

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 636**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747 (2015.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2016 PCT/EP2016/065245**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17005584**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2016 E 16739045 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3319620**

54 Título: **Lactobacillus paracasei para la producción de ácido linoleico conjugado, preparaciones nutricionales y farmacéuticas que lo contienen y sus usos**

30 Prioridad:

07.07.2015 IT UB20152376

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

22.10.2020

73 Titular/es:

**ALFASIGMA S.P.A. (100.0%)
Via Ragazzi del '99 n. 5
40133 Bologna, IT**

72 Inventor/es:

**VISCOMI, GIUSEPPE CLAUDIO;
SFORZINI, ANNALISA;
MANGINO, PIERLUIGI y
ELLI, MARINA**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 788 636 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

Lactobacillus paracasei para la producción de ácido linoleico conjugado, preparaciones nutricionales y farmacéuticas que lo contienen y sus usos

5

Estado de la técnica

La presente invención se refiere a una nueva cepa perteneciente a la especie *Lactobacillus paracasei*, llamada LMG S-26420, capaz de convertir el ácido linoleico (LA) en ácido linoleico conjugado (CLA), útil en el tratamiento y prevención de enfermedades y/o estados fisiológicos relacionados con la deficiencia de ácido linoleico conjugado o en los casos en que se recomienda el uso de un probiótico, a procesos para obtenerla y a composiciones farmacéuticas o nutricionales que la contienen.

10

La cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 también es útil en el tratamiento y prevención de todos los trastornos en los que el consumo de un probiótico es beneficioso, por ejemplo, para restaurar y mantener el equilibrio de la flora intestinal.

15

El término CLA se refiere a una mezcla de isómeros de posición y geométricos del ácido linoleico (LA), en donde los dobles enlaces se conjugan en varias posiciones, para generar así isómeros cis y trans.

20

Se conocen al menos 16 isómeros de CLA y los isómeros de mayor interés biológico son los isómeros *c9-t11* y *t9-t11*. El isómero *c9-t11* es el isómero predominante en las dietas y ha demostrado ser importante porque está involucrado en muchos procesos biológicos y se incorpora en la fracción fosfolipídica de los tejidos animales, que se alimentan con mezclas de isómeros de CLA.

25

La producción de CLA en el organismo humano es sustancialmente irrelevante y, por lo tanto, su suministro se confía a la ingestión de productos lácteos y carne mediante la dieta o suplementos que contienen bacterias probióticas.

Los alimentos producidos por rumiantes son la principal fuente de CLA para seres humanos. Son intermediarios en la biohidrogenación del ácido linoleico y generalmente se acepta que el CLA en los rumiantes se origina por la biohidrogenación incompleta de los ácidos insaturados del ácido linoleico por las bacterias ruminales.

30

El CLA se introduce en el organismo mediante una dieta con leche, pescado, carne y productos lácteos, y sus efectos beneficiosos se correlacionan con niveles de consumo diario de aproximadamente 3 g/día. Una dieta desequilibrada proporciona un consumo promedio de CLA de 0,35 g/día y, teniendo en cuenta sus efectos beneficiosos para el organismo, esta deficiencia debe compensarse mediante el consumo de probióticos que convierten LA en CLA para proporcionar dosis útiles.

35

Las actividades biológicas de los ácidos linoleicos conjugados se atribuyen en gran medida a la acción de los isómeros *c9-t11* y *t10-c12*; las principales actividades biológicas relacionadas con los efectos anticancerígenos se atribuyen al isómero *c9-t11*, mientras que el isómero *t10-c12* está involucrado en el metabolismo lipídico del cuerpo humano.

40

El CLA tiene importantes propiedades biológicas y es útil para la salud humana y animal, tal como, por ejemplo, en patologías inflamatorias intestinales, diarrea e inflamación del colon, en el aumento de la masa corporal, en el aumento de la termogénesis, en la protección contra el estrés oxidativo, en la prevención de tumores, en enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, diabetes y aterosclerosis.

45

Ecker J. y otros en Biochem. Bioph. Res. Comm. 388, 2009, 660-666 informan que el isómero *c9-t11* activa el gen diana LXR involucrado en el desarrollo y progreso de la aterosclerosis. Ogawa J. y otros en Appl. Env. Microbiol 2001, 67, 1246 describen la producción de isómeros de CLA específicos a partir de ácido linoleico por lactobacilos, *Lactobacillus acidophilus* en condiciones microaerófilas, asumiendo que el hidroxiaácido 10-hidroxi-cis-12-octadecanoide es el intermediario de esta conversión y que la conversión involucra más de una etapa.

50

Ogawa J. y otros en J. Bioscience Bioeng. 100 (4), 355 (2005) informan la conversión de LA en CLA por bifidobacterias y lactobacilos con la obtención de una mezcla de isómeros. Cuando se usan bifidobacterias, la producción de isómeros de CLA varía de aproximadamente 3 a aproximadamente 400 mg por litro de cultivo, mientras que cuando se usan lactobacilos, la productividad varía de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 4 g por litro de cultivo. Cuando se usan *Lactobacillus casei*, la productividad nunca excede 1 g por litro de cultivo.

55

Rosberg-Cody E. y otros en Appl. Env. Microbiol 70 (8) 4635, 2004 describen el aislamiento de cepas de bifidobacterias a partir de material fecal de recién nacido, útil para la producción de CLA y proponen el uso de esas bacterias en suplementos para recién nacidos con riesgo de enterocolitis necrotizante.

60

También Coakley M. y otros en J. Appl. Microbiol. 94, 138 (2003) describen la capacidad de lactobacilos, lactococos y bifidobacterias de convertir LA en CLA, y demuestran que las cepas de bifidobacterias tienen una mayor capacidad de conversión de LA en CLA, con porcentajes de conversión de hasta casi 65 %.

65

Alonso L. y otros en J Dairy Sci. 86, 1941 (2003) describen la conversión de LA en CLA por *Lactobacilli casei* y *Lactobacilli acidophilus* de origen intestinal humano en medios con adición de diferentes concentraciones de ácido linoleico. A concentraciones de 0,02 % de ácido linoleico, la concentración máxima de CLA obtenida con *Lactobacillus casei* es de aproximadamente 110 mg por litro de cultivo y la cantidad del isómero de interés biológico c9-t11 varía de 60 a 85 mg por litro de cultivo.

Gustavo A. y otros, en Biosci. Biotechnol. Biochem., 77 (3), 648-650, 2013, describen un método rápido y más simple para detectar bacterias productoras de ácido linoleico conjugado (CLA) aisladas de la leche de vaca. Una cepa que se parece a *L. Paracasei* convirtió el ácido linoleico libre en CLA total en un porcentaje mayor que 85 %. Sin embargo, el porcentaje de conversión en el isómero de CLA de interés biológico c9,t11 es solo de aproximadamente 18 %.

Oguz Gursoy y otros, en International Journal of Food Sciences and Nutrition, 63(5), 610-615, describen el efecto del uso de diferentes cultivos de probióticos sobre la concentración de ácido linoleico conjugado y la composición de ácidos grasos del queso. Informan que las diferencias de probióticos y el proceso de almacenamiento no han afectado estadísticamente el contenido de CLA de las muestras. El incremento del contenido de CLA de las muestras de queso se debe a la lipólisis del ácido linoleico libre por las bacterias del ácido láctico.

ILARIA CARAFA Y OTROS: "Identification and characterization of wild lactobacilli and pediococci from spontaneously fermented Mountain Cheese", FOOD MICROBIOLOGY., vol. 48, 1 de junio de 2015 (2015-06-01), páginas 123-132, XP055298635, GB ISSN: 0740-0020, DOI: 10.1016/j.fm.2014.12.003 se refiere a *Lactobacilli paracasei* y un método para analizar la producción de ácido linoleico conjugado a partir de ácido linoleico. Las células se cultivan anaeróbicamente en una leche descremada con adición de ácido linoleico y albúmina de suero bovino. Las células se rompen y los sobrenadantes se extraen y se analizan con el uso de espectrofotometría UV en donde se usa el isómero de CLA ácido linoleico cis-9,trans-11 conjugado para trazar la curva de calibración.

El documento WO 2007/074010 se refiere a la producción de ácido linoleico trans 10,cis-12 conjugado en un microorganismo transgénico mediante la introducción en el microorganismo de una molécula de ácido nucleico que codifica una isomerasa de ácido linoleico trans 10,cis-12 conjugado en *L. paracasei*, para su uso en el tratamiento de la inflamación. Las tasas de conversión de ácido linoleico por *Lactobacillus paracasei* son mayores que 30 %.

ROMERO-PEREZ G Y OTROS: "A rapid method of screening lactic acid bacterial strains for conjugated linoleic acid production", BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY BIOCHEMISTRY, JAPAN SOCIETY FOR BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND AGROCHEMISTRY, TOKIO, JAPÓN, vol. 77, núm. 3, 1 de enero de 2013 (2013-01-01), páginas 648-650, XP002754919, ISSN: 0916-8451. DOI: 10.1271/BBB.120709 [recuperado el 07-03-2013] se refiere a *Lactobacillus paracasei* productor de ácido linoleico conjugado que representa isómeros de ácido linoleico cis-9, trans 11. El porcentaje de conversión en isómero de CLA cis-9, trans-11 18:2 y trans-10 cis-12 18:2 es 20 % (Tabla 2). También se produce CLA trans-10, cis12 que es potencialmente peligroso para la salud humana.

El consumo de productos probióticos que comprenden lactobacilos también es útil para mantener el equilibrio de la flora bacteriana intestinal y es una herramienta útil en la prevención y tratamiento de la disbiosis en general, en la que el equilibrio entre bifidobacterias y lactobacilos es esencial.

Dada la baja cantidad de CLA introducida con la dieta, y la dosis útil en todas las patologías y trastornos relacionados con una deficiencia de CLA, existía la necesidad de tener bacterias disponibles que conviertan LA en CLA para obtener dosis diarias útiles para la salud de las personas y para el tratamiento de todas las patologías en las que los isómeros de CLA son beneficiosos.

Las bifidobacterias convierten LA en CLA, pero los cultivos de bifidobacterias tienen la desventaja de tener bajos rendimientos productivos, expresados como cantidad de bacterias por litro de cultivo, y por lo tanto no es fácil obtenerlas en grandes cantidades en procesos a escala industrial.

Por lo tanto, existía la necesidad de tener una cepa bacteriana capaz de convertir LA en CLA que pueda obtenerse mediante cultivos bacterianos con alta productividad para usarla en preparaciones farmacéuticas o nutricionales útiles en el tratamiento o prevención de todos los trastornos y patologías relacionados con una deficiencia de CLA.

También existía la necesidad de tener una cepa bacteriana perteneciente al género *Lactobacillus*, capaz de convertir LA en isómeros de CLA beneficiosos para seres humanos o animales. Por otra parte, también existía la necesidad de tener un lactobacilo para todos los trastornos o patologías asociados con un desequilibrio microbiano en la superficie corporal. Una cepa perteneciente al género láctico puede ingerirse en asociación con bacterias del género *Bifidus* para promover el equilibrio microbiano de la flora humana o animal.

Las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* se encuentran entre las de mayor productividad; por lo tanto, se prefieren antes que las que pertenecen al género *Bifidobacterium* para convertir LA en CLA. Los lactobacilos pueden obtenerse mediante procesos industriales con rendimientos más altos que las bifidobacterias y pueden usarse para la producción de composiciones nutricionales o farmacéuticas para la administración en seres humanos o animales.

Entre estos, se prefieren los lactobacilos capaces de convertir LA en los isómeros *c9-11* y *t9-t11* de CLA en mayor medida que los otros isómeros. El *c9-t11* es un isómero importante porque está involucrado en los fosfolípidos de la membrana celular y es el isómero predominante en las dietas. Estos isómeros tienen efectos beneficiosos en seres humanos y animales, y en particular el isómero *t9-t11* tiene propiedades antiproliferativas y anticancerígenas. Ecker J y otros en Biochem. Biophysical. Res. Comm. 388, 660, 2009 informan que el isómero *t9-t11* de CLA es un poderoso agonista de LXR de macrófagos, relacionado con los procesos de inducción de la inflamación, y tiene un papel importante en la reducción de los procesos arterioscleróticos en modelos animales.

La presente invención describe una cepa perteneciente al género *Lactobacillus*, llamada *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, capaz de convertir LA en CLA con un porcentaje de conversión mayor que las otras cepas de lactobacilos conocidas en la técnica. Por otra parte, la cepa LMG S-26420 de la presente invención se caracteriza por convertir el LA en CLA, en donde la mezcla de isómeros *c9-t11* y *t10-c12* predomina en comparación con los otros isómeros.

La cepa se obtiene con cultivos bacterianos caracterizados por una productividad mayor que 4 g por litro de cultivo y puede obtenerse en forma liofilizada.

La cepa es estable y el producto del cultivo bacteriano puede almacenarse durante largos períodos a temperaturas por debajo de 0 °C o durante períodos mayores de 6 meses a 4 °C en forma liofilizada. La cepa LMG S-26420 puede estar comprendida en preparaciones nutricionales o alimenticias o en composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento y/o la prevención de trastornos o patologías relacionados con una deficiencia de CLA y en todos los trastornos en donde el consumo de un probiótico es beneficioso para seres humanos o animales.

Resumen

La presente invención se refiere a una nueva cepa perteneciente al género *Lactobacillus*, llamada *Lactobacillus paracasei*, depositada en la Colección de bacterias BCCM/LMG de las Colecciones Coordinadas de Microorganismos de Bélgica – Laboratorio de microbiología – Universidad de Gante, el 15 de abril de 2011 con el número LMG S-26420, en donde el *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 se caracteriza porque convierte el ácido linoleico en ácido linoleico conjugado en un porcentaje mayor que 30 %. La invención se refiere además a un proceso para la producción de un cultivo madre de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 de la reivindicación 1 caracterizado por las siguientes etapas:

- inocular la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 en un porcentaje volumétrico de 0,1 % a 10 %, en un medio de cultivo adecuado a una temperatura de 30 °C a 37 °C a valores de pH entre 4,5 y 7,5 durante un tiempo de 6 a 15 horas;
- separar la masa bacteriana del caldo de cultivo por centrifugación;
- almacenar la masa bacteriana a una temperatura por debajo de 0 °C, o liofilizar la masa bacteriana, para obtener así un cultivo madre de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420.

La invención se refiere además a una composición nutricional o alimenticia o farmacéutica que comprende una cantidad de células vivas de la cepa bacteriana de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 de 1×10^8 a 5×10^{11} , junto con excipientes aceptables en forma de tabletas, gránulos para bolsitas, cápsulas o suspensiones líquidas y a una composición nutricional o alimenticia o farmacéutica que comprende la cepa bacteriana de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias, patologías inflamatorias intestinales, en la prevención de tumores, en enfermedades autoinmunitarias, diabetes y aterosclerosis.

La cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 se caracteriza por convertir el ácido linoleico (LA) en ácido linoleico conjugado (CLA), en un porcentaje mayor que 30 % en comparación con el LA inicial, en donde los isómeros biológicos con actividad biológica *c9-t11* y *t9-t11* están en un porcentaje mayor que 30 % en comparación con los otros isómeros de CLA.

La cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 se caracteriza por la producción de alta concentración de CLA.

La cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 se obtiene mediante cultivos bacterianos caracterizados por una productividad mayor que 4 g por litro de cultivo y un rendimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) mayor que 1×10^9 por mililitro de cultivo.

La cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 se caracteriza por ser estable: puede almacenarse a temperaturas por debajo de 0 °C y durante períodos mayores de 6 meses a 4 °C en forma liofilizada.

La cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 liofilizada se caracteriza por una cantidad de células vivas mayor que 1×10^{10} , en particular de aproximadamente 1×10^{10} a aproximadamente 7×10^{10} unidades por gramo de producto liofilizado.

Es un objeto de la presente invención el proceso para la producción de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 en cultivo bacteriano, en donde el inóculo de la cepa LMG S-26420 tiene una concentración de 0,1 a 10 % (v/v) en un

medio de cultivo a una temperatura comprendida entre 30 °C y 37 °C, a valores de pH comprendidos entre 4,5 y 7,5, durante un período comprendido entre 6 y 15 horas. La biomasa se separa y puede conservarse a temperaturas por debajo de 4 °C o someterse a procesos de liofilización.

5 El proceso descrito conduce a la obtención de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 con un número de unidades formadoras de colonias comprendido entre 1×10^9 y 5×10^9 UFC por mililitro de cultivo y con una biomasa en una cantidad comprendida entre 10 y 20 gramos por litro de cultivo.

10 El proceso que comprende la liofilización conduce a la obtención de la cepa LMG S-26420 en forma sólida. En presencia de crioprotectores, la cepa se obtiene con rendimientos de unidades formadoras de colonias (UFC) mayores que 50 % y la cepa LMG S-26420 liofilizada incluye una cantidad de células mayor que 1×10^{10} por gramo de producto liofilizado.

15 Los objetos de la invención son preparaciones nutricionales o alimenticias y composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 en forma liofilizada correspondiente a una cantidad de células vivas de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 5×10^{11} .

20 Las preparaciones nutricionales o alimenticias y las composiciones farmacéuticas que comprenden *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 pueden estar en forma de bolsitas, tabletas o cápsulas. Las preparaciones nutricionales o alimenticias y las composiciones farmacéuticas pueden comprender prebióticos, vitaminas, sales minerales y excipientes farmacéuticos o nutricionales.

25 Los prebióticos están comprendidos en composiciones de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, se seleccionan del grupo que consiste en fructooligosacáridos, inulinas, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos, isomaltooligosacáridos y vitaminas seleccionadas del grupo que comprende las vitaminas del complejo E y B.

Las preparaciones nutricionales o alimenticias y las composiciones farmacéuticas que comprenden *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 pueden comprender bifidobacterias.

30 Las composiciones que comprenden *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 son útiles en el tratamiento y prevención de patologías y/o estados fisiológicos relacionados con la deficiencia de ácido linoleico conjugado y en todos los demás casos en donde el uso de un probiótico es útil y tiene un efecto beneficioso.

35 En particular, las composiciones que comprenden *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 son útiles en el tratamiento y prevención de patologías y/o estados fisiológicos relacionados con una deficiencia de CLA, tales como por ejemplo, en patologías inflamatorias intestinales, como diarrea e inflamación del colon; en el aumento de la masa corporal, en el aumento de la termogénesis, en la protección contra el estrés oxidativo, en la prevención de tumores, en enfermedades autoinmunitarias, diabetes y aterosclerosis.

40 Las composiciones que comprenden *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 con bifidobacterias, objeto de la presente invención, son útiles en el tratamiento de todos los trastornos relacionados con la disbiosis bacteriana.

Las composiciones que comprenden *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 son útiles en todos los estados fisiológicos en los que el equilibrio de la flora bacteriana intestinal de seres humanos y animales debe mantenerse inalterado.

45 Descripción de la invención.

Un cultivo bacteriano puro de la cepa perteneciente a *Lactobacillus paracasei* se depositó en las Colecciones Coordinadas de Microorganismos de Bélgica - Colección de Bacterias BCCM/LMG - Laboratorio de Microbiología - Universidad de Gante con el número LMG S-26420.

50 La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, a composiciones farmacéuticas, nutricionales o alimenticias que comprenden dicha cepa y a su uso en el tratamiento y prevención de patologías y/o estados fisiológicos relacionados con la deficiencia de ácido linoleico conjugado o cuando se indica el uso de un probiótico.

55 La cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 se ha aislado de la flora bacteriana vaginal de una mujer sana, seleccionada entre muchas otras cepas de lactobacilos aisladas simultáneamente de la misma fuente y de otros tipos de muestras biológicas y entre otras cepas de la misma especie, porque ha demostrado la capacidad de convertir ácido linoleico (LA) en ácido linoleico conjugado (CLA). Esta característica hace de esta cepa un agente probiótico útil para uso humano y animal.

60 *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 se caracteriza por convertir LA en CLA en un porcentaje mayor que 30 % determinado por un método cromatográfico.

Lactobacillus paracasei LMG S-26420 convierte el LA en isómeros de CLA con actividad biológica, en particular en los isómeros *c9-t11* y *t9-t11*. En un aspecto particular de la invención, *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 convierte el LA en los isómeros *c9-t11* y *t9-t11* de CLA en un porcentaje mayor que 30 %.

5 Para evaluar la capacidad de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 de convertir LA en CLA, se usaron tres métodos diferentes: el método de Ogawa, el método de Liu y el método cromatográfico.

10 El uso del método de Ogawa J. descrito en Appl. Environ. Microbiol 67(3): 1246-1252, 2001 permite determinar la capacidad de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 de convertir LA en CLA en un medio de cultivo adecuado mediante la adición de LA al cultivo bacteriano para adaptar el metabolismo de las células.

15 En un primer caso, se añaden concentraciones variables de LA, en un intervalo de 0,01 mg/ml al mg/ml, a una serie de cultivos celulares de la cepa LMG S-26420 y las células se incuban durante un período de 1 a 4 días a temperaturas de 30 ° a 40 °C. El producto final se centrifuga y se añade a las células una concentración constante de LA, igual a 5 mg/ml. Los cultivos celulares se incuban a una temperatura que varía de 30 ° a 40 °C, durante un período de 40 a 80 horas y después se centrifugan para eliminar el sobrenadante. Para evaluar la capacidad de una cepa de convertir LA en CLA, las células se resuspenden en agua y el CLA se determina mediante el método espectrofotométrico.

20 En un segundo caso, se añade una concentración constante de LA igual a 5 mg/ml a una serie de cultivos celulares de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 y la biomasa obtenida al final del cultivo se incuba con concentraciones variables de LA en un intervalo de 0,05 mg/ml a 0,4 mg/ml.

25 En ambos casos, *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 demostró ser eficaz para convertir LA en CLA, en particular en un porcentaje mayor que 30 %.

30 El uso del método de Liu P. como se describe en Biomed. & Biotechnol. 12811, 923-930, 2011, comprende la inoculación de la cepa LMG S-26420 en un medio de cultivo adecuado con concentraciones de LA de 0,05 a 1 mg/ml. Los cultivos se incuban durante un período de 1 a 3 días a temperaturas de 30 °C a 40 °C y después se centrifugan. Las concentraciones de CLA se determinan mediante el método espectrofotométrico.

35 Las pruebas realizadas de acuerdo con los métodos de Ogawa y Liu demostraron la capacidad de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 de convertir LA en CLA. Sin embargo, no es posible evaluar el porcentaje de conversión en isómeros de CLA con estos métodos, en particular si la cepa es capaz de convertir LA en isómeros de CLA que tienen la actividad biológica más fuerte.

El método cromatográfico, a su vez, permite la separación y cuantificación de isómeros geométricos de CLA, isómeros *trans-trans*, *trans-cis* y *cis-cis*, en particular los isómeros *cis9-trans 11*, *trans 10-cis 12* y *trans 9-trans 11*.

40 Los isómeros de CLA obtenidos se determinaron mediante el uso de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con iones de plata con un detector de matriz de diodos y un detector UV a 234 nm.

El método cromatográfico demuestra que la cepa LMG S-26420 convierte el LA en CLA con un porcentaje mayor que 30 %.

45 El método cromatográfico demuestra que la cepa LMG S-26420 convierte el LA en CLA con un porcentaje de 30 % a 50 %, en donde el porcentaje de isómeros con actividad biológica, *c9-t11* y *t9-t11*, predomina en comparación con los otros isómeros. En particular, la cepa LMG S-26420 convierte el LA en los isómeros CLA *c9-t11* y *t9-t11*, en donde su porcentaje es 40 % mayor que todos los demás isómeros geométricos de CLA.

50 La cepa LMG S-26420 se obtiene mediante cultivos celulares caracterizados por proporcionar un número de unidades formadoras de colonias (UFC) mayor que 1×10^9 por mililitro y una cantidad de masa sólida mayor que 4 g por litro de cultivo. La nueva cepa bacteriana obtenida es estable a temperaturas por debajo de 4 °C durante períodos más largos y puede liofilizarse con procesos que conservan significativamente la viabilidad celular. Los productos liofilizados son estables durante períodos de tiempo mayores de 3 meses a temperaturas de 4 °C y 25 °C.

55 La cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 produce una cantidad de biomasa liofilizada mayor que 4 g por litro de cultivo, en particular de 10 a 20 g por litro de cultivo. Teniendo en cuenta la capacidad de esta cepa de convertir LA en CLA en un porcentaje mayor que 30 %, se puede afirmar que la nueva cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 es capaz de producir concentraciones notables de CLA. Por ejemplo, la adición de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 a soluciones que incluyen concentraciones de aproximadamente 500 mg/litro de ácido linoleico conduce a la obtención de concentraciones mayores que 250 mg/litro de ácido linoleico conjugado.

60 Otra ventaja de la presente invención es tener una nueva cepa perteneciente al género *Lactobacillus* para la conversión de LA en isómeros de CLA con altos rendimientos de conversión útil para su inclusión en preparaciones nutricionales o alimenticias o en composiciones farmacéuticas.

65

La nueva cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 puede estar comprendida en composiciones que también comprenden otras cepas bacterianas, pertenecientes al mismo género o no, como las bifidobacterias.

5 Las composiciones que comprenden LMG S-26420 y otras cepas bacterianas generan ventajosamente una población probiótica heterogénea, útil para mantener el equilibrio de la flora bacteriana intestinal.

10 Los cultivos bacterianos objeto de la presente invención se produjeron primero a escala de laboratorio y después a escala industrial. El cultivo bacteriano de LMG S-26420 se obtuvo mediante un proceso de fermentación en un período de 6 a 12 horas a temperaturas que varían de 30 °C a 40 °C en un medio llamado MRS® (De Man, Rogosa & Sharpe) que contiene como ingredientes principales extracto de levadura, mezclas de peptonas y glucosa además de sales de potasio, amonio, magnesio y manganeso.

15 A partir de los cultivos primarios, se llevaron a cabo muchas fases de expansión para aumentar el número de células por volumen de cultivo de la cepa pura para obtener los llamados "cultivos madre", que se usaron como inóculo para la producción industrial de los cultivos bacterianos del probiótico LMG S-26420.

El proceso industrial para la producción de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 comprende las siguientes etapas:

- 20
- inocular la cepa LMG S-26420 con volúmenes de cultivos madre, en un porcentaje volumétrico de 0,1 a 10 % y fermentar en un medio de cultivo adecuado a 37 °C y pH de 4,5 a 7,5, durante un período de 8 a 15 horas;
 - separar la biomasa bacteriana del caldo de cultivo por centrifugación.

25 La biomasa puede congelarse o someterse a procesos de liofilización después de añadir los crioprotectores adecuados, seleccionados entre carbohidratos solubles, que son útiles para mantener la viabilidad celular durante los procesos de liofilización.

30 La cepa LMG S-26420 se obtiene mediante procesos de fermentación caracterizados por la producción de una cantidad de células vivas mayor que 10^9 células vivas por ml de cultivo y una biomasa de lactobacilos mayor que 4 g por litro de cultivo.

La cepa LMG S-26420 se obtiene con una productividad de 1×10^9 a 7×10^9 células vivas por ml de cultivo y tiene un rendimiento de producto seco de 10 a 20 g por litro.

35 La viabilidad celular se determina con el uso de métodos de recuento bacteriano conocidos para el experto en la técnica.

La cepa LMG S-26420 obtenida de los cultivos descritos puede liofilizarse para almacenarla fácilmente e incluirla en preparaciones alimentarias, alimenticias o farmacéuticas.

40 El proceso de liofilización se ejecutó en presencia de crioprotectores elegidos entre carbohidratos solubles, tales como por ejemplo, trehalosa y ciclodextrinas o una mezcla de ellos. El proceso de liofilización descrito se caracteriza por la obtención de una cepa LMG S-26420 liofilizada con un rendimiento en células vivas 50 % mayor que antes del proceso de liofilización. La cepa LMG S-26420 se caracteriza por comprender una cantidad de células vivas por gramo de producto liofilizado mayor que casi 1×10^{10} , en particular de casi 1×10^{10} a casi 7×10^{10} por gramo de producto liofilizado. Esto confirma que la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 se caracteriza por una alta productividad, puede liofilizarse y mantenerse como producto liofilizado con la certeza de conservar la viabilidad celular.

45

50 La cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 obtenida con los cultivos celulares descritos y liofilizada en presencia de crioprotectores seleccionados entre carbohidratos solubles o sus mezclas, se caracteriza por una actividad de agua (a_w) por debajo de 0,6, un valor por debajo del cual la proliferación de la mayoría de las bacterias y hongos se inhibe. La actividad de agua es un valor obtenido por medición de la presión parcial de vapor en una sustancia dividida por la presión parcial del agua, y puede obtenerse con detectores que proporcionan directamente esos valores.

55 Como se describe por Ryser, E.T. y otros en Listeria, Listeriosis and Food Safety (3ª ed.). CRC Press. 173-174, (2007), los valores de actividad de agua por debajo de 0,6 garantizan que la preparación liofilizada pueda almacenarse porque no se degrada debido a la proliferación microbiana, que es una de las causas más peligrosas de alteraciones alimentarias o de los alimentos.

60 Los productos liofilizados de la cepa LMG S-26420 se caracterizan por tener un número elevado de células vivas por gramo de producto liofilizado y un bajo contenido de actividad de agua, son útiles para almacenarlos para la preparación de composiciones o preparaciones en diferentes formas que contienen diferentes cantidades de probióticos, sin limitación.

65 La cepa bacteriana LMG S-26420 en las soluciones sometidas a los procesos de liofilización se caracteriza por valores de temperaturas de transición vítrea, T_g , mayores que 100 °C, y en presencia de carbohidratos solubles, tales como por ejemplo trehalosa, los valores de temperaturas de transición vítrea están en un intervalo de 100 °C a 120 °C. Estos valores

confirman que esta cepa puede someterse a procesos de liofilización y secado al vacío hasta temperaturas de 100 °C sin que el producto se convierta a un estado vítreo, con la consiguiente pérdida de sus propiedades.

5 La temperatura de transición vítrea de las soluciones congeladas T_g en relación con las preparaciones a liofilizar está en un intervalo de -15 ° a -30 °C y en presencia de carbohidratos solubles, como por ejemplo trehalosa, las temperaturas de transición vítrea están en un intervalo de -20 a -30 °C.

10 El proceso de liofilización de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 descrita en el Ejemplo 3 en presencia de crioprotectores elegidos entre carbohidratos solubles, en particular trehalosa, se caracteriza por una etapa de congelación realizada a temperaturas por debajo de -30 °C y un secado secundario realizado a temperaturas por debajo de 100 °C. Dicho proceso conduce a la obtención de la cepa LMG S-26420 en forma liofilizada, que se caracteriza por mantener sus propiedades biológicas.

15 En particular, el proceso de liofilización de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 descrita en la invención en presencia de trehalosa mantiene una viabilidad celular mayor que 30 %, en particular de 30 % a 60 %, en comparación con la viabilidad celular antes de la liofilización.

20 Las composiciones liofilizadas descritas de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 comprenden carbohidratos solubles, tales como trehalosa y manitol; este último puede añadirse a preparaciones liofilizadas que comprenden trehalosa cuando se requiere una masa liofilizada alta, en particular para usarla en preparaciones con una baja dosis de cepa probiótica.

25 Las soluciones que comprenden *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 a liofilizar pueden comprender osmolitos elegidos del grupo que consiste en betaina, sarcosina, glicerol, eritritol; sales seleccionadas del grupo que consiste en acetatos, formiatos o sales de amonio, útiles para mantener valores de pH entre 4 y 8 durante el proceso de liofilización.

30 La cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 liofilizada es estable a una temperatura de 4 °C durante un período mayor de 3 meses. En un aspecto particular, *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 mantiene más de 70 % de su viabilidad celular después de 6 meses a la temperatura de 4 °C y la actividad de agua permanece con valores por debajo de 0,6 %.

Por lo tanto, el producto liofilizado puede prepararse en grandes cantidades y almacenarse para la preparación de composiciones en forma sólida o suspendida a diferentes dosis de probióticos.

35 Un aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, preparaciones nutricionales o alimenticias que comprenden cantidades variables de la cepa LMG S-26420 en forma liofilizada en cantidades que varían de 20 a 2500 mg. Estas composiciones se caracterizan por comprender una cantidad de células vivas de LMG S-26420 de 1×10^9 a 1×10^{11} por gramo de producto liofilizado.

40 Las preparaciones pueden estar en una forma útil para la administración oral, tal como por ejemplo en bolsitas, tabletas, cápsulas o suspensiones líquidas.

45 Las composiciones en forma de tabletas o cápsulas pueden comprender una cantidad de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 que varía de 20 a 800 mg y las composiciones de bolsitas para suspensión líquida pueden comprender una cantidad de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 que varía de 20 mg a 10 gramos. Las composiciones farmacéuticas o nutricionales pueden comprender una cantidad de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 que varía de aproximadamente 1×10^9 a 1×10^{11} unidad de células.

50 Las composiciones farmacéuticas, nutricionales o alimenticias que comprenden *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 pueden comprender opcionalmente, pero no se limitan a, prebióticos seleccionados del grupo que consiste en fructooligosacáridos, inulinas, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos, isomaltoligosacáridos, dextrina resistente, polidextrosa, arabinogalactanos, almidón resistente, dextranos, goma guar; aminoácidos; proteínas; antioxidantes; vitaminas seleccionadas del grupo que comprende las vitaminas del complejo E y B, junto con sales farmacéuticamente aceptables útiles para la preparación de la forma deseada.

55 Las composiciones farmacéuticas, nutricionales o alimenticias que comprenden *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 pueden comprender también otras bacterias capaces de convertir LA en CLA, en particular las que pertenecen al género *Bifidobacterium*. Estas composiciones aumentan la conversión de LA en CLA y favorecen el equilibrio de la flora bacteriana intestinal.

60 Las composiciones en forma de bolsitas se preparan mediante la mezcla de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 en forma de productos liofilizados con excipientes seleccionados, tales como, por ejemplo, oligosacáridos, seleccionados del grupo de fructooligosacáridos, inulinas, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos, isomaltoligosacáridos y sabores, previamente tamizados. La mezcla homogénea se divide después en bolsitas.

65 La forma liofilizada puede molerse o granularse antes de añadirla a los excipientes farmacéuticos elegidos para la preparación de las formas sólidas deseadas.

Las composiciones en forma de tabletas pueden comprender diluyentes, ligandos, desintegrantes, lubricantes, deslizantes y se preparan de acuerdo con las técnicas conocidas para el experto en la técnica.

5 Opcionalmente, las composiciones pueden comprender agentes conservantes, antioxidantes, tamponantes, colorantes, saborizantes y edulcorantes.

Las composiciones de la invención que comprenden la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 son estables a temperatura de 4 °C y 25 °C durante un período de 1, 3 y 6 meses con una recuperación completa de las células vivas.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas, nutricionales o alimenticias que comprenden la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 para su uso en el tratamiento y prevención de patologías y/o estados fisiológicos en donde un probiótico es útil. Estas composiciones son para su uso en la prevención y tratamiento de patologías y/o estados fisiológicos relacionados con una deficiencia de CLA tales como, por ejemplo, en patologías inflamatorias intestinales, diarrea e inflamación del colon, en la prevención de tumores, en enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, diabetes y aterosclerosis.

Las composiciones que comprenden la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 son útiles en el tratamiento y prevención de todos los trastornos o patologías relacionados con un desequilibrio microbiano.

20 Las composiciones que comprenden la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 también son útiles como suplemento alimentario en todas las dietas pobres en carne o productos lácteos para obtener concentraciones de CLA beneficiosas para seres humanos.

Ejemplos

25 Los Ejemplos se refieren a la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 que corresponde exactamente a la depositada en la Colección Coordinada de Microorganismos de Bélgica, la Colección de bacterias BCCM, LMG, Laboratorio de microbiología, Universidad de Gante, que confirmó la pureza y viabilidad de la cepa y la registró con el número LMG S-26420. En particular, los ejemplos se refieren a la caracterización de la cepa LMG S-26420, a su capacidad de convertir LA en CLA, a su proceso de producción a escala industrial y a composiciones que la contienen.

Ejemplo 1

35 Determinación de la capacidad de la cepa de convertir el ácido linoleico (LA) en ácido linoleico conjugado (CLA)

Para determinar la capacidad de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 de convertir LA en CLA, se ha evaluado una condición en donde el inóculo se preparó en presencia de LA, para estimular la preadaptación de las células bacterianas y una condición sin LA.

40 a) Determinación de acuerdo con el método de Ogawa

La determinación cuantitativa de la capacidad de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 de convertir LA en CLA se realizó de acuerdo con el método de Ogawa descrito en Appl. Envr. Microbiol. 2001, 67, 1246.

45 El método se basa en el inóculo de la cepa en medio de cultivo MRS® (Man, Rogosa, Sharpe) que comprende una mezcla de peptonas de 18 g/l; extracto de levadura 4 g/l; glucosa 20 g/l; tween-80 1 ml/l; fosfato de potasio 2 g/l; citrato de triamonio 2 g/l; acetato de sodio anhidro 3 g/l; sulfato de magnesio heptahidratado 0,2 g/l; sulfato de magnesio anhidro 0,034 g/l; agar 12 g/l.

50 La cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 a una concentración de 1 % se inoculó en 15 ml de MRS® con LA a concentraciones de 0,01 a 0,4 mg/ml y las soluciones se mantuvieron a una temperatura de 37 °C durante 3 días con agitación baja. Los cultivos se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se lavó con agua estéril y la masa celular de aproximadamente 20 mg se resuspendió con 1 ml de solución de tampón de fosfato de potasio 100 mM a pH 6,5 y se añadió 5 mg de LA en un complejo con albúmina bovina (BSA) a la suspensión celular, con una relación correspondiente a 0,2 mg de BSA/mg de LA. Después los cultivos se incubaron durante 48 y 72 horas y después se centrifugaron para eliminar el sobrenadante. Las células se resuspendieron en agua y la concentración de CLA se determinó por espectrofotometría mediante el método de Barret, descrito en Appl. Environment Microbiol. 73(7), 2333, (2007). Este método comprende la extracción de la fracción de ácidos grasos mediante la adición de 2 ml de isopropanol a 1 ml de muestra. Las soluciones se agitaron vigorosamente, se dejaron reposar durante 3 minutos y después se añadió 1,5 ml de hexano. Las fases orgánicas se separaron y se deshidrataron con sulfato de sodio anhidro y la cantidad de CLA se determinó mediante lectura espectrofotométrica a 233 nm. Las concentraciones se determinaron mediante una curva de calibración obtenida con diferentes concentraciones del isómero de CLA c9-t11 a la misma longitud de onda.

65 La Tabla 1 informa los porcentajes de conversión de LA en CLA mediante la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, en donde la preincubación de la cepa se realizó a diferentes concentraciones de LA y la incubación de las células

ES 2 788 636 T3

lavadas se realizó con 5 mg/ml de LA. La Tabla 1 muestra que, en las condiciones informadas, los porcentajes de conversión de LA en CLA varían de 1 % a 7 %.

Tabla 1

Concentración de LA (mg/ml)	Tiempo de incubación de las células (h)	Temperatura de incubación de las células (°C)	Concentración de CLA (mg/ml)	Porcentaje de conversión (%) de LA en CLA
0,01	48	30	0,083	2
0,05	48	30	0,075	2
0,1	48	30	0,067	1
0,2	48	30	0,041	1
0,3	48	30	0,045	1
0,4	48	30	0,104	2
0,01	72	37	0,204	4
0,05	72	37	0,273	5
0,1	72	37	0,097	2
0,2	72	37	0,349	7
0,3	72	37	0,282	6
0,4	72	37	0,085	6

En las condiciones informadas en la Tabla 2, el CLA no está presente en el sobrenadante.

La Tabla 2 informa los resultados de la conversión de LA en CLA. La preincubación se realizó con LA a una concentración de 0,05 mg/ml y la masa celular lavada se incubó a una concentración variable de LA. El CLA se determinó en el sobrenadante y en el sedimento de células.

Tabla 2

Concentración de LA (mg/ml)	Tiempo de incubación de las células (h)	Temperatura de incubación de las células (°C)	Muestra	Concentración de CLA (mg/ml)	Porcentaje de conversión (%) de LA en CLA
0,05	72	37	Células	-	-
0,05	72	37	Sobrenad.	0,013	25
0,1	72	37	Células	-	-
0,1	72	37	Sobrenad.	0,004	4
0,2	72	37	Células	-	-
0,2	72	37	Sobrenad.	-	-
0,3	72	37	Células	-	-
0,3	72	37	Sobrenad.	-	-
0,4	72	37	Células	0,007	2
0,4	72	37	Sobrenad.	0,005	1
0,5	72	37	Células	0,007	1
0,5	72	37	Sobrenad.	0,003	1
1	72	37	Células	0,025	3
1	72	37	Sobrenad.	-	-

2	72	37	Células	0,042	2
2	72	37	Sobrenad.	0,011	1
3	72	37	Células	0,059	2
3	72	37	Sobrenad.	0,017	1
4	72	37	Células	0,077	2
4	72	37	Sobrenad.	0,0043	1

b) Determinación de acuerdo con el método de Liu.

El método de Liu se ha descrito en Biomed. Biotechnol. 12811, 923 (2011).

La Tabla 3 informa los datos relacionados con la conversión de LA en CLA por *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, de acuerdo con el método descrito por Liu P y otros en Biomed. Biotechnol. 12811, 923, 2011.

El método se basa en la determinación de la cantidad de CLA en el sobrenadante de cultivos en medio MRS® que contienen diferentes concentraciones de LA de 0,05 a 0,5 mg/ml. Los cultivos se incubaron durante un período de 24 y 96 horas y a una temperatura de 30 ° y 37 °C. El CLA obtenido por la conversión de LA se determinó con el método de Barret como se describe en el Ejemplo I.a.

Tabla 3

Concentración de LA (mg/ml)	Tiempo de incubación de las células (horas)	Temperatura de incubación de las células (°C)	Concentración de CLA (mg/ml)	Porcentaje de conversión (%) de LA en CLA
0,00	24	30	0,001	-
0,05	24	30	0,005	9
0,1	24	30	0,005	5
0,2	24	30	0,005	2
0,3	24	30	0,006	2
0,4	24	30	0,006	2
0,5	24	30	0,006	1
0,00	96	30	0,001	-
0,05	96	30	0,006	12
0,1	96	30	0,005	5
0,2	96	30	0,005	3
0,3	96	30	0,006	2
0,4	96	30	0,006	1
0,5	96	30	0,006	1
0,00	24	37	0,001	-
0,05	24	37	0,004	8
0,1	24	37	0,005	5
0,2	24	37	0,005	2
0,3	24	37	0,005	2
0,4	24	37	0,006	1

0,5	24	37	0,006	1
0,00	96	37	0,001	-
0,05	96	37	0,005	10
0,1	96	37	0,006	6
0,2	96	37	0,006	3
0,3	96	37	0,007	2
0,4	96	37	0,006	2
0,5	96	37	0,008	2

c) Determinación de acuerdo con el método cromatográfico (HPLC)

El método cromatográfico permite la determinación de isómeros geométricos de CLA, el isómero *c9-t11*, el isómero *trans 10-cis12* y el isómero *trans9-trans11* en suspensiones celulares y en sobrenadantes de cultivos de acuerdo con el método descrito en a) y en b) e informado en las Tablas 2 y 3.

Las muestras se metilaron como se describe por Kramer J. y otros en Am. J. Clin. 79, 1137 S 2004 y los ésteres metílicos obtenidos se separaron por cromatografía de alta presión (HPLC) con iones de plata. Los isómeros de CLA se separaron con el uso de tres columnas CHromSpher Lipid de 4,6 mm x 250 mm, conectadas en serie, con partículas de tamaño 5 µ. Los isómeros se eluyeron con una solución de hexano-acetonitrilo: 99-1 y se detectaron con un detector de matriz de diodos y un detector UV a 234 nm en serie. La determinación cuantitativa se realizó mediante el uso de soluciones a concentraciones conocidas de isómeros de CLA.

La Tabla 4a informa la determinación de isómeros de CLA en muestras de sedimentos procedentes de cultivos con preincubación de LA a una concentración de 0,05 mg/ml e incubación de células lavadas a diferentes concentraciones de LA a 37 °C y un tiempo de incubación de 72 horas como se informa en a), método de Ogawa.

Tabla 4a

Conc. de LA (mg/ml)	Isómero de CLA <i>t9-t11</i> (mcg/g)	Isómero de CLA <i>c10-t12</i> (mcg/g)	Isómero de CLA <i>c9-t11</i> (mcg/g)	Isómeros (<i>t9-t11</i> y <i>c9-t11</i>)* (%)	Porcentaje de conversión total (%)
0,05	1,39	2,75	2,07	3,46	14,8
0,01	1,56	3,50	3,07	4,63	0,2
0,4	1,21	2,78	2,40	3,61	0,2

*isómeros con actividad biológica

La Tabla 4b informa la concentración de isómeros de CLA en muestras de sobrenadante procedentes de cultivos incubados a diferentes concentraciones de LA como se informa en b), método de Liu.

Tabla 4b

Conc. de LA (mg/ml)	Isómero de CLA <i>t9-t11</i> (mcg/g)	Isómero de CLA <i>c10-t12</i> (mcg/g)	Isómero de CLA <i>c9-t11</i> (mcg/g)	Isómero de CLA (<i>t9-t11</i> y <i>c9-t11</i>)* (mcg/g)	Isómeros (<i>t9-t11</i> y <i>c9-t11</i>)* (%)	Porcentaje de conversión total (%)
0,05 (24 h)	1,81	5,07	3,30	44,16	46,76	25,9
0,05 (96 h)	2,45	6,33	5,06	42,26	46,67	35,5
0,2 (96 h)	1,74	5,64	5,04	46,15	46,15	7,3
0,5 (96 h)	1,95	5,80	5,22	7,17	44,67	3,2

*isómeros con actividad biológica

Ejemplo 2

Proceso de fermentación para la preparación de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420.

5 Las fermentaciones se realizaron en un fermentador Sartorius. El inóculo de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 al 1 %, correspondiente a 40 ml, se cultivó en 4 litros de medio MRS® a una temperatura de 37 °C durante 8 horas.

10 La masa celular obtenida por diferentes fermentaciones se concentró por centrifugación y se lavó con agua estéril. La densidad óptica en la suspensión acuosa de la masa celular se determinó mediante el método espectrofotométrico a 625 nm y las unidades formadoras de colonias (UFC) se determinaron mediante recuento en placa por diluciones decimales.

Algunas preparaciones se realizaron con diferentes parámetros de fermentación para determinar las mejores condiciones de cultivo bacteriano para la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420.

15 La Tabla 5 informa los parámetros relacionados con las fermentaciones a diferentes presiones de dióxido de carbono, velocidad de agitación y pH. La Tabla 5 también informa los resultados obtenidos por medición de la densidad óptica y el número de UFC en la biomasa al final de la fermentación, después de 8 horas.

Tabla 5

Parámetros de fermentación	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 3	Prep. 4	Prep. 5	Prep. 6
Medio de cultivo	MRS®	MRS®	MRS®	MRS®	MRS®	MRS® + Trehalosa 1 %
pH	n.c.	n.c.	n.c.	5,5	5,5	5,5
P-CO2 (bar)	0,8 bar – 30 min.	0,8 bar – 30 min.	1 bar – 60 min.	1 bar – 60 min.	n.c.	0,8 bar – 45 min.
Parámetros de fermentación	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 3	Prep. 4	Prep. 5	Prep. 6
Velocidad de agitación (rpm)	100	150	150	150	150	150
Peso de la biomasa (g)	40	40	32	35	47	62
DO 625 nm - TO	3,50	0,075	0,041	0,045	0,036	0,04
DO 625 nm - 8 h	0,087	1,78	1,406	1,63	1,553	1,50
UFC/ml-T0	3,50E+06	2,50E+07	6,30E+07	3,30E+07	3,00E+07	1,75E + 07
UFC/m1-8 h	2,30E+09	1,10E+09	1,90E+09	2,20E+09	2,60E+09	1,05E+09

n.c.: no controlado

45 El número de UFC de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 al final del cultivo estaba comprendido en un intervalo de $1,9 \times 10^9$ a $2,6 \times 10^9$ por mililitro de cultivo y la biomasa producida comprendía de 8 a 16 gramos por litro de cultivo.

La medición de UFC se realizó en placa de Petri por dilución en serie de la masa celular y el recuento de colonias microbianas.

50 Las masas celulares pueden mantenerse a temperaturas por debajo de 0 °C o liofilizarse directamente para conservarlas en forma sólida o usarlas para preparaciones farmacéuticas/nutricionales.

Ejemplo 3

55 Preparación de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 en forma liofilizada.

El producto obtenido de la preparación descrita en el Ejemplo 2 (Preparación 6) se liofilizó.

60 Para valorar el efecto de un crioprotector sobre la liofilización de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, los procesos de liofilización se realizaron en presencia de ciclodextrinas, trehalosa y manitol.

El sedimento de células se suspendió en agua y se añadió una cantidad de ciclodextrinas al 10 % (p/V).

La solución se dividió en tres partes:

65

Solución A: ciclodextrinas 10 % (p/V)

Solución B: ciclodextrinas 10 % (p/V) + trehalosa 20 % (p/V)

Solución C: ciclodextrinas 10 % (p/V) + manitol 15 % (p/V).

La Tabla 6 informa los parámetros del proceso de liofilización para las soluciones A y B.

Tabla 6

ETAPAS del proceso de liofilización (I)	Parámetros
Congelación	-50 °C, v = 2 °C/min, -50 °C x 120 min
Secado primario	-50 °C x 15 min, -30 °C, v = 0,3 °C/min, -30 °C x 300 min P= 100 mTorr
Secado secundario	30 °C, v = 0,16 °C/min, 30 °C x 480 min P= 100 mTorr
Tiempo Total	14 horas

La Tabla 7 informa el parámetro del proceso de liofilización para las soluciones C.

Tabla 7

ETAPAS del proceso de liofilización (I)	Parámetros
Congelación	-60 °C x 120 min
Recocido	-10 °C, v = 0,55 °C/min -10 °C x 240 min -50 °C x 120 min
Secado primario	-18 °C, v = 0,16 °C/min 18 °C x 600 min P= 120 mTorr
Secado secundario	25 °C, v = 0,07 °C/min P= 50 mTorr

La cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 liofilizada obtenida se almacenó en botellas o bolsitas a 4 °C.

Ejemplo 4

Determinación de las temperaturas de transición vítrea T_g, T'_g

La temperatura de transición vítrea T_g y T'_g de las soluciones A y B antes de la liofilización se determinó mediante calorímetro diferencial de barrido, con el uso de un instrumento Diamond de DSC, con aplicación de ciclos de congelación/calentamiento como se informa en la Tabla 8.

Tabla 8

Etapa	Temperatura 1 (°C)	Temperatura 2 (°C)	Velocidad (°C/min)
1	25	-60	10
2	-60	25	40
3	25	100	10
4	100	-50	50
5	-50	170	40

El ciclo informado en la Tabla 9 se usó para las soluciones C.

Tabla 9

Etapa	Temperatura 1 (°C)	Temperatura 2 (°C)	Velocidad (°C/min)
1	25	-60	10
2	-60	-10	40
3	-10	-10	Constante durante 120 min.
4	-10	-60	40
5	-60	25	40

Los valores de las temperaturas de transición vítrea de las soluciones Tg y de las soluciones acuosas congeladas, Tg de las soluciones A, B y C a liofilizar se informan en la Tabla 10.

Tabla 10

Liofilización LMG S-26420	Preparación	Tg ¹ (°C)	Tg (°C)
Soluciones A = ciclodextrinas 10 % (p/V)	A-1	-12,25	148,55
	A-2	-12,75	140,81
	A-3	-13,05	144,44
B = ciclodextrinas 10 % (p/V) + Trehalosa 20 % (p/V)	B-1	-26,50	112,00
	B-2	-26,63	114,64
	B-3	-26,54	117,54
	B-4	-26,75	112,45
	B-5	-26,54	114,40
	B-6	-30,58	111,93
	B-7	-34,76	116,629
B = ciclodextrinas 10 % (p/V) + Trehalosa 20 % (p/V)	B-8	-27,96	111,77
	B-9	-27,50	118,40
C = ciclodextrinas 10 % (p/V) + manitol 15 %	C-1	Tg ¹ : -36,8 Tg ² : - 28 Tg ³ : -14,8	n.d.
	C-2	-28,4	106,00

Ejemplo 5

Caracterización de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 liofilizada.

determinación de la viabilidad de la cepa

Para determinar el rendimiento y la viabilidad de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 después del proceso de liofilización de las soluciones A, B y C preparadas de acuerdo con el Ejemplo 3, las UFC de la cepa se determinaron antes y después del proceso de liofilización, mediante recuento en placa de Petri. La determinación se realizó en una cantidad de producto liofilizado correspondiente a 0,5 gramos, suspendido en 49,5 gramos de tampón de dilución (MRS®) y diluido como dilución en serie hasta alcanzar las útiles para el recuento. El producto diluido se depositó después en una placa de Petri que contenía 20 ml de medio de agar MRS®, previamente esterilizado en autoclave, y se incubó a 37 °C en anaerobiosis durante 72 horas.

La determinación se realizó en muchas preparaciones liofilizadas preparadas a partir de las soluciones A, B y C y los resultados se informan en la Tabla 11.

Tabla 11

Liofilización de LMG S-26420	Preparación	UFC/ml antes de la liofilización \pm SD	UFC/g después de la liofilización (T_0) \pm SD	Porcentaje de rendimiento (%) del proceso de liofilización
Solución A = ciclodextrinas 10 % (p/V)	A-1	$4,6 \pm 0,6 \times 10^{10}$	$5,6 \pm 0,4 \times 10^{10}$	$13,9 \pm 0,9$
	A-2	$4,0 \pm 0,5 \times 10^{10}$	$3,4 \pm 0,2 \times 10^{10}$	$16,6 \pm 1,1$
	A-3	$2,8 \pm 0,5 \times 10^{10}$	$3,3 \pm 0,5 \times 10^{10}$	$15,8 \pm 2,9$
B = ciclodextrinas 10 % (p/V) + Trehalosa 20 % (p/V)	B-1	$3,2 \pm 0,5 \times 10^{10}$	$2,9 \pm 0,7 \times 10^{10}$	$26,2 \pm 6,5$
	B-2	$4,4 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$3,3 \pm 0,3 \times 10^{10}$	$22,8 \pm 1,9$
	B-3	$3,3 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$6,3 \pm 0,3 \times 10^{10}$	$57 \pm 27,0$
	B-4	$2,2 \pm 0,8 \times 10^{10}$	$3,9 \pm 0,3 \times 10^{10}$	$45,1 \pm 2,7$
	B-5	$2,8 \pm 0,2 \times 10^{10}$	$4,6 \pm 0,9 \times 10^{10}$	$41,7 \pm 7,5$
	B-6	$3,6 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$3,7 \pm 0,5 \times 10^{10}$	$23,3 \pm 2,9$
	B-7	$3,1 \pm 0,9 \times 10^{10}$	$2,9 \pm 0,8 \times 10^{10}$	$21,9 \pm 6,0$
	B-8	$5,5 \pm 0,7 \times 10^{10}$	$1,4 \pm 0,8 \times 10^{10}$	$35,8 \pm 1,4$
	B-9	$4,3 \pm 0,9 \times 10^{10}$	$3,7 \pm 0,8 \times 10^{10}$	$22,6 \pm 2,1$
C = ciclodextrinas 10 % (p/V) + manitol 15 %	C-1	$7,3 \pm 2, \times 10^{10}$	$<1 \times 10^{10}$	$13,9 \pm 0,9$
	C-2	$3,6 \pm 0,5 \times 10^{10}$	$2,3 \pm 0,8 \times 10^{10}$	$9,56 \pm 4,0$

La Tabla 11 confirma el efecto de la trehalosa durante el proceso de liofilización, lo que conduce a una recuperación mayor que 30 % en UFC.

Se puede añadir manitol a la trehalosa si se desea una masa liofilizada más grande, en particular para dosis pequeñas de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420.

Ejemplo 6

Determinación de la actividad de agua y la pérdida de peso mediante secado de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 liofilizado.

a) Determinación de la actividad de agua (a_w)

La determinación de la actividad de agua corresponde a la determinación del agua libre en preparaciones liofilizadas de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 de las soluciones A, B y C preparadas siguiendo el Ejemplo 3. La determinación se realizó colocando una muestra de aproximadamente 1 gramo de cada producto liofilizado en un instrumento Aqualab VSA Decagon que mide la actividad de agua de una muestra con un detector dieléctrico de humedad, que proporciona directamente la medida que es directamente proporcional a los moles de agua sobre los moles de muestra y los valores obtenidos se informan en la Tabla 12.

Tabla 12

Componentes de liofilización de LMG S-26420	Preparación núm.	a_w (actividad de agua)
Solución A = ciclodextrinas 10 % (p/V)	A-1	n.d.
	A-2	n.d.
	A-3	0,358

5	B = ciclodextrinas 10 % (p/V) + Trehalosa 20 % (p/V)	B-1	n.d.
		B-2	n.d.
		B-3	0,363
		B-4	0,153
		B-5	0,100
10	B = ciclodextrinas 10 % (p/V) + Trehalosa 20 % (p/V)	B-6	0,120
		B-7	0,136
		B-8	0,166
		B-9	0,087
15	Solución C = ciclodextrinas 10 % (p/V) + manitol 15 % (p/V)	C-1	0,174
		C-2	0,134

20 Todos los liofilizados obtenidos tienen valores de a_w por debajo de 0,6 lo que confirma que pueden almacenarse durante largos períodos sin riesgos de degradación.

b) Determinación de la pérdida de contenido de agua (LOD)

25 El contenido de humedad de las muestras liofilizadas se obtuvo con el uso de una balanza térmica Mettler y los valores se informan en la Tabla 13.

Tabla 13

Componentes de liofilización de LMG S-26420	Preparación núm.	Porcentaje de humedad LOD (%)
Solución A = ciclodextrinas 10 % (p/V)	A-1	3,61
	A-2	2,58
	A-3	3,9
B = ciclodextrinas 10 % (p/V) + Trehalosa 20 % (p/V)	B-1	4,01
	B-2	4,24
B = ciclodextrinas 10 % (p/V) + Trehalosa 20 % (p/V)	B-3	4,90
	B-4	3,39
	B-5	2,94
	B-6	2,85
	B-7	3,05
	B-8	3,21
	B-9	2,41
Solución C = ciclodextrinas 10 % (p/V) + manitol 15 % (p/V)	C-1	2,14

Ejemplo 7

Determinación de la estabilidad de preparaciones liofilizadas de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420.

Las preparaciones liofilizadas de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 se colocaron a 4 °C y su estabilidad se determinó por medición de la carga bacteriana y la actividad de agua (a_w) (T0), a tiempo cero, 3 y 6 meses. Los resultados obtenidos se informan en la Tabla 14.

Tabla 14

Preparación	UFC/g±S D			Rendimiento % UFC T6/T0	a _w (actividad de agua) T0	a _w (actividad de agua) T6
	T0	T3	T6			
A-1	3,4±0,2x10 ¹⁰	1,3±0,2x10 ¹⁰	9,8±5,7x10 ⁴	<10 %		
A-2	3,5±0,6x10 ¹⁰	6,4±1,5x10 ⁹	<1,78x10 ²	<10 %		
A-3	2,9±0,7x10 ¹⁰	7,1±2,5x10 ⁹	-			
B-1	2,9±0,7x10 ¹⁰	7,1±2,5x10 ⁹	-			
B-2	3,3±0,3x10 ¹⁰	1,2±0,1x10 ¹⁰	-		0,153	0,276
B-3	6,3±0,2x10 ¹⁰	1,9±0,2x10 ¹⁰	1,8±0,1x10 ¹⁰	27,7±1,0	0,100	0,163
B-4	3,9±0,2x10 ¹⁰	2,3±0,6x10 ¹⁰	2,9±0,7x10 ¹⁰	75,0±19,2	0,120	0,313
B-5	4,6±0,9x10 ¹⁰	4,9±0,4x10 ¹⁰	-		0,136	0,279
B-6	3,7±0,5x10 ¹⁰	4,2±0,3x10 ¹⁰	5,0±0,6x10 ¹⁰	136,2±14,8	0,143	0,182
B-7	2,9±0,8x10 ¹⁰	1,9±0,3x10 ¹⁰	2,6±2,1x10 ¹⁰	91,1±17,9	0,087	-

La tabla muestra que los productos liofilizados obtenidos en presencia de trehalosa son estables a 4 °C durante 6 meses y que la actividad de agua (a_w) siempre está por debajo de 0,6.

Ejemplo 8

Composiciones que comprenden *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 en bolsitas

Las preparaciones en bolsitas comprenden una cantidad de producto liofilizado, preparado como en el Ejemplo 2 (preparaciones B), de 800 mg y 500 mg, que corresponden respectivamente a aproximadamente 3x10¹⁰ y 2x10¹⁰ células vivas de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420.

El producto liofilizado se mezcló con excipientes, se tamizó preventivamente y la mezcla homogénea se dividió en bolsitas. Las composiciones unitarias se informan en la Tabla 15.

Entre las composiciones descritas, una comprende inulina, otra comprende xilooligosacárido y las otras una mezcla de fructooligosacáridos formados por una cadena de moléculas de fructosa unidas a una molécula de glucosa (Actilight 950P).

Tabla 15

Componente	Comp. 1 peso	Comp. 2 peso (mg)	Comp. 3 peso	Comp. 4 peso (mg)
<i>Lactobacillus paracasei</i> liofilizado LMG S-26420	800	800	500	500
Inulina	3200			
Xilooligosacárido		3200	506	506
Sabor (fruta de la pasión)			44	44
Sílice			10	10
Astaxantina				160
Actilight 950P			2940	1720
Peso total	4000	4000	4000	4000

Las composiciones pueden comprender vitaminas, como por ejemplo vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B16.

Las composiciones en bolsitas pueden suspenderse en soluciones acuosas o en alimentos semisólidos.

Ejemplo 9

Composiciones que comprenden *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 en tabletas

Las preparaciones en tabletas que contienen una cantidad de 250 mg de producto liofilizado, que corresponde a aproximadamente 1x10¹⁰ células vivas de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420, se obtuvieron mediante la mezcla de un liofilizado con excipientes tamizados preventivamente en una malla de 800 micras. La mezcla se comprimió después en

ES 2 788 636 T3

una máquina de compresión Ronchi o una máquina análoga mediante la aplicación de una fuerza de compresión de aproximadamente 13 KN.

La composición unitaria de las tabletas se informa en la Tabla 16.

Tabla 16

Componentes	Cantidad (mg)
<i>Lactobacillus paracasei</i> LMG S-26420	250 (1x10 ¹⁰ UFC)
Isomalto	278,0
Croscarmelosa	9,9
Talco	5,5
Sílice	3,8
Estearato de magnesio	2,8
Peso total	550

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa bacteriana perteneciente a la especie *Lactobacillus paracasei* depositada en la Colección Coordinada de Microorganismos-Colección de bacterias BCCM/LMG, Laboratorio de microbiología – Universidad de Gante, con el número LMG S-26420, en donde la cepa bacteriana se caracteriza porque convierte el ácido linoleico en ácido linoleico conjugado en un porcentaje mayor que 30 %.
- 10 2. La cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque convierte el ácido linoleico en los isómeros con actividad biológica de ácido linoleico conjugado *c9-t11* y *t9-t11*, en donde su suma está en un porcentaje mayor que 30 % en comparación con los otros isómeros.
- 15 3. Un proceso para la producción de un cultivo madre de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 de la reivindicación 1 caracterizado por las siguientes etapas:
 - inocular la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 en un porcentaje volumétrico de 0,1 % a 10 %, en un medio de cultivo adecuado a una temperatura de 30 °C a 37 °C a valores de pH entre 4,5 y 7,5 durante un tiempo de 6 a 15 horas;
 - separar la masa bacteriana del caldo de cultivo por centrifugación;
 - 20 - almacenar la masa bacteriana a una temperatura por debajo de 0 °C, o liofilizar la masa bacteriana, para obtener así un cultivo madre de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420.
- 25 4. El proceso para la producción del cultivo de la cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende la etapa de liofilización en presencia de crioprotectores seleccionados entre carbohidratos solubles.
- 30 5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde un cultivo liofilizado de la cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 se produce en presencia de trehalosa.
- 35 6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde se obtiene un cultivo de la cepa de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 con un número de unidades formadoras de colonias mayor que 10^9 por mililitro de cultivo y la biomasa en una cantidad mayor que 4 gramos por litro de cultivo.
- 40 7. Una composición nutricional o alimenticia o farmacéutica que comprende una cantidad de células vivas de la cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 de 1×10^8 a 5×10^{11} , junto con excipientes aceptables en forma de tabletas, gránulos para bolsitas, cápsulas o suspensiones líquidas.
- 45 8. La composición nutricional o alimenticia o farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende prebióticos, vitaminas, sales minerales.
- 50 9. La composición nutricional o alimenticia o farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en donde los prebióticos se seleccionan del grupo que comprende fructooligosacáridos, inulinas, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos, isomaltooligosacáridos y las vitaminas seleccionadas en el grupo que comprende las vitaminas E y B.
- 55 10. Una composición nutricional o alimentaria o farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además bifidobacterias.
11. Una composición nutricional o alimentaria o farmacéutica que comprende la cepa bacteriana de *Lactobacillus paracasei* LMG S-26420 para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias, patologías inflamatorias intestinales, en la prevención de tumores, en enfermedades autoinmunitarias, diabetes y aterosclerosis.
12. La composición nutricional, alimentaria o farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además lactobacilos perteneciente a diferentes cepas y/o bifidobacterias.
13. La composición nutricional o alimenticia o farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la disbiosis bacteriana.