ácido linoleico (LA) en ácido linoleico conjugado (CLA), tal como se reivindica en la reivindicación adjunta.

El objeto de la presente invención se refiere además a una composición alimenticia o dietética o farmacéutica, tal como se reivindica en la reivindicación adjunta.

5 El objeto de la presente invención se refiere además a una composición farmacéutica para su uso como medicamento, tal como se reivindica en la reivindicación adjunta.

El objeto de la presente invención se refiere además al uso de al menos una cepa bacteriana capaz de convertir LA en CLA para la preparación de una composición, tal como se reivindica en la reivindicación adjunta.

10 A continuación, se describirán e ilustrarán realizaciones adicionales preferidas de la presente invención, sin estar destinadas a limitar en modo alguno el alcance de la presente invención.

15 La tabla 1 muestra la composición cualitativa y cuantitativa de tres medios de cultivo usados en la presente invención: TPY, MRS y LATPg.

La tabla 2 muestra los valores de absorbancia obtenidos a partir de la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 233 nm con respecto a las concentraciones de CLA.

20 La tabla 3 muestra la línea de regresión obtenida con los valores mostrados en la tabla 2.

La tabla 4 muestra los recuentos de placa de vertido obtenidos usando los medios TPY y MRS a diferentes concentraciones de LA.

25 La tabla 5 muestra los valores obtenidos para la concentración de CLA/ml producido; porcentaje de conversión de LA-CLA (expresado como CLA producido/0,50 mg/ml de LA); razón de concentración de CLA/DO a 600 nm.

La tabla 6 muestra la cuantificación de CLA presente en el medio de cultivo TPY con y sin inoculación de LA.

30 La tabla 7 muestra la resistencia de cepas seleccionadas a los jugos gástricos, bilis y secreción pancreática.

La figura 1 muestra las curvas de crecimiento en el tiempo de la cepa *B. breve* DSM 20213 en caldo de TPY y MRS a diferentes concentraciones de LA (0, 0,5 y 1 mg/ml). El pH inicial para el caldo de cultivo de TPY es de 6,11; para MRS es de 5,83. Los valores de pH finales se proporcionan en la misma figura.

35 En virtud de una actividad de investigación intensa, el solicitante ha conseguido seleccionar cepas de bacterias probióticas específicas, que pertenecen al género *Bifidobacterium*.

Ventajosamente, dichas cepas pertenecen a las especies *B. longum* y *B. breve*.

40 En particular, las cepas seleccionadas por el solicitante se seleccionan del grupo que comprende:

- *Bifidobacterium longum*, depositada en la DSMZ y que tiene el número de registro DSM 23233, fecha de presentación el 12/12/2010, depositario Probiotal S.p.A.;

45 - *Bifidobacterium breve*, depositada en la DSMZ y que tiene el número de registro DSM 16604, fecha de presentación el 20/07/2004, depositario Probiotal S.p.A.;

- *Bifidobacterium breve*, depositada en la DSMZ y que tiene el número de registro DSM 16596, fecha de presentación el 21/07/2004, depositario Probiotal S.p.A.;

50 - *Bifidobacterium breve*, depositada en la DSMZ y que tiene el número de registro DSM 20213.

55 El solicitante ha encontrado sorprendentemente que las cepas seleccionadas que pertenecen al género *Bifidobacterium* son capaces de convertir ácido linoleico (LA) en ácido linoleico conjugado (CLA), con una tasa de conversión superior al 65 %.

Ventajosamente, las cepas seleccionadas son capaces de convertir ácido linoleico (LA) en ácido linoleico conjugado (CLA), con una tasa de conversión superior al 70 %; incluso más ventajosamente, superior al 90 %.

60 En el contexto de la presente invención, LA significa un ácido graso insaturado omega 6 denominado [cis, ácido cis-9,12-octadecadienoico] CAS N. 60-33-3 (también conocido como 18:2 (n-6)).

65 En el contexto de la presente invención, CLA significa un grupo de al menos 28 isómeros de ácido linoleico encontrado, por ejemplo, en la carne y en productos lácteos. El grupo comprende el isómero [cis-9,trans-11] y el isómero [trans-10,cis-12], entre otros.

En el contexto de la presente invención, conversión de LA en CLA se refiere a la obtención de una mezcla que comprende el isómero [cis-9,trans-11] y el isómero [trans-10,cis-12], en la que el anterior está presente en una cantidad mayor o, alternativamente, a la obtención exclusivamente del isómero [cis-9,trans-11].

5 Todas las cepas sometidas a prueba por el solicitante son de origen humano y se aislaron a partir de material fecal.

Además, las cepas seleccionadas también se sometieron a prueba para verificar su resistencia a los jugos gástricos, bilis y secreción pancreática.

10 Los resultados se muestran en la tabla 7. En la tabla 7, (*) indica la supervivencia de cepas probióticas en dos tipos diferentes de jugos gástricos y en una secreción pancreática simulada a 37 °C tras tiempos de contacto diferentes (5 y 30 minutos).

15 En la tabla 7, (**) indica los resultados de supervivencia en presencia de secreción biliar, evaluados comparando el número de colonias crecidas en un medio de cultivo "con" y "sin" la adición de sales biliares o bilis humana.

A partir de estas pruebas surgió que un porcentaje significativo de células ingeridas era capaz de superar la barrera de acidez gástrica y pasar más allá del intestino.

20 Este aspecto es de particular importancia ya que garantiza que un número suficiente de células viables son capaces de alcanzar el intestino, en donde tiene lugar la transformación de ácido linoleico (LA) en su forma conjugada (CLA).

25 Ventajosamente, las bacterias contenidas en la composición de la presente invención son capaces de superar la barrera gástrica y el tránsito duodenal, permitiendo, por tanto, la colonización del tubo gastrointestinal y la conversión de LA en CLA directamente *in situ*, preferiblemente en el tubo gastrointestinal.

Aunque el mecanismo de conversión de LA en CLA no está totalmente claro en la actualidad, parece que las cepas bacterianas adoptan una estrategia de detoxificación, transformando LA en su forma conjugada CLA y retirando LA del medio en el que está presente en exceso.

30 En una realización preferida, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o alternativamente consiste en, al menos una cepa que pertenece a la especie *B. breve*, seleccionada del grupo *B. breve* DSM 16604, *B. breve* DSM 16596 y *B. breve* DSM 20213. Ventajosamente, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o alternativamente consiste en, *B. breve* DSM 16604.

35 En otra realización preferida, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende o consiste en al menos dos cepas que pertenecen a la especie *B. breve*, seleccionadas del grupo *B. breve* DSM 16604, *B. breve* DSM 16596 y *B. breve* DSM 20213.

40 Ventajosamente, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o alternativamente consiste en, *B. breve* DSM 16604 y *B. breve* DSM 16596.

45 Ventajosamente, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o alternativamente consiste en, *B. breve* DSM 16604 y *B. breve* DSM 20213.

Ventajosamente, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o alternativamente consiste en, *B. breve* DSM 16596 y *B. breve* DSM 20213.

50 En otra realización preferida, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o alternativamente consiste en, al menos tres cepas que pertenecen a la especie *B. breve*, seleccionadas del grupo *B. breve* DSM 16604, *B. breve* DSM 16596 y *B. breve* DSM 20213.

55 En otra realización preferida, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende:

- *Bifidobacterium breve*, depositada en la DSMZ y que tiene el número de registro DSM 16604, fecha de presentación el 20/07/2004, depositario Probiotal S.p.A., y/o

60 - *Bifidobacterium breve*, depositada en la DSMZ y que tiene el número de registro DSM 16596, fecha de presentación el 21/07/2004, depositario Probiotal S.p.A., y/o

- *Bifidobacterium breve*, depositada en la DSMZ y que tiene el número de registro DSM 20213.

65 Si se usan dos especies de *B. breve*, la razón de células viables está comprendida entre 1:3 y 3:1, preferiblemente 1:1.

Si se usan tres especies de *B. breve*, la razón de células viables está comprendida entre 3:1:1 y 1:1:1 (*B. breve* DSM 16604: *B. breve* DSM 16596: *B. breve* DSM 20213).

5 En una realización preferida, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o alternativamente consiste en, *Bifidobacterium longum* BL04, DSM 23233.

En otra realización preferida, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o alternativamente consiste en, *Bifidobacterium longum* BL04, DSM 23233, en asociación con al menos
10 una de las siguientes cepas: *Bifidobacterium breve* DSM 16604, *Bifidobacterium breve* DSM 16596 o *Bifidobacterium breve* DSMZ 20213.

Ventajosamente, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o
15 alternativamente consiste en, *Bifidobacterium longum* BL04 DSM 23233 y *Bifidobacterium breve* DSM 16604.

Ventajosamente, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o
alternativamente consiste en, *Bifidobacterium longum* BL04 DSM 23233 y *Bifidobacterium breve* DSM 16596.

Ventajosamente, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o
20 alternativamente consiste en, *Bifidobacterium longum* BL04 DSM 23233 y *Bifidobacterium breve* DSM 20213.

En otra realización preferida, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o alternativamente consiste en, *Bifidobacterium longum* BL04, DSM 23233, en asociación con al menos
25 dos de las siguientes cepas: *Bifidobacterium breve* DSM 16604, *Bifidobacterium breve* DSM 16596 o *Bifidobacterium breve* DSMZ 20213.

Ventajosamente, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o
alternativamente consiste en, *Bifidobacterium longum* BL04 DSM 23233, *Bifidobacterium breve* DSM 16604 y
30 *Bifidobacterium breve* DSM 16596.

Ventajosamente, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o
alternativamente consiste en, *Bifidobacterium longum* BL04 DSM 23233, *Bifidobacterium breve* DSM 16604 y
35 *Bifidobacterium breve* DSM 20213.

Ventajosamente, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o
alternativamente consiste en, *Bifidobacterium longum* BL04 DSM 23233, *Bifidobacterium breve* DSM 16596 y
40 *Bifidobacterium breve* DSM 20213.

En otra realización preferida, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención
comprende, o alternativamente consiste en, *Bifidobacterium longum* BL04, DSM 23233, en asociación con al menos
45 tres de las siguientes cepas: *Bifidobacterium breve* DSM 16604, *Bifidobacterium breve* DSM 16596 y *Bifidobacterium breve* DSMZ 20213.

Ventajosamente, la composición alimenticia o dietética o farmacéutica de la presente invención comprende, o
alternativamente consiste en, *Bifidobacterium longum* BL04 DSM 23233, *Bifidobacterium breve* DSM 16604,
50 *Bifidobacterium breve* DSM 16596 y *Bifidobacterium breve* DSM 20213.

La razón, en cuanto a células viables, entre *Bifidobacterium longum*, BL04, DSM 23233 y el conjunto de cepas de
Bifidobacterium breve mencionado anteriormente está comprendida entre 1:3 y 3:1, preferiblemente 1:1.

En una realización preferida, la composición farmacéutica que contiene las cepas bacterianas tal como se especifica
anteriormente está indicada para su uso como medicamento, preferiblemente como antiinflamatorio, en particular
para el tratamiento preventivo y/o curativo de trastornos intestinales, diarrea e inflamación del colon, para el aumento
de la masa magra corporal, para el aumento de la termogénesis, prevención del cáncer y protección frente a estrés
55 oxidativo.

La composición de la presente invención tiene aplicación en el tratamiento preventivo o curativo de deficiencias de
ácido linoleico conjugado.

60 La composición de la presente invención puede formularse en forma sólida, liofilizada o secada, por ejemplo, en
forma de polvo o granular.

Además, una forma farmacéutica de interés son los comprimidos o cápsulas de gelatina duras o blandas.

65 En lo que respecta a los comprimidos, pueden comprender una parte interna que comprende las cepas bacterianas
y una parte de recubrimiento externa. El recubrimiento puede comprender polímeros solubles en agua y/o polímeros

capaces de soportar las variaciones de pH en el estómago y permitir el paso en el tubo intestinal.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la producción de ácido linoleico conjugado.

- 5 El método implica una etapa en la que una o más cepas bacterianas, tal como se especificó anteriormente, se cultivan/fermentan en presencia de ácido linoleico y el ácido linoleico conjugado formado se aísla posteriormente.

El método puede llevarse a cabo en un laboratorio o a escala industrial.

- 10 Otro aspecto de la invención se refiere a la conversión de LA en CLA directamente en el organismo una vez que un individuo ha tomado la composición de la presente invención.

El ácido linoleico conjugado que se obtiene en mayor cantidad es el isómero [ácido cis-9,trans-11 octadecadienoico], en comparación con el isómero [trans-10,cis-12].

- 15 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de al menos una cepa bacteriana, tal como se especificó anteriormente, para preparar una composición para el tratamiento de trastornos o patologías vinculados a una deficiencia de derivados de ácido linoleico.

- 20 El solicitante llevó a cabo una actividad de investigación intensa en un grupo extremadamente amplio de cepas bacterianas. Todas las cepas bacterianas se sometieron a prueba y se seleccionaron basándose en su habilidad/capacidad para convertir LA en CLA.

- 25 El solicitante desarrolló un medio de cultivo adecuado para llevar a cabo la selección de cepas y perfeccionó las técnicas espectrofotométricas usadas para llevar a cabo la selección de cepas bacterianas que producen CLA, con lecturas a una longitud de onda de 233 nm.

Prueba de toxicidad del ácido linoleico y elección del medio de cultivo.

- 30 Se seleccionó la cepa *B. breve* DSMZ 20213 como candidata para la prueba de toxicidad del ácido linoleico. Dicha cepa, de hecho, es capaz de crecer en presencia de LA y presenta buenas tasas de conversión en CLA. Además, *B. breve* DSMZ 20213 se usó para análisis posteriores como control positivo. Por tanto, partiendo de la forma congelada de dicha cepa, fue posible revivirla en tres medios de cultivo diferentes, que se especifican en la tabla 1.

- 35 Tras la preparación, se esterilizaron los medios en un autoclave a 121 °C durante 15'. Al final de la esterilización, los valores de pH de los medios fueron de 6,60±0,10 a 25 °C, 6,20±0,20 a 25 °C y 6,5±0,5 a 25 °C, respectivamente, para caldo de TPY, MRS y LAPTg. Se logró el reavivamiento inoculando el 1 % de *B. breve* DSMZ 20213 en 10 ml de los tres medios de cultivo con la adición de clorhidrato de cisteína al 1 % (dis. al 5 %) y posterior incubación en condiciones anaeróbicas usando paquetes de gas a 37 °C±1 °C durante 24 horas±1 hora. Esta operación se llevó a cabo a través de dos trasplantes sucesivos para permitir el reavivamiento completo de la cepa.

- 40 La cepa así revivida, se inoculó al 1 % en 10 ml de los tres medios de cultivo diferentes preparados tal como se describió anteriormente, con la adición de tres disoluciones a diferentes concentraciones de ácido linoleico, precisamente 0, 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich cod.L1276), y luego se incubaron en el paquete de gas a 37± °C durante 16 horas±1 hora.

- 45 Con el fin de simplificar la operación, se produjeron tres disoluciones madre de LA a 0 mg/ml, 50 mg/ml y 100 mg/ml, con la adición de Tween 80 al 2 % (v/v) para permitir la formación de una emulsión y posterior aumento en la solubilidad del ácido linoleico disuelto usando un anclaje y agitador magnético.

- 50 Tras la disolución completa del Tween 80, se tomaron alícuotas de las disoluciones así obtenidas y se congelaron a -25±1 °C seguido de filtración con un filtro de 0,20 µm.

- 55 Se llevó a cabo un recuento por medio de lectura espectrofotométrica a 600 nm al inicio, a las 6 horas y al final del periodo de incubación. Se registró el pH al inicio y al final del periodo de incubación.

Preparación de la línea de regresión

- 60 La línea de regresión construida para concentraciones de CLA c9/t11 de 320, 160, 80, 40, 20 y 10 µg/ml de hexano demostró que concentraciones de desde 10 hasta 80 µg/ml se asociaron con un aumento lineal en los valores de absorbancia a 233 nm ($R^2=1$).

- 65 Sin embargo, cuando también se calculó la línea de regresión con el valor de absorbancia obtenido para la concentración de 160 µg/ml, la línea perdió su patrón lineal y se volvió polinómica impidiendo, por tanto, una cuantificación precisa de las concentraciones de CLA para absorbancias de entre 2,095 y 2,733. A concentraciones iguales y superiores a 320 µg/ml, el espectrofotómetro dio absorbancia no cuantificable (> + 3).

Por tanto, la concentración de CLA presente en los sobrenadantes de los cultivos de absorbancia $< 2,095$ puede calcularse directamente con la ecuación $y=25,311x+0,0698$. Para muestras que dieron lecturas por encima de 2,095, se recurrió a diluciones en serie 1:2.

5 Al depender de una dilución en serie 1:2 de la muestra, se recuperaron, por tanto, los valores de absorbancia dentro del intervalo que garantiza la linealidad, y, por tanto, la aplicabilidad de la ecuación. Los datos se muestran en la tabla 2.

10 Para obviar la dificultad de someter a ensayo CLA c9/t11 (en la preparación de la primera dilución necesaria para calcular la línea de regresión) debido a su viscosidad, y para garantizar la precisión máxima, se usó una pipeta de volumen fijo de 2 μ l con capilares de vidrio.

15 Entonces, la muestra de 2 μ l de CLA c9/t11 así obtenida se diluyó con 1,450 ml de hexano en un tubo de ensayo de 2 ml.

20 Se obtuvo, por tanto, una concentración de partida de 1280 μ g/ml (densidad de c9/t11 = 0,903 mg/ μ l). Se realizaron diluciones en serie 1:2 a partir de esta concentración hasta llegar a una concentración de 10 μ g/ml. Para limitar la evaporación del hexano lo máximo posible, se realizaron las diversas diluciones en serie en microtubos de ensayo de 200 μ l llenados previamente con 100 μ l de hexano y luego cerrados inmediatamente. Las diversas diluciones se obtuvieron entonces en serie añadiendo 100 μ l de la disolución previa, partiendo de la disolución madre a 1280 μ g/ml.

25 Al final de la preparación de las diversas diluciones, se tomó una lectura de espectrofotómetro de la densidad óptica a una longitud de onda de 233 nm, usando cubetas de cuarzo con una capacidad nominal de 100 μ l. Dicha operación se llevó a cabo empezando por la disolución con la concentración más baja (10 μ g/ml).

Los valores de absorbancia así obtenidos se muestran en la tabla 3.

30 Extracción de ácido graso.

Después de que se realiza una selección en cuanto al medio de cultivo adecuado y concentraciones de LA a usar, se descongelaron y se reactivaron.

35 La cepa *B. breve* DSMZ 20213 se seleccionó como control positivo. También se aplicó el mismo procedimiento en una muestra de medio de cultivo preparada sin inóculo y con la adición de LA, para usar como muestra en blanco.

40 El caldo de TPY, tras complementarse con clorhidrato de cisteína al 1 % (dis. al 5 %), se seleccionó como medio de cultivo para las etapas de reactivación y crecimiento en presencia de 0,5 mg/ml de LA.

Al final del periodo de incubación, el caldo de cultivo y la muestra de blanco se centrifugaron a 5000 g durante 5' y se tomaron alícuotas de los sobrenadantes en cantidades de 500 μ l en tubos de ensayo de 1,5 ml por microcentrifuga.

45 Entonces se continuó con la extracción con doble hexano según el método de Yung *et al.*, 2006 (referencia 1), con las modificaciones descritas a continuación. La extracción implicó la adición de 500 μ l de hexano a los sobrenadantes en alícuotas y muestra en blanco. Entonces se mezclaron las muestras mediante inversión durante 10', teniendo cuidado de no romper la interfase entre las dos etapas, y entonces se permitió que reposaran durante 30' a temperatura ambiente. Al final del periodo de reposo, las muestras se centrifugaron a 2000 g durante 5' para facilitar las operaciones de retirada de la fase de hexano superior. Una vez que se había retirado la fase de hexano superior y almacenado en un tubo de ensayo de 2 ml, se trató de nuevo la fase inferior como se describió anteriormente con 500 μ l de hexano. Se añadió la fase superior a la previa y se mezcló mediante inclinación.

55 Análisis espectrofotométrico.

El CLA producido se cuantificó por medio de una lectura de espectrofotómetro de densidad óptica usando una longitud de onda de 233 nm, según el método de Barrett *et al.*, 2007 (referencia 2) y Xu *et al.*, 2008 (referencia 3).

60 Antes de que se realizara el análisis, el espectrofotómetro se puso a cero frente a 100 μ l de hexano usando una cubeta de cuarzo.

Se tomó entonces una lectura para todas las muestras, partiendo del blanco; se tuvo cuidado de aclarar la cubeta con hexano antes de proceder con la transferencia de la muestra. Para muestras que dieron valores de absorbancia $> + 3$, se realizaron diluciones en serie 1:2 en hexano hasta alcanzar valores de absorbancia tales como para permitir el cálculo de las concentraciones de CLA mediante interpolación de la recta $Y = 25,311 x + 0,0698$.

Se conocen técnicas espectrofotométricas para la cuantificación de CLA producido mediante cultivos bacterianos a partir de Barrette *et al.*, 2007. Esta técnica espectrofotométrica se basa en una característica de dienos conjugados (en este caso CLA) de poseer un espectro de UV típico de esta clase de compuestos, con una absorbancia de 233 nm. Dicho método, en cualquier caso, permite una cuantificación del CLA producido.

Prueba de toxicidad del ácido linoleico y selección de medio de cultivo.

Al final del periodo de incubación (16 horas $\pm$ 1 hora, 37 $\pm$ 1 °C), la prueba de toxicidad llevada a cabo en la cepa *B. breve* DSM 20213 usando diferentes concentraciones de LA (0, 0,5 y 1 mg/ml) en tres medios de cultivo diferentes (TPY, MRS y LAPTg) hizo posible identificar el medio de cultivo más adecuado para llevar a cabo la posterior etapa de selección. Se seleccionó caldo de TPY como medio de cultivo ya que proporcionó las condiciones ambientales más favorables para el crecimiento de bifidobacterias en presencia de LA. Con caldo de TPY se encontró la menor variabilidad en recuentos tomados mediante tanto lecturas de espectrofotómetro de densidad óptica con una longitud de onda de 600 nm como recuentos mediante el método de placa de vertido, figura 1 y tabla 4.

Las diferencias observadas en el uso de caldo de TPY, MRS y LAPTg a diferentes concentraciones de LA (0, 035, 1 mg/ml) (figura 1) señalaron la importancia del medio de cultivo en estudios sobre metabolismo microbiano.

De hecho, el uso de caldo de TPY demostró ser preferible con respecto al uso de caldo de MRS y LAPTg, ya que dio la menor variabilidad en el crecimiento microbiano a diferentes concentraciones de LA, así como los mayores recuentos, siendo las concentraciones de LA iguales (0,5 y 1 mg/ml), en comparación con caldo de MRS y LAPTg. La concentración de LA inicial seleccionada fue de 0,5 mg/ml. Esta concentración es, de hecho, la preferible para una de las pruebas de conversión de LA en CLA en caldo de MRS llevada a cabo en otros estudios (Barrett *et al.*, 2007 y Xu *et al.*, 2008). La selección fue dictada por el deseo de comparar, en una fase preliminar, las tasas de conversión obtenidas usando caldo de TPY como medio de cultivo y las notificadas en la bibliografía con respecto al uso de caldo de MRS como medio de cultivo.

Selección de cepas de bifidobacterias que producen CLA.

Al final del periodo de incubación (16 horas $\pm$ 1 hora, 37 $\pm$ 1 °C), las cepas bacterianas especificadas anteriormente y el control negativo *Lb. reuteri* DSM 20016 se sometieron a análisis espectrofotométrico a 233 nm, el procedimiento necesario para cuantificar el CLA producido. La tabla 5 muestra los resultados obtenidos con respecto a la conversión de LA en CLA por las diferentes cepas seleccionadas de bifidobacterias.

La cepa *B. longum* DSM 23233 mostró ser el mayor productor de CLA, con una producción de 0,465 mg/ml, igual a una tasa de conversión de LA en CLA del 92,93 %. Mientras que la cepa *B. breve* DSM 16604 mostró ser un buen productor de CLA, con una producción de 0,393 mg/ml, igual a una tasa de conversión de LA en CLA del 71,38 %.

Se calcularon las concentraciones de CLA producidas asumiendo que los medios de cultivo contenían desde el principio cantidades variables de LA y CLA debido a la presencia de componentes tales como extractos de carne, extracto de levadura, componentes de soja, etc. A este respecto, se compararon las lecturas de espectrofotómetro de densidad óptica a una longitud de onda de 233 nm para los diferentes medios estériles con y sin LA a 0,5 mg/ml. Los resultados obtenidos (tabla 6) no revelaron una diferencia significativa entre el medio estéril con y sin la adición de 0,5 mg/ml de LA.

Los resultados anteriores confirmaron la capacidad de la técnica usada para cuantificar exclusivamente el componente ácido caracterizado por tener dos dobles enlaces conjugados, como en el caso de CLA. Finalmente, la cantidad calculada de CLA presente en los medios de cultivo estériles se restó posteriormente en el cálculo de las concentraciones de CLA producido por actividad microbiana. Además, el recuento bacteriano realizado por medio de lecturas de espectrofotómetro de densidad óptica (longitud de onda de 600 nm) mostro un recuento mayor para *L. reuteri* DSM 20016 frente a las cepas que producen CLA, lo que sugiere que la toxicidad relacionada con la presencia de LA es específica de la cepa.

Basándose en estos resultados, puede decirse que los microorganismos más altamente sensibles son también los que son capaces de lograr la mayor conversión de LA en CLA, probablemente como mecanismo de defensa frente al elemento tóxico.

Las pruebas realizadas como se describió anteriormente revelan un gran porcentaje de conversión para *B. longum* DSM 23233 (92,93 %) y *B. breve* DSM 16604 (71,38 %) en comparación con el control positivo *B. breve* DSM 20213, relativo a un estudio previamente realizado usando caldo de MRS (Barrett *et al.*, 2007).

Por tanto, la actividad de conversión de LA en CLA realizada por las bifidobacterias podría hacer que este metabolito estuviera directamente disponible en la luz intestinal, en donde podría manifestar sus propiedades beneficiosas para la salud tanto localmente como después de su absorción.

Los resultados anteriores revelan la capacidad de varias cepas de bifidobacterias (en particular con respecto a las

especies *B. longum* y *B. breve*) para convertir ácido linoleico en ácido linoleico conjugado. Por consiguiente, el uso de tales cepas en el reino probiótico podría representar un medio eficaz y significativo de control del delicado equilibrio en la ingesta alimenticia de los AGE omega 6/omega 3.

- 5 Las cepas de bifidobacterias capaces de convertir LA en CLA podrían interactuar *in situ*, a lo largo del tubo gastrointestinal, con los ácidos grasos esenciales absorbidos a través de la dieta, oponiéndose potencialmente al metabolismo proinflamatorio de la ruta de ácidos grasos omega 6 y produciendo metabolitos (CLA) con un posible papel nutricional. De hecho, a pesar de que la mayoría de las grasas absorbidas a través de la dieta se digieren en el intestino delgado, aproximadamente 5-8 g de lípidos llegan al colon todos los días. Además, se ha estimado que
- 10 los humanos expulsan alrededor de 20 mg de LA a través de las heces. Esto sugiere que LA es potencialmente utilizable como sustrato para la producción de CLA. Además, el reciente aislamiento de cepas de bifidobacterias y lactobacilos del intestino delgado de recién nacidos amplía la aplicabilidad de las cepas de bifidobacterias que producen CLA. Estos hallazgos sugieren un alcance de aplicabilidad que se extiende a casi la totalidad del tubo gastrointestinal, con la posibilidad de una acción que es potencialmente simultánea con la absorción de lípidos, que se produce principalmente en las regiones superiores del intestino delgado. Finalmente, la aplicabilidad de las cepas probióticas que producen CLA parece prometedora también porque el efecto anticancerígeno de CLA podría manifestarse a concentraciones muy bajas. En modelos animales, se han observado efectos anticancerígenos para cantidades de CLA equivalentes al 0,5 – 1 % (p/p) de la dieta diaria.

20 **Lista de referencias**

- 1) M. Y. Young *et al.*, Technical Note: Improved Extraction Method with Hexane for Gas Chromatographic Analysis of Conjugated Linoleic Acids, J. Dairy Sci. 89:90-94, American Dairy Science Association, 2006.
- 25 2) E. Barrett *et al.*, Rapid Screening Method for Analyzing the Conjugated Linoleic Acid Production Capabilities of Bacterial Cultures, Applied and Environmental Microbiology, abril de 2007, págs. 2333 - 2337, American Society for Microbiology.
- 30 3) H. Xu *et al.*, Kinetics of microbial hydrogenation of free linoleic acid to conjugated linoleic acids, Journal of Applied Microbiology, ISSN 1364-5072.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum* e identificada como *Bifidobacterium longum*, depositada en la DSMZ el 12/01/2010 con el número de registro DSM 23233, para su uso en el tratamiento de la inflamación.
5
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, para el tratamiento preventivo y/o curativo de trastornos intestinales, diarrea e inflamación del colon, para el aumento de la masa magra corporal, para el aumento de la termogénesis, prevención del cáncer y protección frente al estrés oxidativo.
10
3. Composición para su uso según la reivindicación 1, para el tratamiento de trastornos o patologías vinculados a una deficiencia de ácido linoleico conjugado.
4. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición comprende la cepa bacteriana *Bifidobacterium longum*, depositada en la DSMZ el 12/01/2010 con el número de registro DSM 23233, en combinación con al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que comprende:
15
 - *Bifidobacterium breve*, depositada en la DSMZ y que tiene el número de registro DSM 16604, fecha de presentación el 20/07/2004, depositario Probiotical S.p.A., y/o
20
 - *Bifidobacterium breve*, depositada en la DSMZ y que tiene el número de registro DSM 16596, fecha de presentación el 21/07/2004, depositario Probiotical S.p.A., y/o
 - *Bifidobacterium breve*, depositada en la DSMZ y que tiene el número de registro DSM 20213.
25
5. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en forma sólida, liofilizada o secada, preferiblemente en forma de polvo o granular.
6. Composición para su uso según la reivindicación 5, en la que dicha composición está en forma de comprimidos, o como cápsulas de gelatina duras o blandas.
30
7. Composición para su uso según la reivindicación 6, en la que dichos comprimidos comprenden una parte interna que comprende las cepas bacterianas y una parte de recubrimiento externa.
35

Tabla 1

1. Caldo de TPY	1. g/l	1. Caldo de MRS	1. g/l	1. Caldo de LAPTg	1. g/l
Tripticasa	10,00	Triptona	10,00	Peptona	15,00
Phytone Soytone	5,00	Extracto de carne	10,00	Triptona	10,00
Extracto de levadura	5,00	Extracto de levadura	5,00	Glucosa	10,00
Glucosa	10,00	Glucosa	20,00	Extracto de levadura	10,00
Tween 80	1,00	Tween 80	1,00	Tween 80	1,00
K ₂ HPO ₄	2,00	K ₂ HPO ₄	2,00		
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,50	Acetato de sodio	5,00		
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,25	Citrato de diamonio	2,00		
CaCl ₂	0,15	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2		
		MnSO ₄ H ₂ O	0,05		

Tabla 2

[CLA] mg/ml	DO 233
0,32	> + 3
0,16	2,733
0,08	2,095
0,04	1,084
0,02	0,569
0,01	0,328

Tabla 3

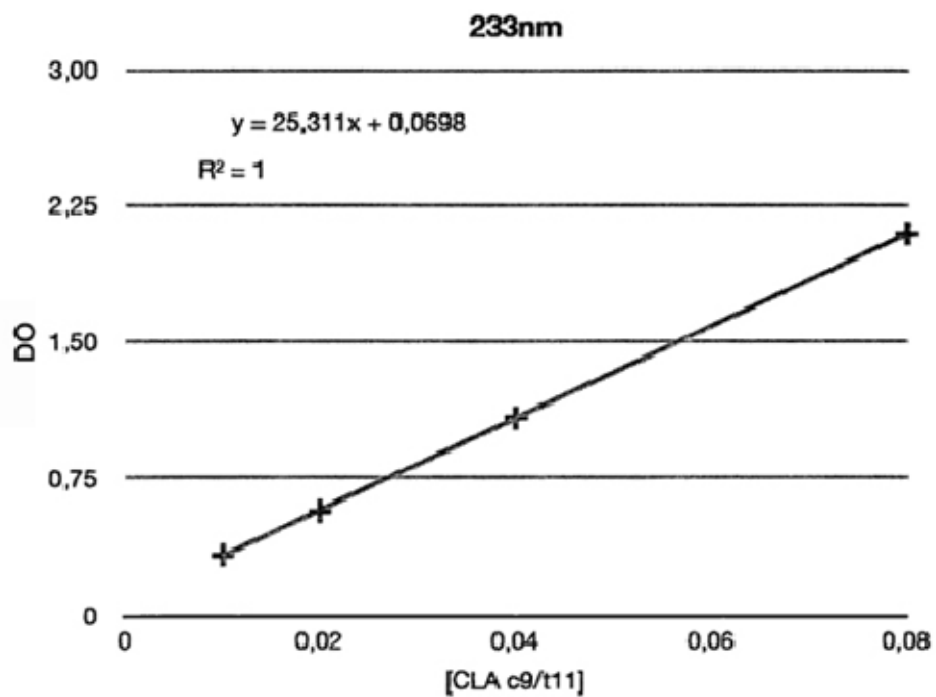


Tabla 4

LA mg/ml	TPY	MRS
0	11×10^8 ufc	25×10^8 ufc
0,5	10×10^8 ufc	6×10^8 ufc
1	$9,5 \times 10^8$ ufc	4×10^8 ufc

Tabla 5

Cepas usadas	DO 600 (16 h)	[CLA] mg/ml	% [CLA]	[CLA]/DO
<i>B. longum</i> BL04 DSM 23233	0,918	0,465	92,93 %	0,51
<i>B. breve</i> DSM 16604	1,278	0,393	71,38 %	0,31
<i>B. breve</i> DSM 16596	1,092	0,348	69,53 %	0,32
<i>B. breve</i> DSM 20213	1,413	0,342	68,31 %	0,24
<i>L. reuteri</i> DSM 20016	1,003	0	0 %	0,00

Tabla 6

Caldo estéril de TPY	DO 233 nm	[CLA] mg/ml
TPY + 0 mg/ml de LA	0,987	0,0362
TPY + 0,5 mg/ml de LA	1,003	0,0369

Tabla 7

Cepas	Fluidos biológicos	Tras diferentes tiempos de contacto (minutos)*		En presencia de bilis en el medio**
		5'	30'	
<i>Bifidobacterium longum</i> BL04 DSM 23233	Jugo gástrico humano	80	36	
	Jugo gástrico simulado	90	30	
	Secreción pancreática simulada	91	60	
	Bilis humana			65
	Sales biliares			62
<i>Bifidobacterium breve</i> BR03 DSM 16604	Jugo gástrico humano	92	34	
	Jugo gástrico simulado	96	40	
	Secreción pancreática simulada	91	42	
	Bilis humana			35
	Sales biliares			10
<i>Bifidobacterium breve</i> BR04 DSM 16596	Jugo gástrico humano	87	57	
	Jugo gástrico simulado	91	33	
	Secreción pancreática simulada	89	77	
	Bilis humana			84
	Sales biliares			55
<i>Bifidobacterium breve</i> DSM 20213	Jugo gástrico humano	82	55	
	Jugo gástrico simulado	84	31	
	Secreción pancreática simulada	86	69	
	Bilis humana			67
	Sales biliares			22

- (*) la tabla muestra el porcentaje de supervivencia de las cepas bacterianas en dos tipos diferentes de jugos gástricos y secreción pancreática simulada a 37 °C tras diferentes tiempos de contacto (5 y 30 minutos)
- (**) los resultados de supervivencia en presencia de una secreción biliar se obtuvieron comparando el número de colonias que crecieron en el medio de cultivo con y sin la adición de sales biliares o bilis humana.

Figura 1

