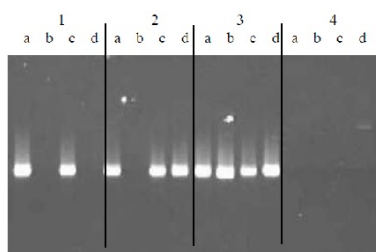


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE - NACIONAL

Figura 1



1	Tipo de solicitud	☒ Patente de invención ☐ Patente de modelo de utilidad	
2	Título de la invención	3	CIP Clasificación Internacional de Patentes
MÉTODO PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ÁCIDO DE CIERTAS BACTERIAS LÁCTICAS Y EL USO DE DICHAS BACTERIAS.		Nombre	Código
4	Datos del Solicitante / Titular		
Nombre:		BIOGAIA AB	Dirección Electrónica: patents@brlatina.com
Dirección:		P.O. Box 3242, SE-103 64 Stockholm	Domicilio/País de constitución: SUECIA - ESTOCOLMO - ESTOCOLMO
Identificación:			

☐ CEDULA DE CIUDADANIA
☒ EMPRESA EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ NIT

Número:

979748-

5

Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social

Tipo

Identificación

1. BIOGAIA AB EE 979748

6

Datos del Inventor

Nombre:

Eamon Connolly

**Dirección
Electrónica:**

patents@brlatina.com

Dirección:

P.O. Box 3242, SE-
103 64 Stockholm

**Domicilio/País de
constitución:**

SUECIA - ESTOCOLMO -
ESTOCOLMO

Identificación:

☐ CEDULA DE
CIUDADANIA
☐ EMPRESA
EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE
EXTRANJERIA
☐ NIT
☒ No Aplica

Número:

-

7

Inventor(es)

Apellidos - Nombres

Domicilio

1. Connolly Eamon SUECIA

8

Datos Inventor(es)

País de Residencia

Departamento/Estado

Ciudad

Dirección

1. SUECIA ESTOCOLMO ESTOCOLMO P.O. Box 3242,
SE-103 64
Stockholm

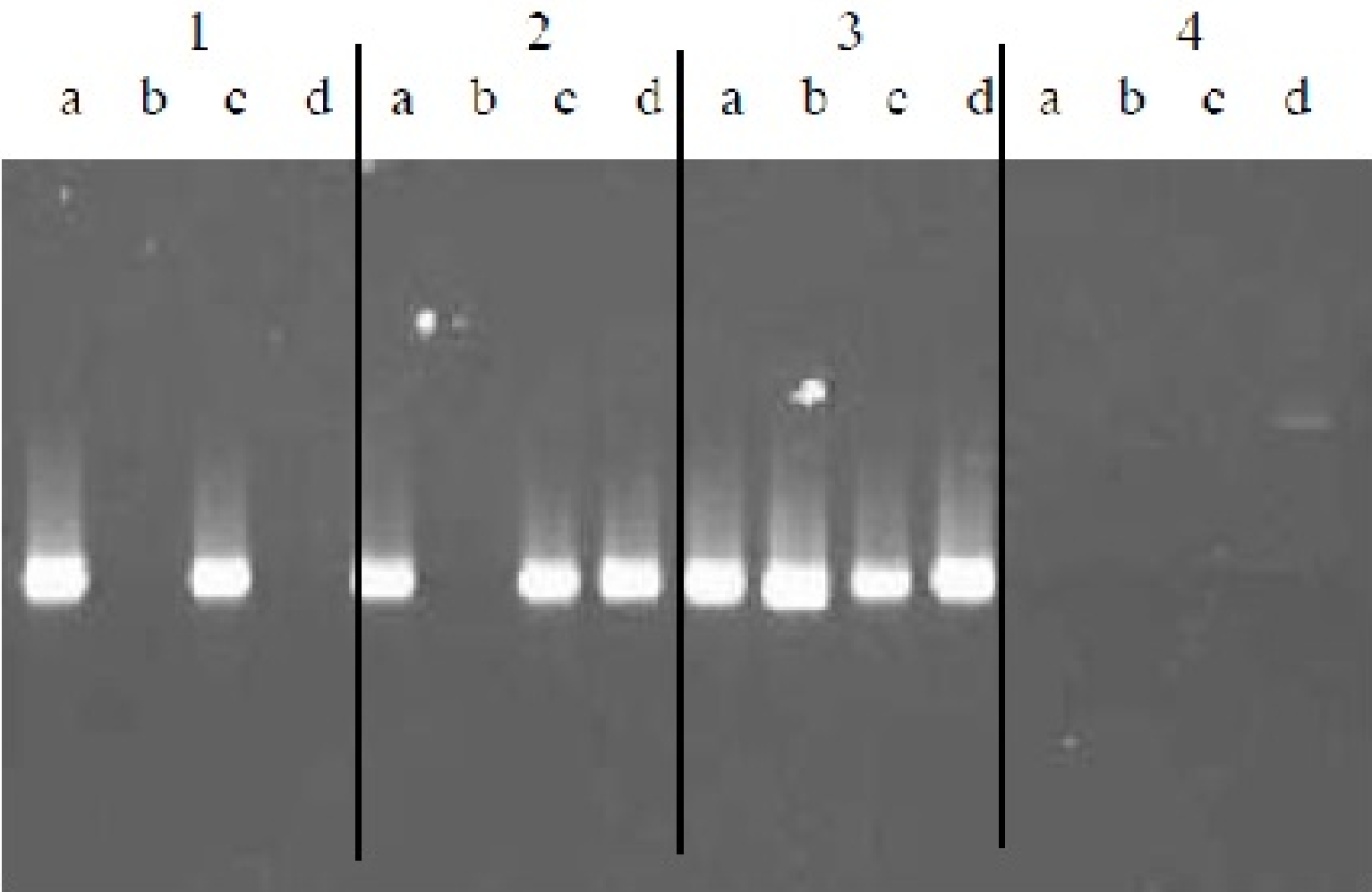
9

Datos del Representante Legal / Apoderado

Nombre:	HASBLEYDI CALVO ROJAS	Dirección Electrónica:	patents@brlatina.com
Dirección:	patents@brlatina.com	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 53123537-			
Presentación de Poder			
Año de Radicación			
Número de Radicación			
10	Declaraciones de prioridad	☐ SI ☒ NO	
1	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud
2			(32) Fecha _
3			
11	Declaración sobre uso de recursos genéticos o biológicos		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o numero de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	Declaración sobre uso de conocimientos tradicionales		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o numero de registro.			
13	Para publicar a partir de la fecha de publicación o de la prioridad invocada		
Si es Patente de Invención		Si es Patente de Modelo de Utilidad	

☐ 6 Meses ☐ 12 Meses ☐ 18 Meses ☒ Otro Cual: 0 Meses		☐ 6 Meses ☐ 12 Meses ☐ Otro Cual:	
14	Reivindicaciones		
Número reivindicaciones:		3	Pago Reivindicaciones: No
15	Reducción de tasas.		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
16	Documentos Anexos		
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Deposito Materia Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☐ Listado de secuencias ☒ Artes finales 12 x 12 cm ☐ Certificado con descuento ☒ Poderes, si fuere el caso ☐ Documento que legalmente pruebe la Cesión del inventor al solicitante o a su causante ☒ Otros anexos			

Figura 1



TÍTULO: MÉTODO PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ÁCIDO DE CIERTAS BACTERIAS LÁCTICAS Y EL USO DE DICHAS BACTERIAS.

CAMPO DE LA INVENCION

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En 1908, el biólogo ruso Eli Metchnikoff atribuyó la larga vida de ciertos ciudadanos búlgaros y rusos al consumo de grandes cantidades de productos lácteos fermentados. El organismo principal en estos alimentos fue identificado más tarde como *Lactobacillus acidophilus*, bacterias productoras de ácido láctico. Las bacterias productoras de ácido láctico son llamadas así por su capacidad de producir lactato. Sin embargo, la producción de lactato es sólo uno de muchos beneficios derivados de este conjunto de bacterias.

Basado en el trabajo de Metchnikoff y otros, científicos desarrollaron la idea de microorganismos probióticos, alimentando directamente con bacterias productoras de ácido láctico y levadura a animales para mejorar su salud y su rendimiento. Los beneficios observados pueden resultar de: 1) competencia por sitios de fijación en el tracto digestivo, 2) competencia por nutrientes esenciales, 3) producción de sustancias antimicrobianas, 4) aumento del crecimiento de bacterias beneficiosas y 5) estimulación del sistema inmune.

Algunas bacterias causantes de enfermedades reducen la capacidad del animal para absorber los nutrientes interrumpiendo el revestimiento del intestino delgado. Los estudios indican que las bacterias productoras de ácido láctico se adhieren al intestino y producen sustancias para evitar que organismos causantes de enfermedades se unan a la pared intestinal. Además, la adherencia de bacterias beneficiosas puede aumentar la superficie absorbente del intestino y mejorar la actividad enzimática para una mayor absorción de nutrientes por parte del animal.

Las bacterias, tanto promotoras de la salud como causantes de enfermedad, requieren de ciertos nutrientes para el crecimiento. Las bacterias productoras de ácido láctico pueden utilizar vitaminas, aminoácidos y otros nutrientes que de lo contrario podrían apoyar el crecimiento de bacterias dañinas.

Una considerable investigación se ha centrado en la capacidad de cultivos microbianos alimentados directamente para producir sustancias que inhiben a los organismos causantes de enfermedades. Los ácidos láctico, acético y fórmico bajan el pH intestinal para crear un ambiente adecuado para los organismos nocivos. Las bacterias productoras de ácido láctico también secretan peróxido de hidrógeno, lo que resulta en condiciones desfavorables para los microorganismos que requieren oxígeno.

Dos grupos de sustancias antimicrobianas han sido identificados, sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular, por ejemplo reuterina, producida por *L. reuteri*; y bacteriocinas. Las bacteriocinas son sustancias microbianas que inhiben el crecimiento de bacterias que con frecuencia están genéticamente relacionadas. Las bacteriocinas son polipéptidos y sus propiedades inhibitorias son destruidas por las proteasas mientras que la reuterina, una sustancia antimicrobiana de amplio espectro, no es un polipéptido y su actividad antimicrobiana no se ve afectada por las proteasas.

Las cepas de una amplia variedad de *Lactobacillus*, incluyendo *L. reuteri*, han sido utilizadas en formulaciones probióticas. *Lactobacillus reuteri* es uno de los habitantes naturales del tracto gastrointestinal de animales y habitualmente se encuentra en los intestinos de los animales sanos, incluyendo a los seres humanos. Se sabe que tienen actividad antimicrobiana. Ver, por ejemplo, la patente de EE.UU N° 5.439.678, 5.458.875, 5.534.253, 5.837.238 y 5.849.289. Cuando se cultivan células *L. reuteri* bajo condiciones anaeróbicas en presencia de glicerol, ellas producen la sustancia antimicrobiana conocida como β -hidroxi-propionaldehído (3-HPA).

La investigación ha documentado la capacidad de las bacterias productoras de ácido láctico de inhibir *E. Coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*. La reducción de organismos causantes de diarrea es especialmente importante en los animales jóvenes y recién nacidos.

Las modificaciones genéticas a cepas de *Lactobacillus* normalmente están dirigidas hacia la mejora o el aumento de características específicas de la cepa, tales como la producción de compuestos antagónicos a los patógenos de alimentos comunes, capacidad de metabolizar el colesterol o para tolerar el ácido o bilis y la capacidad de mejorar la respuesta inmune (Kullen, M. J. y T. R. Klaenhammer. 1999. Modificación genética de los lactobacilos intestinales y bifidobacterias, p. 65-83. En G. Tannock (ed.), Probióticos: una revisión crítica, Horizon Scientific Press, Wymondham, Reino Unido). Bajo condiciones ideales, estas cepas modificadas beneficiarían al huésped. Sin embargo, bajo condiciones naturales, el rendimiento de las cepas modificadas de *Lactobacillus* es frecuentemente afectado por plásmidos nativos, especialmente en los casos en que las manipulaciones son mediadas por plásmidos. La incompatibilidad entre los plásmidos nativos y los plásmidos introducidos es uno de los principales factores que contribuyen a la inestabilidad del plásmido dentro de un huésped (Posno, M., R.J. Leer, N. van Luijk, M.J.f. van Giezen, P.T.H.M. B. C. Lokman y P.H. Pouwels. 1991. La incompatibilidad de los vectores de

Lactobacillus con replicones derivados de pequeños plásmidos crípticos de *Lactobacillus* e inestabilidad segregacional de los vectores introducidos. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1822-1828).

La mayoría de las cepas de *Lactobacillus*, independiente de su origen (plantas, carne, ensilaje, masa fermentada o tracto gastrointestinal), albergan por lo menos un plásmido nativo y a menudo más (Pouwels, H. P. y R. J. Leer. 1993. La genética de lactobacilos: plásmidos y expresión génica. Antonie van Leeuwenhoek 64, 85-107). Estos plásmidos no sólo pueden interferir con la estabilidad del plásmido recombinante, sino también pueden albergar características indeseables, por ejemplo, resistencia a los antibióticos (Posno et al., 1991) por lo que puede ser ventajoso o incluso necesario eliminar cualquiera de dichos plásmidos nativos.

Muchos antibióticos y sustancias antimicrobianas naturalmente han estado presentes en la naturaleza durante millones de años y el hombre ha utilizado antibióticos y antimicrobianos para inhibir el crecimiento de bacterias u otros microbios y para tratar las infecciones bacterianas o microbianas en seres humanos, otros animales y en cultivo de tejidos. Sin embargo, el uso de antibióticos o antimicrobianos tiene el efecto indeseable de la selección de bacterias u otros microbios que son resistentes a los antibióticos o antimicrobianos que son administrados o aplicados. Como resultado, los regímenes de tratamiento pueden verse afectados negativamente, o en algunos casos vuelven ineficaces.

Se ha informado recientemente que *L. reuteri* ATCC 55730 es resistente a lincomicina y también que contiene la gen de resistencia *genelnuA* (Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C. & Meile, L. 2006. Los patrones de susceptibilidad a antibióticos y genes de resistencia de cultivos lácticos y bacterias probióticas utilizadas en los alimentos. Syst Appl Microbiol. 29(2):145-155). Se buscó en el genoma de la cepa este gen y fue identificado como el marco abierto de lectura *lr2105* en el plásmido *pLR585*. El plásmido también alberga los genes que codifican una proteína de resistencia a múltiples fármacos (*lr2089*) y un exportador de antibióticos policétidos (*lr2096* y *lr2097*). Ninguno de los genes en el plásmido tiene alguna conexión obvia o relevancia de importancia para las características probióticas conocidas o para la tolerancia al ácido de la cepa.

Hay una necesidad, especialmente en la industria probiótica, de utilizar lactobacilos que toleran bien los ácidos con el fin de que dichos cultivos de numerosas formulaciones no sólo pasen por el ambiente ácido del estómago para alcanzar el resto del intestino en un número suficiente, sino también para poder crecer y colonizar el estómago, con el fin de

poder ejercer su efecto probiótico a lo largo del tracto gastrointestinal. Cuando se utilizan cepas que toleran mal el ácido, es necesario ingerir un número mayor de bacterias lo que conduce a un mayor costo. Además, un gran esfuerzo se dirige hacia la protección de los cultivos de pH ácido por diversos medios, que también aumenta el costo. Por lo tanto, hay un interés en la industria en tener cepas que toleren bien ácidos y por consiguiente en los métodos que mejorarán la tolerancia al ácido de las cepas existentes. Un ejemplo de un método para mejorar la tolerancia al ácido de bacterias lácticas se da en la solicitud de patente US20050158423 A1, donde se utilizan cepas con plásmidos que codifican para proteínas pequeñas de choque térmico, y en donde también se dan métodos para transferir dichos plásmidos a una bacteria láctica. Esto es sin embargo, en contraste con la presente invención en donde se elimina un plásmido para aumentar la tolerancia al ácido de la cepa.

Otros objetos y características de las invenciones serán más evidentes a través de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Muestra la detección de plásmidos con PCR. Los números representan: 1, *L. reuteri* DSM 17938; 2, *L. reuteri* DSM 17686; 3, *L. reuteri* ATCC 55730; y 4, *L. reuteri* DSM 20016 (control negativo). Los plásmidos analizados son: a, pLR580; b, pLR581; c, pLR584; y d, pLR585.

Figura 2. Muestra la detección del gen de resistencia *genelnuA*. 1, DSM 17938; 2, DSM 17686; 3, ATCC 55730; 4, DSM 20016

Figura 3. Tolerancia al ácido de ATCC 55730 (izquierda), DSM 17686 (centro) y DSM 17938 (derecha) en barras. Las columnas muestran la proporción de bacterias sobrevivientes (promedio de cuatro repeticiones). Las barras de error indican la desviación estándar, una estrella un p-valor < 0.05 y tres estrellas p < 0.001.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se obtuvo una cepa derivada de *L. reuteri* ATCC 55730 mediante la eliminación de los plasmidios pLR581 y pLR585. Esta cepa es mucho más sensible a la tetraciclina y lincomicina que la cepa parental. La cepa con los dos plásmidos eliminados ha sido depositada en DSMZ y ha sido designada como *L. reuteri* DSM 17938. *L. reuteri* DSM 17938 tiene el mismo perfil rep-PCR (PCR repetitivo), patrón de fermentación, producción de reuterina, morfología, tasa de crecimiento, adherencia a la mucosa y tolerancia a la bilis

que *L. reuteri* ATCC 55730. Sin embargo, la cepa sin plásmidos crece a una mayor densidad y sobrevive mejor en condiciones ácidas. Cuando las cepas se co-cultivan, DSM 17938 también es más competitiva.

Así, la presente invención hace uso de las características de la nueva cepa y proporciona ciertas cepas sin plásmidos de bacterias lácticas modificadas de tal modo que exhiben una mejor tolerancia al ácido, un método de modificación de estas cepas y productos que contengan estas cepas. Otros objetos y características de las invenciones serán más evidentes a través de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION Y FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS DE LA MISMA

La cepa *L. reuteri* DSM 17938 (depositada en DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) el 6 de Febrero del 2006, bajo el tratado de Budapest) es derivada de *L. reuteri* ATCC 55730 a través de la eliminación de dos plásmidos, pLR581 y pLR585. Tiene el mismo perfil de rep-PCR, patrón de fermentación, producción de reuterina, morfología, tasa de crecimiento, adherencia a la mucosa y la tolerancia a la bilis que ATCC 55730 pero es mucho más sensible a la tetraciclina y lincomicina comparado a la cepa parental. Sorprendentemente, se ha encontrado que *L. reuteri* DSM 17938 y DSM 17686 producen un aumento de la tolerancia al ácido debido a una eliminación de plásmido a través de un proceso llamado curación. Es más competitivo en los experimentos de co-cultivo, lo que puede ser explicado por una mejor supervivencia en pH ácido.

Un objetivo de esta invención es quitar un plásmido de una bacteria láctica para hacerla más tolerante a los ácidos, de tal manera de sobrevivir mejor en el intestino, y por lo tanto ser más beneficiosa para la salud humana. Esto ha sido demostrado en la cepa *L. reuteri* DSM 17686 y en la nueva cepa *L. reuteri* DSM 17938. Esto parece ser un fenómeno general y previamente desconocido en donde la eliminación de un plásmido en lactobacilos, que no codifica para algo relacionado con la tolerancia al ácido, dará una nueva cepa que es más resistente a los ácidos. Este efecto se ha utilizado en la presente invención para hacer los lactobacilos más tolerantes al ácido.

Otros objetos y características de las invenciones serán más evidentes a través de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1

Eliminación de pLR585 desde DSM 17686

La eliminación del plásmido por la formación de protoplastos y regeneración, se realizó esencialmente como se describe en Vescovo *et al.* (Vescovo, M., Morelli, L., Cocconcelli, P.S. y Bottazzi, V. 1984. Formación de protoplastos, regeneración y eliminación del plásmido en *Lactobacillus reuteri*. FEMS Microbiol Lett 23:333-334). Un cultivo de una noche de *Lactobacillus reuteri* DSM 17686 se diluyó hasta una DO600 = 0,1 en un cultivo de 10 ml de MRS (Oxoid, Lenexa, KS, Estados Unidos) y se creció a 37° C hasta una DO600 = 0.7-0.8. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 3000xg durante 10 minutos y lavadas con 10 ml de agua Nanopure. Las células fueron nuevamente recolectadas por centrifugación y resuspendidas en 2 ml de buffer de protoplastos (buffer fosfato 0,2 M, sacarosa 0,5 M, MgCl₂ 20 mM; pH 7.0). Las células se mezclaron con un volumen igual de 10 mg ml⁻¹ de lisozima en un buffer de protoplastos y se incubó a 37° C durante 1 hora. Los protoplastos fueron recolectados por centrifugación a 3000xg durante 15 minutos y lavados con 20 ml de buffer de protoplastos. Los protoplastos fueron recolectados nuevamente por centrifugación y resuspendidos en 1 ml de buffer de protoplastos después de lo cual se realizó una observación microscópica.

Las diluciones en buffer de protoplastos fueron plaqueadas en agar MRS con sacarosa 0.5 M para la regeneración. Las diluciones en agua Nanopure fueron plaqueadas en agar MRS para evaluar el número de células restante. Se determinó el número de ufc después de una incubación anaeróbica durante una noche a 37° C y nuevamente después de una incubación durante una noche más. Las colonias regeneradas se pusieron en agar MRS con y sin 8 µg ml⁻¹ de lincomicina. Los plásmidos candidatos a ser eliminados fueron identificados mediante la ausencia de crecimiento en las placas de MRS con lincomicina.

Resultado:

Confirmación de la eliminación de pLR585

Los plásmidos de DSM 17938 se analizaron mediante PCR (Fig. 1). Tanto pLR585 como pLR581 no se encontraron, mientras que los otros dos plásmidos todavía estaban presentes. Por lo tanto, se han eliminado de DSM 17938 los plásmidos tetW pLR581 y lnuA pLR585. La ausencia de lnuA en DSM 17938 también fue detectada por PCR (Fig. 2).

EJEMPLO 2

Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas de lincomicina

Las bacterias fueron cultivadas en caldo MRS por 16 h a 37° C. Después de la dilución a 105 cfu ml⁻¹, 1 µl de cada cepa bacteriana fue visto en placas de MRS con lincomicina o clindamicina (concentraciones de 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µg ml⁻¹). Después de la adsorción de las gotas, las placas se incubaron en una atmósfera anaeróbica a 37° C durante 24 h. La CMI se definió como la menor concentración de antibiótico para que no existiera ningún crecimiento bacteriano visible. Las CMIs de tetraciclina fueron probadas con Etest (AB Biodisk) sobre bacterias creciendo en placas de agar MRS (Oxoid), según las instrucciones del fabricante.

Resultado:

La eliminación de pLR585 dio lugar a una disminución de la CMI desde >16 a 0.25 µg ml⁻¹ de lincomicina, cercano al nivel del control negativo DSM 20016. El valor de la CMI ya muy bajo para la clindamicina no cambió. Las CMIs de tetraciclina también se probaron con E-test y se encontró que eran 12-16 µg ml⁻¹ para DSM 17938 y DSM 17686 y > 256 µg ml⁻¹ para ATCC 55730.

Tabla 1

Cepa	DSM 17938	DSM 17686	ATCC 55730	DSM 20016	1063
CMI de Lincomicina (µg ml ⁻¹)	0.5	> 16	> 16	0.25	> 16
CMI de Clindamicina (µg ml ⁻¹)	< 0.125	< 0.125	< 0.125	< 0.125	> 16

EJEMPLO 3

Patrón de fermentación y producción de reuterina

Los patrones de fermentación se determinaron utilizando api 50 CHL (bio-Mérieux) según las instrucciones del fabricante. Para detectar la producción de reuterina, las bacterias se cultivaron primero durante 48 h en placas de MRS (inoculadas en forma de líneas). Las placas fueron entonces cubiertas con agar de glicerol 500 mM (agar al 1%) y se incubaron a 37° C durante 30 min. La reuterina fue detectada por la adición de 5 ml de 2, 4-dinitrofenilhidrazina (0.1% de ácido clorhídrico 2 M). Después de una incubación de 3 min, se vertió la solución y se agregaron 5 ml de KOH 5 M. Las zonas rojas alrededor de las colonias muestran que se ha producido reuterina.

Resultado:

El patrón de fermentación de DSM 17938 se comparó con DSM 17686 y ATCC 55730 usando API 50 CHL y no se detectaron diferencias. Todas las cepas fermentaron l-arabinosa, ribosa, galactosa, glucosa, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, rafinosa y gluconato y resultaron negativas para el resto de las pruebas. También, la producción de reuterina fue de la misma magnitud para las tres cepas.

EJEMPLO 4

Crecimiento y co-cultivo

El crecimiento se detectó a través de la inoculación de un cultivo de una noche a una DO de 0.1 en caldo MRS y en tubos precalentados a 37° C. Los tubos se incubaron a 37° C y se tomaron muestras para la medición de DO₆₀₀ nm durante 8 h. Cada bacteria se analizó por triplicado. El co-cultivo de las bacterias se realizó mediante la mezcla en cantidades iguales de cultivos de una noche de ATCC 5730, DSM 17686 y DSM 17938 en tubos precalentados de caldo MRS. La mezcla se incubó a 37° C durante la noche y luego se re-inoculó a un nuevo tubo de MRS. Este procedimiento se repitió tres veces. Al principio y final de cada cultivo se analizaron muestras a través del cultivo en distintas placas de MRS de diferentes diluciones del cultivo y luego escogiendo y creciendo colonias en tres placas de MRS; una sin antibióticos, una conteniendo 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de lincomicina y una conteniendo 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de tetraciclina. Las colonias que crecieron solamente en MRS se consideraron DSM 17938, aquellas que crecieron en MRS con lincomicina se consideraron DSM 17686, y aquellas que crecieron en las tres placas se consideraron ATCC 55730.

Resultado:

El crecimiento de las cepas DSM 17938 y DSM 17686 se comparó con ATCC 55730. No se pudo detectar diferencias en el tiempo de generación, sin embargo, ambas cepas sin plásmidos crecieron a una densidad significativamente mayor que ATCC 55730. Las DOs finales fueron: para ATCC 55730, 4.78 ± 0.13 ; para DSM 17686, 5.89 ± 0.28 ; y para DSM 17938, 6.00 ± 0.26 . Las tres cepas también han sido co-cultivadas en caldo MRS por aproximadamente 30 generaciones (3 re-inoculaciones). Los resultados muestran claramente que las cepas sin plásmidos tienen una ventaja cuando se crecen in vitro. Se inocularon cantidades iguales de las cepas en conjunto, pero al final del experimento la mezcla consistió de 56% de DSM 17938, 38% de DSM 17686 y sólo un 6% de ATCC

55730.

La razón de esto puede ser que las cepas sin plásmidos crecen a una DO superior o posiblemente debido a que sobreviven de una mejor forma en fase estacionaria. La pérdida de dos plásmidos podría también haber dado lugar a una disminución de la carga (menos ADN a replicar) y por lo tanto una mayor capacidad competitiva.

EJEMPLO 5

Adherencia a la mucosa

Se utilizó mucosa del intestino delgado de cerdo. La mucosa y la ASB fueron disueltas y diluidas en PBS e inmovilizadas en pocillos de microtitulación (Greiner) a través de la incubación de 100 μ l de la solución durante 3 h a temperatura ambiente con rotación lenta. Las concentraciones finales fueron de DO280 0.1 para la mucosa y 100 μ g ml^{-1} para la ASB. Los pocillos fueron bloqueados con 0,2 ml de PBS suplementado con 1% de Tween 20 por 1 h y luego se lavaron con PBS con 0,05% Tween 20 (PBST). Las bacterias fueron cultivadas en caldo MRS durante 16 horas a 37° C, lavadas una vez en PBST y diluidas a una DO600 0.5 en el mismo buffer. Los pocillos fueron lavados posteriormente con PBST y el grado de unión fue examinado con un microscopio invertido. Todas las bacterias se analizaron por triplicado.

Resultado:

La capacidad de adherencia a la mucosa de las cepas DSM 17938 y DSM 17686 se comparó con la de ATCC 55730. No se pudo detectar ninguna diferencia en la adherencia.

EJEMPLO 6

Tolerancia al ácido

Con el fin de comprobar la sobrevivencia a un pH bajo, las cepas de *L. reuteri* ATCC 55730, DSM 17686 y DSM 17938 se crecieron durante una noche a 37° C en MRS. 5 μ l de las bacterias se añadieron a 10 ml de MRS precalentado, y se incubaron a 37° C hasta que se alcanzó una DO600 de 1.0. Luego se añadieron 800 μ l de un cultivo con una DO 1.0 a 8 ml de jugo gástrico sintético (8.3 g l^{-1} proteasa-peptona (Oxoid), 3.5 g l^{-1} glucosa, 2.05 g l^{-1} NaCl, 0.6 g l^{-1} KH_2PO_4 , 0.11 g l^{-1} CaCl_2 , 0.37 g l^{-1} KCl, ajustado a un pH de 2.0 con HCl), una modificación de Cotter *et al.* careciendo enzimas (Cotter, PD, Gahan, CG & Hill, C. 2001. Un sistema de glutamato descarboxilasa protege a *Listeria monocytogenes* en el fluido gástrico. Mol Microbiol 40: 465-475).

Los tubos se incubaron a 37° C y se tomaron muestras después de 1, 20, 50 y 90 minutos. Las muestras fueron diluidas en PBS y propagadas en placas con MRS, que se incubaron anaeróbicamente durante 24 horas a 37° C. El experimento se repitió en dos ocasiones y se analizaron muestras en duplicado cada vez. La diferencia entre las cepas fue comprobada estadísticamente con la prueba de t de Student.

Resultado:

Las tres cepas se cultivaron a una DO600 1.0 (entre mediados y fines de la fase exponencial) y posteriormente desafiadas con un pH ácido. Tanto DSM 17938 y DSM 17686 sobrevivieron mejor que ATCC 55730 después de la incubación de 50 min a pH 2.0, con tasas de supervivencia de 41, 28 y 20%, respectivamente (Fig. 3). Las diferencias fueron significativas con valores de p iguales a 0.0006 (DSM 17938 vs ATCC 55730) y 0.04 (DSM 17686 vs ATCC 55730). Se desconoce la razón de esto. Una mejor supervivencia a un pH ácido podría ser la explicación de por qué las cepas sin plásmidos fueron más competitivas en los experimentos de co-cultivo.

EJEMPLO 7

Tolerancia a la bilis

Las bacterias se cultivaron durante 16 horas en caldo MRS a 37° C. Las suspensiones bacterianas se diluyeron en PBS a aproximadamente 103–106 ufc ml⁻¹. 10 µl de cada dilución se dejaron caer sobre placas de MRS con diferentes concentraciones de bilis bovina (0, 0.5, 1, 2, 4 y 6%; Sigma B3883). Se analizaron dos repeticiones de cada bacteria. Las placas fueron incubadas durante 72 h a 37° C en una atmósfera anaeróbica. Se contaron las colonias y se estimó la tolerancia a la bilis mediante la comparación del número de colonias en las placas de MRS con bilis en comparación con las placas sin bilis. También se analizaron bacterias en fase exponencial (DO 0.5) de la misma manera.

Resultado:

Las tolerancias de las cepas sin plásmidos DSM 17938 y DSM 17686 a bilis bovina fueron comparadas con ATCC 55730. Las bacterias se analizaron en las fases estacionaria y exponencial del crecimiento (DO600 0.5). Las cepas toleran bien la bilis cuando están en fase estacionaria, pero la supervivencia y el crecimiento fueron mucho menores en la fase exponencial. Sin embargo, ninguna diferencia en la tolerancia pudo ser detectada entre las

cepas.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a formas de realización específicas, se tendrá en cuenta que numerosas formas de realización, modificaciones y variaciones son posibles, y en consecuencia, todas estas variaciones, modificaciones y formas de realización deben considerarse dentro del espíritu y el alcance de la invención.

LAS REIVINDICACIONES

1. Un cultivo biológicamente puro de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
2. Un método para aumentar la tolerancia al ácido de una cepa de *Lactobacillus* que incluye la eliminación de un plásmido de la cepa de *Lactobacillus*.
3. El método para aumentar la tolerancia al ácido de una cepa de *Lactobacillus* de la reivindicación 2, en la que la cepa de *Lactobacillus* es una cepa de *Lactobacillus reuteri*.

TÍTULO: MÉTODO PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ÁCIDO DE CIERTAS BACTERIAS LÁCTICAS Y EL USO DE DICHAS BACTERIAS.

CAMPO DE LA INVENCION

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En 1908, el biólogo ruso Eli Metchnikoff atribuyó la larga vida de ciertos ciudadanos búlgaros y rusos al consumo de grandes cantidades de productos lácteos fermentados. El organismo principal en estos alimentos fue identificado más tarde como *Lactobacillus acidophilus*, bacterias productoras de ácido láctico. Las bacterias productoras de ácido láctico son llamadas así por su capacidad de producir lactato. Sin embargo, la producción de lactato es sólo uno de muchos beneficios derivados de este conjunto de bacterias.

Basado en el trabajo de Metchnikoff y otros, científicos desarrollaron la idea de microorganismos probióticos, alimentando directamente con bacterias productoras de ácido láctico y levadura a animales para mejorar su salud y su rendimiento. Los beneficios observados pueden resultar de: 1) competencia por sitios de fijación en el tracto digestivo, 2) competencia por nutrientes esenciales, 3) producción de sustancias antimicrobianas, 4) aumento del crecimiento de bacterias beneficiosas y 5) estimulación del sistema inmune.

Algunas bacterias causantes de enfermedades reducen la capacidad del animal para absorber los nutrientes interrumpiendo el revestimiento del intestino delgado. Los estudios indican que las bacterias productoras de ácido láctico se adhieren al intestino y producen sustancias para evitar que organismos causantes de enfermedades se unan a la pared intestinal. Además, la adherencia de bacterias beneficiosas puede aumentar la superficie absorbente del intestino y mejorar la actividad enzimática para una mayor absorción de nutrientes por parte del animal.

Las bacterias, tanto promotoras de la salud como causantes de enfermedad, requieren de ciertos nutrientes para el crecimiento. Las bacterias productoras de ácido láctico pueden utilizar vitaminas, aminoácidos y otros nutrientes que de lo contrario podrían apoyar el crecimiento de bacterias dañinas.

Una considerable investigación se ha centrado en la capacidad de cultivos microbianos alimentados directamente para producir sustancias que inhiben a los organismos causantes de enfermedades. Los ácidos láctico, acético y fórmico bajan el pH intestinal para crear un ambiente adecuado para los organismos nocivos. Las bacterias productoras de ácido láctico también secretan peróxido de hidrógeno, lo que resulta en condiciones desfavorables para los microorganismos que requieren oxígeno.

Dos grupos de sustancias antimicrobianas han sido identificados, sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular, por ejemplo reuterina, producida por *L. reuteri*; y bacteriocinas. Las bacteriocinas son sustancias microbianas que inhiben el crecimiento de bacterias que con frecuencia están genéticamente relacionadas. Las bacteriocinas son polipéptidos y sus propiedades inhibitorias son destruidas por las proteasas mientras que la reuterina, una sustancia antimicrobiana de amplio espectro, no es un polipéptido y su actividad antimicrobiana no se ve afectada por las proteasas.

Las cepas de una amplia variedad de *Lactobacillus*, incluyendo *L. reuteri*, han sido utilizadas en formulaciones probióticas. *Lactobacillus reuteri* es uno de los habitantes naturales del tracto gastrointestinal de animales y habitualmente se encuentra en los intestinos de los animales sanos, incluyendo a los seres humanos. Se sabe que tienen actividad antimicrobiana. Ver, por ejemplo, la patente de EE.UU N° 5.439.678, 5.458.875, 5.534.253, 5.837.238 y 5.849.289. Cuando se cultivan células *L. reuteri* bajo condiciones anaeróbicas en presencia de glicerol, ellas producen la sustancia antimicrobiana conocida como β -hidroxi-propionaldehído (3-HPA).

La investigación ha documentado la capacidad de las bacterias productoras de ácido láctico de inhibir *E. Coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*. La reducción de organismos causantes de diarrea es especialmente importante en los animales jóvenes y recién nacidos.

Las modificaciones genéticas a cepas de *Lactobacillus* normalmente están dirigidas hacia la mejora o el aumento de características específicas de la cepa, tales como la producción de compuestos antagónicos a los patógenos de alimentos comunes, capacidad de metabolizar el colesterol o para tolerar el ácido o bilis y la capacidad de mejorar la respuesta inmune (Kullen, M. J. y T. R. Klaenhammer. 1999. Modificación genética de los lactobacilos intestinales y bifidobacterias, p. 65-83. En G. Tannock (ed.), Probióticos: una revisión crítica, Horizon Scientific Press, Wymondham, Reino Unido). Bajo condiciones ideales, estas cepas modificadas beneficiarían al huésped. Sin embargo, bajo condiciones naturales, el rendimiento de las cepas modificadas de *Lactobacillus* es frecuentemente afectado por plásmidos nativos, especialmente en los casos en que las manipulaciones son mediadas por plásmidos. La incompatibilidad entre los plásmidos nativos y los plásmidos introducidos es uno de los principales factores que contribuyen a la inestabilidad del plásmido dentro de un huésped (Posno, M., R.J. Leer, N. van Luijk, M.J.f. van Giezen, P.T.H.M. B. C. Lokman y P.H. Pouwels. 1991. La incompatibilidad de los vectores de

Lactobacillus con replicones derivados de pequeños plásmidos crípticos de *Lactobacillus* e inestabilidad segregacional de los vectores introducidos. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1822-1828).

La mayoría de las cepas de *Lactobacillus*, independiente de su origen (plantas, carne, ensilaje, masa fermentada o tracto gastrointestinal), albergan por lo menos un plásmido nativo y a menudo más (Pouwels, H. P. y R. J. Leer. 1993. La genética de lactobacilos: plásmidos y expresión génica. Antonie van Leeuwenhoek 64, 85-107). Estos plásmidos no sólo pueden interferir con la estabilidad del plásmido recombinante, sino también pueden albergar características indeseables, por ejemplo, resistencia a los antibióticos (Posno et al., 1991) por lo que puede ser ventajoso o incluso necesario eliminar cualquiera de dichos plásmidos nativos.

Muchos antibióticos y sustancias antimicrobianas naturalmente han estado presentes en la naturaleza durante millones de años y el hombre ha utilizado antibióticos y antimicrobianos para inhibir el crecimiento de bacterias u otros microbios y para tratar las infecciones bacterianas o microbianas en seres humanos, otros animales y en cultivo de tejidos. Sin embargo, el uso de antibióticos o antimicrobianos tiene el efecto indeseable de la selección de bacterias u otros microbios que son resistentes a los antibióticos o antimicrobianos que son administrados o aplicados. Como resultado, los regímenes de tratamiento pueden verse afectados negativamente, o en algunos casos vuelven ineficaces.

Se ha informado recientemente que *L. reuteri* ATCC 55730 es resistente a lincomicina y también que contiene la gen de resistencia *genelnuA* (Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C. & Meile, L. 2006. Los patrones de susceptibilidad a antibióticos y genes de resistencia de cultivos lácticos y bacterias probióticas utilizadas en los alimentos. Syst Appl Microbiol. 29(2):145-155). Se buscó en el genoma de la cepa este gen y fue identificado como el marco abierto de lectura *lr2105* en el plásmido pLR585. El plásmido también alberga los genes que codifican una proteína de resistencia a múltiples fármacos (*lr2089*) y un exportador de antibióticos policétidos (*lr2096* y *lr2097*). Ninguno de los genes en el plásmido tiene alguna conexión obvia o relevancia de importancia para las características probióticas conocidas o para la tolerancia al ácido de la cepa.

Hay una necesidad, especialmente en la industria probiótica, de utilizar lactobacilos que toleran bien los ácidos con el fin de que dichos cultivos de numerosas formulaciones no sólo pasen por el ambiente ácido del estómago para alcanzar el resto del intestino en un número suficiente, sino también para poder crecer y colonizar el estómago, con el fin de

poder ejercer su efecto probiótico a lo largo del tracto gastrointestinal. Cuando se utilizan cepas que toleran mal el ácido, es necesario ingerir un número mayor de bacterias lo que conduce a un mayor costo. Además, un gran esfuerzo se dirige hacia la protección de los cultivos de pH ácido por diversos medios, que también aumenta el costo. Por lo tanto, hay un interés en la industria en tener cepas que toleren bien ácidos y por consiguiente en los métodos que mejorarán la tolerancia al ácido de las cepas existentes. Un ejemplo de un método para mejorar la tolerancia al ácido de bacterias lácticas se da en la solicitud de patente US20050158423 A1, donde se utilizan cepas con plásmidos que codifican para proteínas pequeñas de choque térmico, y en donde también se dan métodos para transferir dichos plásmidos a una bacteria láctica. Esto es sin embargo, en contraste con la presente invención en donde se elimina un plásmido para aumentar la tolerancia al ácido de la cepa.

Otros objetos y características de las invenciones serán más evidentes a través de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Muestra la detección de plásmidos con PCR. Los números representan: 1, *L. reuteri* DSM 17938; 2, *L. reuteri* DSM 17686; 3, *L. reuteri* ATCC 55730; y 4, *L. reuteri* DSM 20016 (control negativo). Los plásmidos analizados son: a, pLR580; b, pLR581; c, pLR584; y d, pLR585.

Figura 2. Muestra la detección del gen de resistencia *genelnuA*. 1, DSM 17938; 2, DSM 17686; 3, ATCC 55730; 4, DSM 20016

Figura 3. Tolerancia al ácido de ATCC 55730 (izquierda), DSM 17686 (centro) y DSM 17938 (derecha) en barras. Las columnas muestran la proporción de bacterias sobrevivientes (promedio de cuatro repeticiones). Las barras de error indican la desviación estándar, una estrella un p-valor < 0.05 y tres estrellas p < 0.001.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se obtuvo una cepa derivada de *L. reuteri* ATCC 55730 mediante la eliminación de los plasmidios pLR581 y pLR585. Esta cepa es mucho más sensible a la tetraciclina y lincomicina que la cepa parental. La cepa con los dos plásmidos eliminados ha sido depositada en DSMZ y ha sido designada como *L. reuteri* DSM 17938. *L. reuteri* DSM 17938 tiene el mismo perfil rep-PCR (PCR repetitivo), patrón de fermentación, producción de reuterina, morfología, tasa de crecimiento, adherencia a la mucosa y tolerancia a la bilis

que *L. reuteri* ATCC 55730. Sin embargo, la cepa sin plásmidos crece a una mayor densidad y sobrevive mejor en condiciones ácidas. Cuando las cepas se co-cultivan, DSM 17938 también es más competitiva.

Así, la presente invención hace uso de las características de la nueva cepa y proporciona ciertas cepas sin plásmidos de bacterias lácticas modificadas de tal modo que exhiben una mejor tolerancia al ácido, un método de modificación de estas cepas y productos que contengan estas cepas. Otros objetos y características de las invenciones serán más evidentes a través de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION Y FORMAS DE REALIZACION PREFERIDAS DE LA MISMA

La cepa *L. reuteri* DSM 17938 (depositada en DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) el 6 de Febrero del 2006, bajo el tratado de Budapest) es derivada de *L. reuteri* ATCC 55730 a través de la eliminación de dos plásmidos, pLR581 y pLR585. Tiene el mismo perfil de rep-PCR, patrón de fermentación, producción de reuterina, morfología, tasa de crecimiento, adherencia a la mucosa y la tolerancia a la bilis que ATCC 55730 pero es mucho más sensible a la tetraciclina y lincomicina comparado a la cepa parental. Sorprendentemente, se ha encontrado que *L. reuteri* DSM 17938 y DSM 17686 producen un aumento de la tolerancia al ácido debido a una eliminación de plásmido a través de un proceso llamado curación. Es más competitivo en los experimentos de co-cultivo, lo que puede ser explicado por una mejor supervivencia en pH ácido.

Un objetivo de esta invención es quitar un plásmido de una bacteria láctica para hacerla más tolerante a los ácidos, de tal manera de sobrevivir mejor en el intestino, y por lo tanto ser más beneficiosa para la salud humana. Esto ha sido demostrado en la cepa *L. reuteri* DSM 17686 y en la nueva cepa *L. reuteri* DSM 17938. Esto parece ser un fenómeno general y previamente desconocido en donde la eliminación de un plásmido en lactobacilos, que no codifica para algo relacionado con la tolerancia al ácido, dará una nueva cepa que es más resistente a los ácidos. Este efecto se ha utilizado en la presente invención para hacer los lactobacilos más tolerantes al ácido.

Otros objetos y características de las invenciones serán más evidentes a través de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1

Eliminación de pLR585 desde DSM 17686

La eliminación del plásmido por la formación de protoplastos y regeneración, se realizó esencialmente como se describe en Vescovo *et al.* (Vescovo, M., Morelli, L., Cocconcelli, P.S. y Bottazzi, V. 1984. Formación de protoplastos, regeneración y eliminación del plásmido en *Lactobacillus reuteri*. FEMS Microbiol Lett 23:333-334). Un cultivo de una noche de *Lactobacillus reuteri* DSM 17686 se diluyó hasta una DO600 = 0,1 en un cultivo de 10 ml de MRS (Oxoid, Lenexa, KS, Estados Unidos) y se creció a 37° C hasta una DO600 = 0.7-0.8. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 3000xg durante 10 minutos y lavadas con 10 ml de agua Nanopure. Las células fueron nuevamente recolectadas por centrifugación y resuspendidas en 2 ml de buffer de protoplastos (buffer fosfato 0,2 M, sacarosa 0,5 M, MgCl₂ 20 mM; pH 7.0). Las células se mezclaron con un volumen igual de 10 mg ml⁻¹ de lisozima en un buffer de protoplastos y se incubó a 37° C durante 1 hora. Los protoplastos fueron recolectados por centrifugación a 3000xg durante 15 minutos y lavados con 20 ml de buffer de protoplastos. Los protoplastos fueron recolectados nuevamente por centrifugación y resuspendidos en 1 ml de buffer de protoplastos después de lo cual se realizó una observación microscópica.

Las diluciones en buffer de protoplastos fueron plaqueadas en agar MRS con sacarosa 0.5 M para la regeneración. Las diluciones en agua Nanopure fueron plaqueadas en agar MRS para evaluar el número de células restante. Se determinó el número de ufc después de una incubación anaeróbica durante una noche a 37° C y nuevamente después de una incubación durante una noche más. Las colonias regeneradas se pusieron en agar MRS con y sin 8 µg ml⁻¹ de lincomicina. Los plásmidos candidatos a ser eliminados fueron identificados mediante la ausencia de crecimiento en las placas de MRS con lincomicina.

Resultado:

Confirmación de la eliminación de pLR585

Los plásmidos de DSM 17938 se analizaron mediante PCR (Fig. 1). Tanto pLR585 como pLR581 no se encontraron, mientras que los otros dos plásmidos todavía estaban presentes. Por lo tanto, se han eliminado de DSM 17938 los plásmidos tetW pLR581 y lnuA pLR585. La ausencia de lnuA en DSM 17938 también fue detectada por PCR (Fig. 2).

EJEMPLO 2

Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas de lincomicina

Las bacterias fueron cultivadas en caldo MRS por 16 h a 37° C. Después de la dilución a 10^5 cfu ml⁻¹, 1 µl de cada cepa bacteriana fue visto en placas de MRS con lincomicina o clindamicina (concentraciones de 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µg ml⁻¹). Después de la adsorción de las gotas, las placas se incubaron en una atmósfera anaeróbica a 37° C durante 24 h. La CMI se definió como la menor concentración de antibiótico para que no existiera ningún crecimiento bacteriano visible. Las CMIs de tetraciclina fueron probadas con Etest (AB Biodisk) sobre bacterias creciendo en placas de agar MRS (Oxoid), según las instrucciones del fabricante.

Resultado:

La eliminación de pLR585 dio lugar a una disminución de la CMI desde >16 a 0.25 µg ml⁻¹ de lincomicina, cercano al nivel del control negativo DSM 20016. El valor de la CMI ya muy bajo para la clindamicina no cambió. Las CMIs de tetraciclina también se probaron con E-test y se encontró que eran 12-16 µg ml⁻¹ para DSM 17938 y DSM 17686 y > 256 µg ml⁻¹ para ATCC 55730.

Tabla 1

Cepa	DSM 17938	DSM 17686	ATCC 55730	DSM 20016	1063
CMI de Lincomicina (µg ml ⁻¹)	0.5	> 16	> 16	0.25	> 16
CMI de Clindamicina (µg ml ⁻¹)	< 0.125	< 0.125	< 0.125	< 0.125	> 16

EJEMPLO 3

Patrón de fermentación y producción de reuterina

Los patrones de fermentación se determinaron utilizando api 50 CHL (bio-Mérieux) según las instrucciones del fabricante. Para detectar la producción de reuterina, las bacterias se cultivaron primero durante 48 h en placas de MRS (inoculadas en forma de líneas). Las placas fueron entonces cubiertas con agar de glicerol 500 mM (agar al 1%) y se incubaron a 37° C durante 30 min. La reuterina fue detectada por la adición de 5 ml de 2, 4-dinitrofenilhidrazina (0.1% de ácido clorhídrico 2 M). Después de una incubación de 3 min, se vertió la solución y se agregaron 5 ml de KOH 5 M. Las zonas rojas alrededor de las colonias muestran que se ha producido reuterina.

Resultado:

El patrón de fermentación de DSM 17938 se comparó con DSM 17686 y ATCC 55730 usando API 50 CHL y no se detectaron diferencias. Todas las cepas fermentaron l-arabinosa, ribosa, galactosa, glucosa, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, rafinosa y gluconato y resultaron negativas para el resto de las pruebas. También, la producción de reuterina fue de la misma magnitud para las tres cepas.

EJEMPLO 4

Crecimiento y co-cultivo

El crecimiento se detectó a través de la inoculación de un cultivo de una noche a una DO de 0.1 en caldo MRS y en tubos precalentados a 37° C. Los tubos se incubaron a 37° C y se tomaron muestras para la medición de DO600 nm durante 8 h. Cada bacteria se analizó por triplicado. El co-cultivo de las bacterias se realizó mediante la mezcla en cantidades iguales de cultivos de una noche de ATCC 5730, DSM 17686 y DSM 17938 en tubos precalentados de caldo MRS. La mezcla se incubó a 37° C durante la noche y luego se re-inoculó a un nuevo tubo de MRS. Este procedimiento se repitió tres veces. Al principio y final de cada cultivo se analizaron muestras a través del cultivo en distintas placas de MRS de diferentes diluciones del cultivo y luego escogiendo y creciendo colonias en tres placas de MRS; una sin antibióticos, una conteniendo 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de lincomicina y una conteniendo 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de tetraciclina. Las colonias que crecieron solamente en MRS se consideraron DSM 17938, aquellas que crecieron en MRS con lincomicina se consideraron DSM 17686, y aquellas que crecieron en las tres placas se consideraron ATCC 55730.

Resultado:

El crecimiento de las cepas DSM 17938 y DSM 17686 se comparó con ATCC 55730. No se pudo detectar diferencias en el tiempo de generación, sin embargo, ambas cepas sin plásmidos crecieron a una densidad significativamente mayor que ATCC 55730. Las DOs finales fueron: para ATCC 55730, 4.78 ± 0.13 ; para DSM 17686, 5.89 ± 0.28 ; y para DSM 17938, 6.00 ± 0.26 . Las tres cepas también han sido co-cultivadas en caldo MRS por aproximadamente 30 generaciones (3 re-inoculaciones). Los resultados muestran claramente que las cepas sin plásmidos tienen una ventaja cuando se crecen in vitro. Se inocularon cantidades iguales de las cepas en conjunto, pero al final del experimento la mezcla consistió de 56% de DSM 17938, 38% de DSM 17686 y sólo un 6% de ATCC

55730.

La razón de esto puede ser que las cepas sin plásmidos crecen a una DO superior o posiblemente debido a que sobreviven de una mejor forma en fase estacionaria. La pérdida de dos plásmidos podría también haber dado lugar a una disminución de la carga (menos ADN a replicar) y por lo tanto una mayor capacidad competitiva.

EJEMPLO 5

Adherencia a la mucosa

Se utilizó mucosa del intestino delgado de cerdo. La mucosa y la ASB fueron disueltas y diluidas en PBS e inmovilizadas en pocillos de microtitulación (Greiner) a través de la incubación de 100 μ l de la solución durante 3 h a temperatura ambiente con rotación lenta. Las concentraciones finales fueron de DO280 0.1 para la mucosa y 100 μ g ml⁻¹ para la ASB. Los pocillos fueron bloqueados con 0,2 ml de PBS suplementado con 1% de Tween 20 por 1 h y luego se lavaron con PBS con 0,05% Tween 20 (PBST). Las bacterias fueron cultivadas en caldo MRS durante 16 horas a 37° C, lavadas una vez en PBST y diluidas a una DO600 0.5 en el mismo buffer. Los pocillos fueron lavados posteriormente con PBST y el grado de unión fue examinado con un microscopio invertido. Todas las bacterias se analizaron por triplicado.

Resultado:

La capacidad de adherencia a la mucosa de las cepas DSM 17938 y DSM 17686 se comparó con la de ATCC 55730. No se pudo detectar ninguna diferencia en la adherencia.

EJEMPLO 6

Tolerancia al ácido

Con el fin de comprobar la sobrevivencia a un pH bajo, las cepas de *L. reuteri* ATCC 55730, DSM 17686 y DSM 17938 se crecieron durante una noche a 37° C en MRS. 5 μ l de las bacterias se añadieron a 10 ml de MRS precalentado, y se incubaron a 37° C hasta que se alcanzó una DO600 de 1.0. Luego se añadieron 800 μ l de un cultivo con una DO 1.0 a 8 ml de jugo gástrico sintético (8.3 g l⁻¹ proteasa-peptona (Oxoid), 3.5 g l⁻¹ glucosa, 2.05 g l⁻¹ NaCl, 0.6 g l⁻¹ KH₂PO₄, 0.11 g l⁻¹ CaCl₂, 0.37 g l⁻¹ KCl, ajustado a un pH de 2.0 con HCl), una modificación de Cotter *et al.* careciendo enzimas (Cotter, PD, Gahan, CG & Hill, C. 2001. Un sistema de glutamato descarboxilasa protege a *Listeria monocytogenes* en el fluido gástrico. Mol Microbiol 40: 465-475).

Los tubos se incubaron a 37° C y se tomaron muestras después de 1, 20, 50 y 90 minutos. Las muestras fueron diluidas en PBS y propagadas en placas con MRS, que se incubaron anaeróbicamente durante 24 horas a 37° C. El experimento se repitió en dos ocasiones y se analizaron muestras en duplicado cada vez. La diferencia entre las cepas fue comprobada estadísticamente con la prueba de t de Student.

Resultado:

Las tres cepas se cultivaron a una DO600 1.0 (entre mediados y fines de la fase exponencial) y posteriormente desafiadas con un pH ácido. Tanto DSM 17938 y DSM 17686 sobrevivieron mejor que ATCC 55730 después de la incubación de 50 min a pH 2.0, con tasas de supervivencia de 41, 28 y 20%, respectivamente (Fig. 3). Las diferencias fueron significativas con valores de p iguales a 0.0006 (DSM 17938 vs ATCC 55730) y 0.04 (DSM 17686 vs ATCC 55730). Se desconoce la razón de esto. Una mejor supervivencia a un pH ácido podría ser la explicación de por qué las cepas sin plásmidos fueron más competitivas en los experimentos de co-cultivo.

EJEMPLO 7

Tolerancia a la bilis

Las bacterias se cultivaron durante 16 horas en caldo MRS a 37° C. Las suspensiones bacterianas se diluyeron en PBS a aproximadamente 10^3 – 10^6 ufc ml⁻¹. 10 µl de cada dilución se dejaron caer sobre placas de MRS con diferentes concentraciones de bilis bovina (0, 0.5, 1, 2, 4 y 6%; Sigma B3883). Se analizaron dos repeticiones de cada bacteria. Las placas fueron incubadas durante 72 h a 37° C en una atmósfera anaeróbica. Se contaron las colonias y se estimó la tolerancia a la bilis mediante la comparación del número de colonias en las placas de MRS con bilis en comparación con las placas sin bilis. También se analizaron bacterias en fase exponencial (DO 0.5) de la misma manera.

Resultado:

Las tolerancias de las cepas sin plásmidos DSM 17938 y DSM 17686 a bilis bovina fueron comparadas con ATCC 55730. Las bacterias se analizaron en las fases estacionaria y exponencial del crecimiento (DO600 0.5). Las cepas toleran bien la bilis cuando están en fase estacionaria, pero la supervivencia y el crecimiento fueron mucho menores en la fase exponencial. Sin embargo, ninguna diferencia en la tolerancia pudo ser detectada entre las

cepas.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a formas de realización específicas, se tendrá en cuenta que numerosas formas de realización, modificaciones y variaciones son posibles, y en consecuencia, todas estas variaciones, modificaciones y formas de realización deben considerarse dentro del espíritu y el alcance de la invención.

LAS REIVINDICACIONES

1. Un cultivo biológicamente puro de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
2. Un método para aumentar la tolerancia al ácido de una cepa de *Lactobacillus* que incluye la eliminación de un plásmido de la cepa de *Lactobacillus*.
3. El método para aumentar la tolerancia al ácido de una cepa de *Lactobacillus* de la reivindicación 2, en la que la cepa de *Lactobacillus* es una cepa de *Lactobacillus reuteri*.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de aumentar la tolerancia al ácido de ciertas bacterias lácticas. La invención también proporciona tales cepas tolerantes al ácido y productos que comprendan tales cepas.

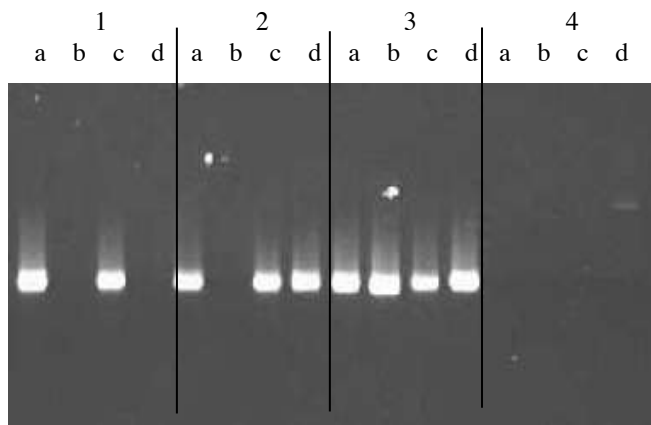
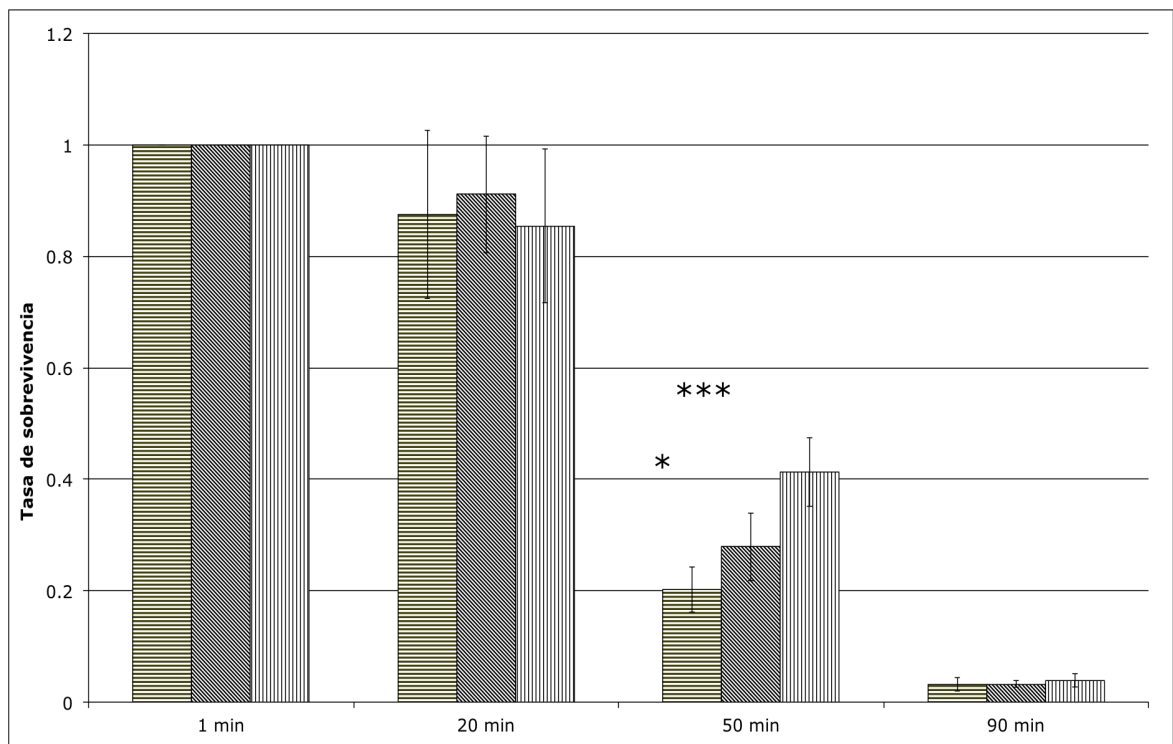
Figura 1**Figura 2**

Figura 3

**PODER PARA TRASPASO &
REPRESENTACION**

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales, nombres de dominio, derechos de autor y registros sanitarios.

Nosotros, firmantes (Nombre(s) completo):

Liamon Connolly

Aquí llamados CEDENTE(s) y propietario(s), declara(n) por este documento que cede(n) la (Identifique plenamente la propiedad a ceder - marca, patente u otro-): *Patente:*
Método para aumentar la tolerancia al ácido de ciertas bacterias lácticas y el uso de dichas bacterias

A

La empresa (Nombre de la empresa):

BIOGAIA AB

Una empresa constituida bajo las leyes de (Indique el país/jurisdicción):

Suecia

Domiciliada en (Domicilio de la empresa):

*P.O. Box 3242, SE-103 64
Estocolmo, Suecia*

Representada por (Nombre del representante):

Marianne Möllstam

(aquí llamado el CESIONARIO)

**POWER OF ATTORNEY FOR ASSIGNMENT
& REPRESENTATION**

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans, domain names, copyrights and health registrations.

We, the undersigned (Complete name(s)):

Liamon Connolly

Hereinafter the ASSIGNOR(s) and owner(s) declares by this document that assigns the (Enter and identify in detail the property to assign - trademark, patent or other-): *Patent:*

Method of increasing the acid tolerance of certain lactic acid bacteria and the use of said bacteria

To

The corporation (Name of the corporation):

BIOGAIA AB

A corporation organized under the laws of (Enter the country/jurisdiction):

Sweden

Domiciled in (Domicile of the corporation):

*P.O. Box 3242, SE-103 64
Stockholm, Sweden.*

Represented by (Name of representative):

Marianne Möllstam

(which in this document will be called the ASSIGNEE)

Por el presente acto, el CESIONARIO acepta dicho traspaso y nombra a ALVARO RAMÍREZ BONILLA TP. 118.770., c.c. 79.790.039; María Mercedes DÍAZ SUÁREZ TP. 227.323 c.c. 1.020.751.662; ELIANA MARÍA REYES FERNÁNDEZ T.P. 203200., c.c. 1.032.417.130, domiciliados en la Carrera 13 No 29 - 21 Oficina 241, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1 o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal, el segundo y la tercera como suplente como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el suplente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o del suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otro según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad intelectual, propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales,

The ASSIGNEE accepts the said assignment and do hereby appoint ALVARO RAMIREZ BONILLA, TP. 118.770, C.C.79.790.039; María Mercedes DÍAZ SUÁREZ TP. 227.323 c.c. 1.020.751.662; ELIANA MARÍA REYES FERNÁNDEZ T.P. 203200., c.c. 1.032.417.130, with domicile on Carrera 13 No 29 - 21 Oficina 241, Bogotá, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal, the second and third as alternate, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. If any of the appointees were to be definitely absent, the alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal or the alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favour of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) intellectual property, industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorise the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by

administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. c) Obtención de un número de identificación tributaria y el registro ante la cámara de comercio competente; d) Solicitud de inscripción de obras y demás actos relacionados con derechos de autor ante la Dirección Nacional de Derechos de Autor o la entidad competente. e) Obtención y demás actos relacionados con registros sanitarios ante la autoridad nacional competente. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, solicitar la revocatoria y ratificar los actos de agentes oficiosos.

me (us) or against me (us). c) Obtainment of a tax identification number and the register before the competent chamber of commerce; d) Registration and other related acts of copyrights before the competent authority. e) Obtainment and other related acts of health registrations before the competent authority. And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, ask for revocation and ratify acts done by representatives without a power of attorney.


Firma de Cedente/Signature of Assigner


Firma de Cesionario/Signature of assignee

Sweden Stockholm 2013-11-13
Firmado en la fecha y lugar/Signed on the date and place

INSTRUCTIONS TO COMPLETE THIS

INSTRUCCIONES PARA COMPLETAR

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Dirección de Nuevas Creaciones

Bogotá, D.C.



Referencia: SUSTITUCIÓN DE PODER

Expediente:

BioGaia AB

Álvaro RAMÍREZ BONILLA, identificado con cédula de ciudadanía No. **79.790.039** de Bogotá D.C., con tarjeta profesional No. **118.770** del Consejo Superior de la Judicatura, por medio del presente informo a su Despacho que SUSTITUYO poder a mi conferido por mi mandante, en la siguiente abogada:

Nombre	Cédula de Ciudadanía	TPA
Hasbleydi CALVO ROJAS	53.123.537 de Bogotá	248.664

Como representante en el asunto relacionado en el expediente mencionado en la referencia.

La abogada tendrá facultad para presentar solicitudes, recibir notificaciones, responder a requerimientos, contestar y presentar oposiciones, interponer recursos ordinarios y extraordinarios, solicitar revocatoria directa, transigir, conciliar, solicitar nulidades y restablecimiento de derechos, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos y todos los demás actos relacionados con el expediente mencionado.

Atentamente,


Álvaro RAMÍREZ BONILLA

C.C. 79.790.039 de Bogotá D.C.

T.P. 118.770 del C.S de la J.

Acepto,


Hasbleydi CALVO ROJAS

C.C. 53'123.537 de Bogotá D.C.

T P. 248.664 del C.S de la J.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de aumentar la tolerancia al ácido de ciertas bacterias lácticas. La invención también proporciona tales cepas tolerantes al ácido y productos que comprendan tales cepas.

Figura 1

