

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 324**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2016** **E 16460032 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019** **EP 3168292**

54 Título: **Nueva cepa AMT4 de Lactobacillus plantarum y composición que contiene la cepa AMT14 de Lactobacillus plantarum**

30 Prioridad:

06.11.2015 PL 41470115

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

18.02.2020

73 Titular/es:

TUREK, EWELINA (50.0%)
Popieluski str. 3/11
10-693 Olsztyn , PL y
TUREK, JAROSLAW PIOTR (50.0%)

72 Inventor/es:

TUREK, EWELINA y
TUREK, JAROSLAW PIOTR

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 743 324 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

Nueva cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* y composición que contiene la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum*

5

La materia objeto de la invención es una nueva cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* y una composición que contiene una nueva cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum*.

La bacteria *Lactobacillus plantarum* pertenece a las bacterias ácido lácticas, que desempeñan un papel esencial en la industria (Patente E., Ciocia F., Ricciardi A., Zotta T., Felis G. E., Torriani S. 2010. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study. International Journal of Food Microbiology 144, 270-279). Estas bacterias se encuentran comúnmente en alimentos fermentados, aceitunas, quesos, vino y forrajes (Tanganurat W., Quniquis B., Leelawatcharams V., Bolotin A., 2009. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Thai fermented fruits and vegetable, Journal Basic Microbiology 49, 377-385). Por lo tanto, las cepas de esta especie, que tienen propiedades probióticas, se aplican en la producción de alimentos funcionales y terapéuticos y como posibles vacunas vivas orales (Shah N. P., 2007. Functional cultures and health benefits. International Dairy Journal 17, 1262-1277).

El mecanismo de acción de las bacterias probióticas es multifactorial y específico para cepas individuales (Tuohy K. M., Probert H. M., Smejkal C. W., Gibson G. R., 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Drug Discovery 8, 692-700). Uno de los modos mejor conocidos de acción probiótica frente a los agentes patógenos es un antagonismo basado en la secreción de sustancias bacteriostáticas y/o bactericidas por los probióticos descrito por Kesarcodi-Watson *et al.* (Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M. J., Gibson L., 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture, 274, 1-14).

25

Se cree que la presencia de probióticos en el intestino o en la superficie de la piel del hospedador inhibe el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas (Verschuere L., Heang H., Criel G., Dafnis S., Sorgeloos P., Versraete W., 2000. Protection of *Artemia* against the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2 by selected bacterial strains. Applied and Environmental Microbiology, 66, 1139-1146).

30

Este efecto antibacteriano es causado por sustancias individuales o en combinación entre sí, producidas por bacterias, tales como: antibióticos, bacteriocinas, lisozimas, proteasas, peróxido de hidrógeno, amoníaco, diacetilo, sideróforos, ácidos orgánicos (Verschuere L. Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Review, 64, 655-671). La eficacia del antagonismo basado en la secreción de inhibidores al medio ambiente depende principalmente de las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el experimento. Biedrzycka *et al.* (Biedrzycka E., Markiewicz L. H., Bielecka M., Siwicki A. K., 2007, Shaping the micro ecosystem of gastrointestinal tract. Development control of gastrointestinal system in newborn mammals, ed. Zabielski R., Wydawnictwo Rolne i Lesne, 126-140) mostraron que la actividad antagonista de las cepas probióticas implica no solo la secreción de inhibidores, sino también la prevención de la colonización por la coagulación de células de bacterias probióticas con células patógenas y la competencia por el punto de unión a las membranas mucosas del hospedador. En este proceso intervienen varios mecanismos, por ejemplo: interacciones electrostáticas, influencias hidrófobas, ácidos lipoteicoicos (Gómez R., Geovanny D., Balcázar J.L., Shen M, 2007. Probiotics as control agents in aquaculture, Journal of Ocean University of China, 6, 76-79). Estas propiedades permiten y ayudan a las bacterias a mantener un dominio significativo en el tracto gastrointestinal de seres humanos y animales, pero la reacción dinámica y compleja de los microorganismos es extremadamente importante para las células del epitelio intestinal y el sistema inmunitario del hospedador. (Shi HN, Walker A. Bacterial colonization and the development of intestinal defenses, 2004, Can. J Gastroenterol, 18, 493-500). Permite mantener la homeostasis e inicia una respuesta corporal apropiada frente a los patógenos.

La trayectoria gastrointestinal de los animales de granja de seres humanos (aves de corral, ganado vacuno, cerdos, caballos, ovejas, cabras, etc.) puede variar en términos de anatomía y función. Sin embargo, se encontró cierta similitud en la microflora intestinal, tanto en términos de cantidad como de la presencia de los mismos grupos predominantes de bacterias. Entre la microflora que coloniza los intestinos de los animales hay muchas bacterias comensales, que son patógenas para los animales y causan zoonosis. Las bacterias patógenas más comunes de origen animal son: *Salmonella*, la cepa O157:H7 de *E. coli*, *Campylobacter*, y otras tal como *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp. y *Clostridium* sp. Se pueden transferir, pero no tiene porque ser de ese modo, por alimentos de origen animal.

El trabajo pionero "*Intestinal inoculants for production animals*" es una visión general de los probióticos disponibles, aplicados durante la ganadería, incluidas aves de corral, cerdos y terneros (Fox Veterinary Medicine, 08/1988).

El documento WO 89/05849 desvela bacterias *Lactobacillus* que toleran bilis y ácido, aisladas de la vía gastrointestinal de los cerdos, que, de acuerdo con los autores, se pueden usar en la fermentación de la leche. La leche obtenida de ese modo se usa a continuación para alimentar a los lechones para prevenir la diarrea.

Las publicaciones de patente US 5 705 160, EP 353581, PL 179838, PL 195089, PL214583 describen propiedades

de muchas cepas de *Lactobacillus plantarum*, capaces de producir grandes cantidades de sustancias bacteriostáticas. Las publicaciones de patente EP 2311473 y WO 2009/068474 desvelan cepas de *Lactobacillus plantarum* como probióticos.

- 5 Las infecciones por bacterias *Salmonella* son la enfermedad humana más común transmitida por los alimentos. Los productos infectados de origen avícola son una de las principales fuentes de infección. Los esfuerzos, que se realizan para controlar las infecciones por *Salmonella* en las aves domésticas, resultan, con pocas excepciones, de la preocupación por la salud pública y, en menor grado, del esfuerzo por aumentar de forma significativa la eficacia de la producción avícola. Por lo tanto, se considera que es razonable y muy deseable usar aditivos naturales en la
- 10 nutrición de las aves de corral, lo que debería reducir la cantidad de bacterias *Salmonella* en el contenido del intestino.

Se ha mostrado que la aplicación de productos probióticos tiene un impacto positivo en la piel a través de su efecto en el eje intestino-cerebro-piel. De acuerdo con esto, la dieta baja en fibra, el estrés y la terapia con antibióticos

15 pueden causar un crecimiento excesivo de microorganismos potencialmente patógenos y/o patógenos en el intestino. Esto da como resultado el debilitamiento de la barrera intestinal y la absorción en el torrente sanguíneo de sustancias tóxicas, causando inflamación. Esto puede provocar un agravamiento de las lesiones cutáneas en personas predispuestas al acné vulgar, acné eritematoso y alergia. Por lo tanto, es razonable aplicar bacterias probióticas con propiedades comprobadas en cremas y pomadas como un escudo específico que protege frente a

20 los patógenos. Esta acción se basa en la inhibición de la colonización de patógenos presentes en la piel al bloquear su adherencia y al mismo tiempo por la producción de sustancias antibacterianas. Además, las bacterias probióticas inhiben la respuesta inmunológica y, en consecuencia, reducen la inflamación de la piel. Además, descomponen el sebo y otras secreciones de la piel, lo que da como resultado una absorción más fácil de los nutrientes presentes en la crema.

25 El objeto de la invención es el aislamiento de una nueva cepa de *Lactobacillus plantarum* que tiene propiedades probióticas, en particular que tiene capacidad bactericida frente a posibles patógenos y/o patógenos de seres humanos y animales. La cepa tendrá un efecto óptimo en el sistema gastrointestinal, así como en la piel de seres humanos y animales.

30 La invención se refiere a una nueva cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* y a una composición que incluye una nueva cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* y un vehículo, que se distingue por sus excelentes propiedades probióticas de bacterias potencialmente patógenas y/o patógenas en seres humanos y animales, especialmente teniendo en cuenta el antagonismo frente a la bacteria *Salmonella*, para la preparación de cremas, pomadas,

35 productos farmacéuticos y parafarmacéuticos, productos alimentarios, así como aditivos para alimentos y agua para seres humanos y animales.

La cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* se ha depositado en la Colección Polaca de Microorganismos en el Instituto de Inmunología y Terapia Experimental, Academia Polaca de Ciencias en Wroclaw, Depósito N.º B/00092.

40

La identificación de la cepa

La cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* proviene del entorno de la planta. La cepa se depositó en virtud del Tratado de Budapest en la Colección Polaca de Microorganismos (PCM) en el Instituto de Inmunología y Terapia

45 Experimental de la Academia de Ciencias de Polonia en Wroclaw. El depósito se llevó a cabo el 11.09.2015 y se le asignó el número B/00092.

Determinación de la afiliación de especies de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum*

50 Con el fin de examinar el género de *Lactobacillus plantarum*, el genotipado de AMT14 se llevó a cabo usando el método de PCR que implica la aplicación de cebadores específicos de especies.

Genotipado usando el método de PCR

55 La identificación de las cepas aisladas se llevó a cabo usando el método de secuenciación de ADN. El material protegido se usó para aislamiento de ADN.

Aislamiento de ADN

60 El aislamiento del ADN se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento:

1. 1 ml de cultivo bacteriano se transfirió a un tubo Eppendorf y el contenido se centrifugó (1 min., a velocidad máxima) y el sobrenadante se vertió. Esta actividad se repitió 3 veces.
 2. Al tubo con las células se le añadieron 100 µl de tampón de lisis LT, 10 µl tanto de proteinasa K como de
- 65 lisozima.

3. El tubo se incubó a 50 °C durante 60 minutos (agitación con vórtice cada 15 minutos)
4. Después de la incubación el tubo se sometió a agitación vorticial vigorosa durante 20 segundos.
3. El tubo se centrifugó durante 3 minutos (12 000 rpm, centrifuga de Eppendorf)
4. El sobrenadante se vertió a la minicolumna descrita anteriormente para purificación de ADN
- 5 5. El ensayo se centrifugó durante 1 minuto (12 000 rpm, centrifuga de Eppendorf)
6. 500 µl de solución de lavado A1 se añadieron a la minicolumna
7. El ensayo se centrifugó durante 1 minuto (12 000 rpm, centrifuga de Eppendorf)
8. La minicolumna se transfirió al nuevo tubo (2 ml) y 300 µl de la solución de lavado A1 se añadieron a la minicolumna.
- 10 9. El tubo se centrifugó durante 3 minutos (12 000 rpm, centrifuga de Eppendorf)
10. La minicolumna se transfirió al nuevo tubo (1,5 ml) y al sedimento de la parte inferior de la minicolumna se añadieron 60 µl de agua desionizada
11. El ensayo se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
12. El ensayo se centrifugó durante 1 minuto (12 000 rpm, centrifuga de Eppendorf)
- 15 13. La minicolumna se retiró y el ADN purificado en el tubo se almacena en un refrigerador.
14. La calidad del ADN y la cantidad de ADN se analizaron con un método espectrofotométrico.

PCR y secuenciación de ADN

20 El ADN aislado se amplificó con la mezcla de PCR para la técnica de PCR que consiste en:

1. 10 x de tampón de ADN polimerasa 6 µl
2. MgCl₂, 25 mM, 2,4 µl
3. Nucleótidos libres 2 mM 1,3 µl
- 25 4. Cebador R 20 pmol 0,5 µl
5. Cebador F 20 pmol 0,5 µl
6. H₂O 15 µl
7. ADN polimerasa 2 u/1 µl 0,15 µl

30 Cebador R: 341: 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG -3' (Muyzer *et al.* 1993)

Cebador F: 16SR: 5'- TACCTTGTTACGACTTCACCCCA-3' (Rossau *et al.* 1991)

Los productos de PCR obtenidos se sometieron a reacción de secuenciación, que se llevó a cabo en un laboratorio especializado

GENOMED (Warsaw, Ponczowa 12). Se usó el secuenciador de ADN automatizado Elmer ABI 373 (PE Applied

35 Biosystems, Foster City, CA, USA).

Como resultado de la secuenciación, se obtuvo la secuencia de ADN del fragmento génico 16S ARNr de cada una de las cinco cepas analizadas.

```

GTCTGATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTC
TGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTAT
TTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTT
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACT
GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTT
CAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTTAATTCTGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCA
AATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTC

```

40

Cada una de las secuencias obtenidas de aproximadamente 650 pz era idéntica. El análisis comparativo con las secuencias de ADN depositadas en el DNA (NCBI) indicó que la secuencia analizada es idéntica a la secuencia de

Lactobacillus plantarum.

Descripción de Colonias de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum*

- 5 Las colonias de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum*, cultivadas en medio de agar MRS (Merck, N.º de cat. 1106600500) después de 48 horas de incubación en condiciones relativamente anaerobias (microaerófilas) creadas por aplicación de una doble capa de medio de agar MRS, tienen un color blanco cremoso y tienen una forma de huso con una longitud de 1 a 4 mm y una anchura de 0,5 a 2 mm (en el punto más ancho).
- 10 El análisis llevado a cabo con el método genotípico, confirmó que la cepa MAT14 analizada pertenece a la especie *Lactobacillus plantarum*.

Estudio in vitro de actividad antagonista de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* frente a agentes patógenos del tracto gastrointestinal y piel

- 15 Para el estudio de las cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar se usaron especies de Enteritidis (las cepas: KOS 64 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, 65/s/10 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis) así como *Escherichia coli* (las cepas: O157:H7 de *Escherichia coli* - cepa enterohemorrágica, Nissle 1917 de *Escherichia coli* - la cepa aislada del suplemento dietético comercial denominado Mutaflor), ATCC 33862 de *Staphylococcus aureus*.
- 20

- Las cepas patógenas, usadas en los ensayos *in vitro*, provinieron del National Salmonella Centre en Gdynia ((KOS 64 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis), el Department of Veterinary Hygiene (65/s/10 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis - la cepa de campo, aislada de aves enfermas) y el Institute of
- 25 Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences en Olsztyn (O157:H7 de *Escherichia coli*, Nissle 1917 de *Escherichia coli*, ATCC 33862 de *Staphylococcus aureus*).

- La cepa AMT14 de *L. plantarum* proviene de la colección de microorganismos que es propiedad de PROBIOS Ltd. Las cepas patógenas se almacenaron en forma de liofilizado a 4 °C y se activaron inmediatamente antes de su uso
- 30 mediante pase de dos veces en caldo de cultivo de soja triptico (TSB, Merck, N.º de cat. 1054590500) o en leche hidrolizada.

- Con el fin de determinar la actividad antimicrobiana de bacterias de la cepa AMT14 de *L. plantarum* frente a patógenos seleccionados de especies de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Escherichia coli* y
- 35 *Staphylococcus aureus*, se llevaron a cabo cultivos bacterianos compartidos en leche hidrolizada que proporcionan un buen crecimiento de la cepa inhibitoria AMT14 de *Lactobacillus plantarum* así como de las cepas inhibidas KOS 64 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, 65/s/10 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, O157:H7 de *Escherichia coli*, Nissle 1917 de *Escherichia coli*, ATCC 33862 de *Staphylococcus aureus*.

- 40 El análisis se llevó a cabo para dos medios líquidos diferentes, es decir, caldo de cultivo de soja triptico (TSB, Merck, N.º de cat. 1054590500) y leche hidrolizada con el fin de evaluar el impacto del medio en la actividad antimicrobiana de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* frente a los agentes patógenos seleccionados. Los experimentos se llevaron a cabo aplicando tres repeticiones independientes y a continuación los resultados se resumieron y los valores promedio se calcularon.
- 45

- Los cultivos bacterianos compartidos (nuestra investigación) se inocularon la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* liofilizada a un nivel de 10^9 unidades formadoras de colonias/ml (descrito en lo sucesivo en el presente documento por la abreviatura comúnmente aceptada cfu/ml) así como monocultivo activo de la cepa patógena de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis especies en una cantidad de 10^5 a 10^6 cfu/ml, *Escherichia coli*
- 50 en una cantidad de 10^6 a 10^7 cfu/ml, *Staphylococcus aureus* en una cantidad de 10^5 cfu/ml. En este experimento, las cepas de bacterias patógenas individuales (KOS 64 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, 65/s/10 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, O157:H7 de *Escherichia coli*, Nissle 1917 de *Escherichia coli*, ATCC 33862 de *Staphylococcus aureus*) así como monocultivo de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* se usaron como muestras de control aplicando un nivel de inóculo y el medio líquido al igual que en los
- 55 cultivos compartidos.

- Los cultivos compartidos así como los individuales se prepararon en cuatro tubos paralelos por triplicado. La incubación se llevó a cabo en condiciones aerobias a 37 °C durante 0 (inóculo que determina el ensayo de blanco) 24, 48 y 72 horas. Después de la incubación el número de células vivas de bacterias *Lactobacillus plantarum* así
- 60 como el número de patógenos se determinaron en cultivos compartidos y de control usando ensayo de recuento de placas en medio de agar apropiado (Tabla 1).

- El material analizado se diluyó con peptona al 1 % y agua aplicando el método de diluciones en serie de diez veces y se cultivó en la parte inferior de una placa de Petri, a continuación el medio de agar líquido a una temperatura de
- 65 45 °C se vertió. Inmediatamente después de la solidificación del medio, las placas se voltearon de arriba hacia abajo

y se incubaron a 37 °C durante 24 o 42 horas en condiciones aerobias o condiciones relativamente anaerobias. Las condiciones de cultivo se informan en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de los cultivos de cepas bacterianas analizadas

El tipo de cepas	Medio aplicado	Condiciones de incubación
<i>Lactobacillus plantarum</i> AMT14	MRS Agar (Merck, N.º de cat., 1106600500) de acuerdo con de Man'a J.C, Rogosa M., Sharpe E.M (1960)	37 °C/48 horas, condiciones microaerófilas creadas mediante aplicación de una doble capa de medio de agar MRS (Merck)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Macconkey Agar (Merck, N.º de cat. 1054650500)	37 °C/24 horas, condiciones aerobias
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis KOS 64, <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis 65/s/10	Base Cromogénica LAB-AGAR (BIOCOP, N.º de cat. PS598) + suplemento (BIOCOP, N.º de cat. SL0061)	37 °C/24 horas, condiciones aerobias
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 33682	Braid-Parkera (BTL, N.º de cat. P-0026)	37 °C/24 horas, condiciones aerobias

5

Después de la incubación, se hizo el recuento de las colonias bacterianas de los cultivos compartidos y se comparó con el número de bacterias en los cultivos de control (las individuales).

- Los estudios *in vitro* mostraron una reducción total del número de cepas bacterianas KOS64 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, Nissle 1917 de *Escherichia coli* y ATTC 33682 de *Staphylococcus aureus* durante 24 horas de incubación, y en el caso del cultivo compartido de las cepas 65/s/10 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis y O157:H7 de *Escherichia coli* con la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* después de 48 horas de incubación también se observó una reducción total del número de bacterias. No se observó ni impacto significativamente positivo ni impacto negativo del propio medio en el resultado con respecto a la actividad antimicrobiana de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* frente a patógenos seleccionados que pertenecen a las especies *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

- Los resultados informan en la Tabla 2. Estudio *in vitro* de la actividad antagonista de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* frente a patógenos del tracto gastrointestinal y piel. Los resultados se presentaron a continuación - Tabla 2.

Actividades antagonistas *in vitro* de la cepa AMT 14 de *Lactobacillus plantarum* frente a patógenos del tracto gastrointestinal y piel

Inóculo										
<i>L. plantarum</i> AMT14	1,80x10 ⁹									1,80x10 ⁹
<i>E. coli</i> O157:H7		2,81x10 ⁶								
<i>E. coli</i> Nissle1917			1,41x10 ⁷							1,41x10 ⁷
<i>S. Enteritidis</i> KOS64				1,24x10 ⁵						1,24x10 ⁵
<i>S. Enteritidis</i> 65/s/10					8,43x10 ⁵					8,43x10 ⁵
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33862									6,10x10 ⁶	6,10x10 ⁶
<i>Lactobacillus plantarum</i> AMT14		<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Escherichia coli</i> Nissle1917	<i>Salmonella Enteritidis</i> KOS64	<i>Salmonella Enteritidis</i> 65/s/10	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33862	<i>L. plantarum</i> AMT14 + <i>E. coli</i> O157:H7	<i>L. plantarum</i> AMT14 + <i>E. coli</i> Nissle1917	<i>L. plantarum</i> AMT14 + <i>S. Enteritidis</i> KOS64	<i>L. plantarum</i> AMT14 + <i>S. Enteritidis</i> 65/s/10
										<i>L. plantarum</i> AMT14 + <i>S. aureus</i> ATCC33862

24 h de inoculación													
<i>L. plantarum</i> AMT14	2,76x10 ⁹								1,69x10 ⁹	2,51x10 ⁹	1,96x10 ⁹	1,42x10 ⁹	3,18x10 ⁹
<i>E. coli</i> O157:H7		5,30x10 ⁸							1,00x10 ¹				
<i>E. coli</i> Nissle1917			9,22x10 ⁸							Nb			
<i>S. Enteritidis</i> KOS64				1,20x10 ⁹							Nb		
<i>S. Enteritidis</i> 65/s/10								6,0x10 ⁸				7,50x10 ³	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33862									2,45x10 ⁸				Nb
48 h de inoculación													
<i>L. plantarum</i> AMT14	1,13x10 ⁹								5,29x10 ⁸	1,30x10 ⁹	1,40x10 ⁹	8,67x10 ⁸	1,94x10 ⁹
<i>E. coli</i> O157:H7		3,20x10 ⁸							Nb				
<i>E. coli</i> Nissle1917			9,46x10 ⁸							Nb			
<i>S. Enteritidis</i> KOS64				2,00x10 ⁸							Nb		

* Nb - ausente en 1 ml de cultivo

Determinación de la capacidad de proliferación de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* a 15 °C y 20 °C

El medio líquido de MRS (Merck, N.º de cat. 1106610500) se inóculo con la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* a una dosis de aprox. 10^7 unidades formadoras de colonias/ml. El cultivo se llevó a cabo en tres tubos paralelos en condiciones aerobias a temperaturas de 15 °C y 20 °C durante 24, 48 y 72 horas. Además, el cultivo de control paralelo de la cepa analizada se llevó a cabo en condición aerobia a una temperatura de crecimiento óptima, es decir, 37 °C. El número de células vivas se determinó inmediatamente después de la inoculación y después de 24, 48 y 72 horas. La incubación de bacterias se llevó a cabo en placas de Petri a 37 °C durante 48 horas en condiciones relativamente anaerobias. En paralelo a la determinación del número de células, se llevó a cabo la medición potenciométrica del nivel de pH del cultivo.

La cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* mostró una capacidad para crecer a 15 °C y 20 °C. La cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* analizada proliferó ligeramente más despacio el primer día de incubación a 15 °C, entonces atacó el número de $1,4 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias/ml (descrito en lo sucesivo con la abreviatura comúnmente aceptada cfu/ml), haciendo referencia al cultivo de control en paralelo - $1,5 \times 10^9$ cfu/ml. En el periodo de incubación de 48 y 72 horas, la población de cepas fue de $1,6 \times 10^9$ y $2,3 \times 10^9$ cfu/ml respectivamente. Sin embargo, en el caso del cultivo de control cada día de incubación dio como resultado una reducción del número de células con respecto al nivel de 10^8 cfu/ml. Por el contrario, la población de la cepa AMT14 de *L. plantarum* a 20 °C era comparable con el número de células que esa cepa AMT14 alcanzó a una temperatura de crecimiento óptima, es decir, 37 °C. Después de 24 horas y 48 horas de incubación a 20 °C la población de la cepa fue de $2,0 \times 10^9$ y $2,9 \times 10^9$ cfu/ml respectivamente y las siguientes 24 horas de incubación permaneció sin cambios.

Tabla 3. Determinación de la capacidad de crecimiento de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* a 15 °C y 20 °C

Cepa	En número de bacterias de la cepa AMT14 de <i>Lactobacillus plantarum</i> (cfu/ml)			
	inóculo	24 h de incubación	48 h de incubación	72 h de incubación
cepa AMT14 de <i>Lactobacillus plantarum</i> (cultivo de control, incubación a 37 °C)	$1,8 \times 10^7$	$1,5 \times 10^9$	$6,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$
cepa AMT14 de <i>Lactobacillus plantarum</i> (incubación a 15 °C)	$1,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$1,6 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$
la cepa AMT14 de <i>Lactobacillus plantarum</i> (incubación a 20 °C)	$1,8 \times 10^7$	$2,0 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$

Se encontró que la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* tiene propiedades únicas para crecer a bajas temperaturas, es decir, por debajo de 16 °C.

Determinación de la supervivencia de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* a pH bajo así como en presencia de sales biliares.

La supervivencia de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* a pH bajo se determinó mediante la reducción de la acidez del cultivo de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* que se encuentra en fase de crecimiento estacionaria a un valor de pH de 3. Sin embargo, en el caso de la determinación de la supervivencia de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* en presencia de sales biliares, el pH de inicio de cultivo de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* se aumentó hasta un valor de 6, a continuación se añadió sales biliares en una cantidad de un 3 % del cultivo. La determinación de la supervivencia de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* a pH bajo se llevó a cabo antes de disminuir el pH del cultivo (muestra de control), justo antes de disminuye el pH del cultivo hasta un valor de 3, denominado minuto 0, y después de 40 y 180 minutos de incubación a 37 °C en condiciones anaerobias. La supervivencia de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* en presencia de sales biliares se determinó antes de la adición de las sales biliares (muestra de control), justo después de la adición de las sales biliares, denominado minuto 0 y después de 1, 3 y 6 horas de incubación a 37 °C en condiciones anaerobias. Las células vivas de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* se determinaron en unidades formadoras de colonias (cfu/ml) siguiendo el método de placas puras.

La supervivencia de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* se expresó como un porcentaje del número de cepas AMT14 de *Lactobacillus plantarum* después de 180 minutos en el caso de supervivencia determinando un valor de pH de 3, y después de 6 horas en el caso de la determinación del número de cepas AMT14 de *Lactobacillus plantarum* en presencia de sales biliares. Los resultados obtenidos se compararon respectivamente con el número de cepas AMT14 de *Lactobacillus plantarum* en la muestra de control.

Tabla 4. Supervivencia de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* a pH = 3

Cepa	Número de bacterias (log 10 cfu/ml)				Supervivencia después de 180 minutos
	Antes de disminuir el pH	pH = 3			
	0 minutos	0 minutos	40 minutos	180 minutos	%
cepa AMT14 de <i>Lactobacillus plantarum</i>	8,95	9,08	9,07	8,98	100

Tabla 5. Supervivencia de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* en presencia de sales biliares en una cantidad de un 3 %

Szczep	Número de bacterias (log 10 cfu/ml)					Supervivencia después de 6 horas
	Antes de la adición de sales biliares	Después de la adición de las sales biliares				
		0 h	1 h	3 h	6 h	%
cepa AMT14 de <i>Lactobacillus plantarum</i>	9,03	8,92	8,70	8,03	8,05	89

5

La cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* examinada mostró un 100 % de supervivencia a pH = 3 bajo y un 89 % de supervivencia en presencia de un 3 % de sales biliares.

Los resultados mostraron una alta resistencia de la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* a pH bajo así como en presencia de sales biliares. Esto indica que la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* se adapta a las condiciones del tracto gastrointestinal. La invención se ilustra con las realizaciones que siguen a continuación.

Ejemplo 1

15 La composición probiótica usada como un aditivo alimentario y para agua para aves de corral, de acuerdo con la invención, es el producto en la forma de bacterias liofilizadas y un medio, que se distingue por que la cepa bacteriana contiene la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* - PCM B/00092.

Ejemplo 2

20

La composición probiótica usada como un aditivo alimentario y para agua para acuicultura, de acuerdo con la invención, es el producto en la forma de bacterias liofilizadas y un medio, que se distingue por que la cepa bacteriana contiene la cepa AMT14 de *Lactobacillus plantarum* - PCM B/00092

REIVINDICACIONES

1. La cepa de AMT14 de *Lactobacillus plantarum* depositada como PCM B/00092.

- 5 2. Composición para la producción de cremas y pomadas, preparaciones/productos parafarmacéuticos, farmacéuticos, alimentarios y aditivos alimentarios y para agua para seres humanos y animales, que consiste en la cepa de la reivindicación 1, medio y agente para aumentar el volumen, **caracterizada por que** la composición contiene la cepa bacteriana de la reivindicación 1 en una cantidad de 10^1 a 10^{13} de unidades formadoras de colonias/ml.

10

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 8905849 A [0007]
- US 5705160 A [0008]
- EP 353581 A [0008]
- PL 179838 [0008]
- PL 195089 [0008]
- PL 214583 [0008]
- EP 2311473 A [0008]
- WO 2009068474 A [0008]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **PATENTE E. ; CIOCIA F. ; RICCIARDI A. ; ZOTTA T. ; FELIS G. E. ; TORRIANI S.** Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, vol. 144, 270-279 [0002]
- **TANGANURAT W. ; QUNIKUIS B. ; LEELAWATCHARAMS V. ; BOLOTIN A.** Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Thai fermented fruits and vegetable. *Journal Basic Microbiology*, 2009, vol. 49, 377-385 [0002]
- **SHAH N. P.** Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 2007, vol. 17, 1262-1277 [0002]
- **TUOHY K. M. ; PROBERT H. M. ; SMEJKAL C. W ; GIBSON G. R.** Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery*, 2003, vol. 8, 692-700 [0003]
- **KESARCODI-WATSON A. ; KASPAR H. ; LATEGAN M. J. ; GIBSON L.** Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 2008, vol. 274, 1-14 [0003]
- **VERSCHUERE L. ; HEANG H. ; CRIEL G. ; DAFNIS S. ; SORGELOOS P. ; VERSRAETE W.** Protection of *Artemia* against the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2 by selected bacterial strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, 1139-1146 [0004]
- **VERSCHUERE L. ; ROMBAUT G. ; SORGELOOS P. ; VERSTRAETE W.** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 2000, vol. 64, 655-671 [0005]
- Shaping the micro ecosystem of gastrointestinal tract. **BIEDRZYCKA E ; MARKIEWICZ L. H. ; BIELECKA M. ; SIWICKI A. K.** Development control of gastrointestinal system in newborn mammals. 2007, 126-140 [0005]
- **GÓMEZ R. ; GEOVANNY D. ; BALCÁZAR J.L. ; SHEN M.** Probiotics as control agents in aquaculture. *Journal of Ocean University of China*, 2007, vol. 6, 76-79 [0005]
- **SHI HN ; WALKER A.** Bacterial colonization and the development of intestinal defenses. *Can. J Gastroenterol*, 2004, vol. 18, 493-500 [0005]