

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
6 de Julio de 2006 (06.07.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2006/070040 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
*C12N 1/20* (2006.01) *A61K 35/74* (2006.01)  
*C12P 21/00* (2006.01) *C12R 1/04* (2006.01)  
*A23L 1/03* (2006.01)

Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 46100 Burjassot - VALENCIA (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2005/070173

(22) Fecha de presentación internacional:  
7 de Diciembre de 2005 (07.12.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P200403107  
28 de Diciembre de 2004 (28.12.2004) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **SANZ HERRANZ, Yolanda** [ES/ES]; Insto. de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Apartado 73, 46100 Burjassot - VALENCIA (ES). **COLLADO AMORES, Mari Carmen** [ES/ES]; Insto. de Agroquímica y Tecnología de

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: PROTEIN EXTRACTS WITH A WIDE RANGE OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND STRAINS OF THE GENUS *BIFIDOBACTERIUM* WHICH PRODUCE SAME

(54) Título: EXTRACTOS PROTEICOS CON AMPLIO ESPECTRO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y CEPAS DEL GENERO *BIFIDOBACTERIUM* QUE LOS PRODUCEN

(57) Abstract: The invention relates to six strains of the genus *Bifidobacterium* and to extracts resulting from the metabolism thereof, which contain antibacterial proteins. The aforementioned proteins have a wide range of activity including Gram-positive and Gram-negative bacteria. The inventive strains are stable under gastrointestinal stress conditions (acid pH, high salt concentration) and under conditions associated with food preparation and preservation technological processes. In addition, said strains have an antibiotic sensitivity profile which guarantees the safety thereof. The strains and the extracts thereof can be used as probiotics with properties that protect against gastrointestinal pathogens and as bioprotectors or food preservatives that protect against pathogenic and alterative bacteria.

(57) Resumen: La presente invención aporta seis cepas del género *Bifidobacterium* y los extractos resultantes de su metabolismo que contienen proteínas antibacterianas. Estas proteínas presentan un amplio espectro de actividad que incluye bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las cepas de la presente invención son estables en las condiciones de estrés gastrointestinal (pH ácido, alta concentración de sales) y en las condiciones de los procesos tecnológicos de conservación y elaboración de alimentos. Además, presentan un perfil de sensibilidad a antibióticos que garantiza su seguridad. Estas cepas y sus extractos pueden ser empleados como probióticos con propiedades protectoras frente a patógenos gastrointestinales y como bioprotectores o conservantes de alimentos frente a bacterias patógenas y alterantes.

WO 2006/070040 A1

**TITULO**

**EXTRACTOS PROTEICOS CON AMPLIO ESPECTRO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y CEPAS DEL GÉNERO *BIFIDOBACTERIUM* QUE LOS PRODUCEN.**

5

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

Esta patente pertenece al sector de la técnica de la Industria Alimentaria y Farmacéutica. Más concretamente, esta invención se enmarca dentro del campo de la alimentación funcional (probióticos) y de las tecnologías de conservación de alimentos por métodos biológicos, a través del uso de microorganismos con actividad antimicrobiana y de sus metabolitos. La patente incluye seis cepas del género *Bifidobacterium*, de origen intestinal humano, los metabolitos proteicos con actividad antibacteriana de amplio espectro que producen, y su uso frente a bacterias patógenas gastrointestinales y bacterias patógenas y alterantes de alimentos.

15

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Los probióticos constituyen uno de los subgrupos de alimentos funcionales más destacados por su versatilidad funcional y gran aceptación por los consumidores, lo que ha despertando un creciente interés comercial, tanto en la industria farmacéutica como en la alimentaria.

20

Un probiótico es un suplemento dietético constituido por microorganismos viables que, administrado en cantidades adecuadas, es capaz de modificar la microflora de un compartimento del huésped, ejerciendo así un efecto beneficioso sobre la salud de éste (Schrezenmeir, *et al.*, 2001. Probiotics, prebiotics, and symbiotics-approaching a definition. Am. J. Clin. Nutr. 73: 361S-364S). Los principales probióticos son las bacterias integrantes de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, comensales del tracto gastrointestinal y tradicionalmente utilizadas en diversas fermentaciones alimentarias. Las cepas del género *Bifidobacterium* son particularmente importantes ya que colonizan selectivamente el tracto intestinal de los recién nacidos, representando hasta el 91% de su flora, y en adultos entre el 3 y el 7% (Harmsen, *et al.* 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-feed and formula-feed infants by using

25

30

molecular identification and detection methods. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 30: 61-67; Biavati, *et al.* 2001. The family *Bifidobacteriaceae*. In: Dworkin, *et al.* (eds.), The Prokaryotes. pp. 1-70. Springer, Nueva York). Los microorganismos del género *Bifidobacterium* se incluyen habitualmente dentro del grupo de bacterias lácticas, definido fisiológicamente por su capacidad para producir ácido láctico como uno de los principales metabolitos resultantes de la fermentación de carbohidratos. No obstante, su ADN posee un contenido en G + C más alto (55-64%) por lo que filogenéticamente se incluyen dentro de la clase *Actinobacteria* (O'Riordan, *et al.* 1997. Determination of genetic diversity within the genus *Bifidobacterium* and estimation of chromosomal size. FEMS Microbiol. Lett. 156: 259-264).

Los probióticos se han comercializado en una gran variedad de formas: (i) alimentos fermentados convencionales a los que se les adicionan probióticos y que se consumen principalmente con fines nutritivos (leche, quesos, etc.); (ii) las leches cultivadas y fermentadas, utilizadas básicamente como vehículos de bacterias probióticas (leche acidófila, leche bifidus, etc.), y (iii) los suplementos dietéticos o preparaciones farmacéuticas liofilizadas. En la actualidad, las bifidobacterias se consumen mayoritariamente incorporadas a alimentos y, principalmente, a derivados lácteos; aunque se está ampliando el número de productos (zumos, papillas, productos cárnicos, cereales, mayonesas, etc.) que constituyen un posible vehículo para su aporte.

Entre los efectos beneficiosos que se atribuyen a los probióticos se incluyen la mejora de la intolerancia a la lactosa; la prevención y tratamiento de infecciones gastrointestinales y urogenitales, el restablecimiento del ecosistema intestinal tras los tratamientos con antibióticos y quimioterapia, la prevención del cáncer coleorrectal y la estimulación del sistema inmune (Salminen, *et al.* 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. Br J Nutr; 80: 147S-171S; Tannock, 1999. A fresh look at the intestinal microflora. In G.W. Tannock (ed.), Probiotics. A critical review, pp. 5-14. Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, England). Concretamente, se considera que el género *Bifidobacterium* es esencial en el mantenimiento del equilibrio del ecosistema intestinal y el desplazamiento de microorganismos potencialmente perjudiciales, por lo que se le atribuye una importante función protectora. Se

considera que cepas de este género ejercen efectos beneficiosos en el tratamiento de la diarrea del viajero, las infecciones por rotavirus y la diarrea asociada al uso de antibióticos (McNaught, *et al.* 2001. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. *Nutr. Res.* 21: 343-353). También se han descrito sus efectos antagónicos frente a patógenos de los géneros *Listeria*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Proteus*, y *Escherichia* (Gibson, *et al.* 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 412-420; Lee, *et al.* 2003. Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. *Int. J. Antimicrob. Agents* 21: 340-346; Touré *et al.* 2003. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 95: 1058-1069; Gagnon, *et al.* 2004. In vitro inhibition of *Escherichia coli* 0157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 69-78).

No obstante, no siempre existen evidencias claras sobre los efectos beneficiosos ejercidos por las cepas probióticas y por los productos cultivados con ellas y, en muchos casos, los resultados son contradictorios. En parte esto es debido a la aplicación de deficientes criterios de evaluación en el proceso de selección de nuevas cepas probióticas y a la falta de estudios científicos sobre sus mecanismos de acción.

Concretamente, el origen de las cepas probióticas, su resistencia a las condiciones de estrés gastrointestinal y tecnológico y su susceptibilidad a los antibióticos son criterios de selección claves para el desarrollo de nuevos probióticos previo a su introducción en el mercado.

Se considera que la función e implantación de los probióticos puede ser dependiente de la especie y se ha recomendado el uso de cepas de origen humano (Lee, *et al.* 1995. The coming age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 241-245); pese a ello, actualmente el número de cepas de bifidobacterias de origen humano existente en el mercado es escaso.

Entre los factores que condicionan la supervivencia de las cepas probióticas durante el tránsito gastrointestinal, el pH ácido del estómago y la

elevada concentración de sales biliares en el intestino son las barreras fisiológicas más importantes. Durante la digestión, el tiempo medio de permanencia de los alimentos en el estómago es de 90 minutos a un pH próximo a 2,0 (Hill. 1990. Factors controlling the microflora of the health upper gastrointestinal tract. In Hill M.J. y Marsh, P.D. (eds), Human Microbial Ecology pp. 57-85. CRC Press, Boca Ratón, Florida; Berrada, *et al.* 1991. *Bifidobacterium* from fermented milk: survival during acid transit. J. Dairy Sci. 74:409-414). La concentración de bilis en el intestino oscila entre 1,5 y 2,0% en la primera hora de la digestión, disminuyendo posteriormente hasta el 0,3% (Sjovall, 1959. On the concentration of bile acids in the human intestine during absorption of bile acids and steroids 74. Acta Physiol. Scand. 46: 339-345). Por ello, las tolerancias al pH ácido y a altas concentraciones de sales biliares son dos de las propiedades deseables en un microorganismo probiótico. Además, para su incorporación a alimentos y utilización como suplementos, es aconsejable que estas cepas resistan otras condiciones de estrés a las que son sometidas durante los procesos industriales (congelación, secado, liofilización, salado, temperaturas de fermentación y de refrigeración, etc.). Hasta ahora el proceso de selección de las cepas probióticas no siempre ha asegurado su resistencia a los tratamientos tecnológicos y a su paso por el tracto gastrointestinal por lo que su viabilidad y estabilidad en los productos comercializados a menudo no cumple los criterios deseables para garantizar su efectividad (Fasoli, *et al.* 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. Int. J. Food Microbiol. 82: 59-70; Temmerman, *et al.* 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. Int. J. Food Microbiol. 81: 1-10; Temmerman, *et al.* 2003. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 69: 220-226).

El conocimiento de la susceptibilidad de las cepas probióticas a los antibióticos es también esencial, tanto para asegurar la ausencia de elementos de resistencia transferibles, como para establecer la compatibilidad de los probióticos con antibióticos para su uso en terapias combinadas y en diarreas debidas a tratamientos con antibióticos.

Por otro lado, los mecanismos de acción de los probióticos frente a patógenos gastrointestinales se desconocen, en gran medida, lo que dificulta la definición de la especificidad de su acción frente a patologías concretas. Entre los posibles mecanismos, se pueden citar: la competición por nutrientes y sitios  
5 de adhesión, la degradación de toxinas, la estimulación del sistema inmune y la síntesis de compuestos antimicrobianos (Fooks, *et al.* 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microecology. *Int. Dairy J.* 9: 53-61).

Los compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas se dividen en dos grandes grupos: (i) los compuestos de bajo peso molecular  
10 (menores de 1000 Da) que incluyen los ácidos orgánicos y que poseen un amplio espectro de acción y (ii) las proteínas antimicrobianas o bacteriocinas (mayores de 1000 Da) cuyo espectro de acción se restringe a microorganismos próximamente relacionados y otras bacterias Gram-positivas. En los últimos años, en *Lactobacillus* spp. también se ha detectado la producción de otros  
15 compuestos de naturaleza proteica, denominados "bacteriocin-like compounds", que no encajan con los criterios que definen las bacteriocinas y que tienen un espectro de acción más amplio (Bruno, *et al.* 2002. Inhibition of pathogenic and putrefactive microorganisms by *Bifidobacterium* sp. *Milchwissenschaft* 57: 617-621).

20 La capacidad de las bacterias lácticas para competir e inhibir el desarrollo de otros microorganismos se debe fundamentalmente a la producción de ácidos orgánicos, principalmente láctico y acético; aunque, en las últimas décadas, se ha demostrado que la producción de bacteriocinas también desempeña una función importante (Niku-Paavola, *et al.* 1999. New  
25 types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 86: 29-35). Esto ha permitido el uso de cepas de bacterias lácticas como cultivos protectores y sus metabolitos como conservantes en un gran número de fermentaciones alimentarias. La producción de bacteriocinas se ha estudiado en cepas de diversos géneros del grupo de bacterias lácticas y, muy  
30 especialmente, en *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* por su diversidad en especies y hábitats y sus aplicaciones industriales (Riley *et al.* 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Ann. Rev. Microbiol.* 56: 117-137). Concretamente, las cepas del género *Lactobacillus* se consideran las

principales productoras de bacteriocinas y, en el caso de cepas probióticas, se suponen implicadas en la colonización del tracto intestinal y en el desplazamiento de patógenos (Majhenic, *et al.* 2004. DNA analysis of the genes encoding acidocin LF221A and acidocin LF221B, two bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* LF221. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63: 705-714). Por el contrario, los efectos inhibitorios de las bifidobacterias frente a la flora competitiva se han atribuido básicamente a la producción de ácidos orgánicos y sideróforos (Bruno, *et al.* 2002. Inhibition of pathogenic and putrefactive microorganisms by *Bifidobacterium* sp. Milchwissenschaft 57: 617-62; Asahara, *et al.* 2001. Increased resistance of mince to Salmonella enterica serovar Thyphimurium infection by synbiotic administration of Bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. J. Appl. Microbiol. 91: 985-996; O'Sullivan, *et al.* 2001. Isolated bifidobacteria that produce siderophores which inhibit growth of Lactococcus lactis. US Patent Number 884894; Levchenko, *et al.* 2001. Strain bifidobacterium breve 79-88 used for preparing curative-prophylactic fermented-milk, nonfermented-milk food-stuffs, biologically active supplements and bacterial preparations. Número de patente: RU2176270; Neeser, *et al.* 2001. New bifidobacteria preventing diarrhea caused by pathogenic bacteria. International Patent Number WO 01/11015 A1) y no existen evidencias claras de su capacidad para sintetizar compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica y de amplio espectro. Tan sólo se ha demostrado que algunas bifidobacterias aisladas de heces de niños producen péptidos antimicrobianos activos frente a *Listeria monocytogenes* y sólo se ha purificado una bacteriocina (Bifidocina B) de *B. bifidum* NCFB 1454, que posee un espectro de inhibición restringido a bacterias Gram-positivas (Yildirim, *et al.* 1998. Characterization and antimicrobial spectrum of Bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. J. Food Prot. 61: 47-51; Yildirim, *et al.* 1999. Purification, amino acid sequence and mode of action of Bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. J. Appl. Microbiol. 86: 45-54. Touré, *et al.* 2003. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol. 95: 1058-1069).

La presente invención aporta un grupo de cepas del género *Bifidobacterium* de origen humano y, por consiguiente, amplía el escaso número de cepas de bifidobacterias de dicho origen (cuyo uso ha sido recomendado) existente en el mercado de los probióticos. Estas bacterias son productoras de metabolitos proteicos con actividad antibacteriana de amplio espectro (activos frente a Gram-positivas y Gram-negativas). Otra ventaja de la presente invención es la resistencia a las condiciones de estrés gastrointestinal y tecnológico. Otra ventaja añadida es el perfil de sensibilidad a antibióticos que garantiza su seguridad.

10

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

### Descripción breve

En la presente invención han sido seleccionadas seis cepas del género *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium* BIR-0304, *Bifidobacterium* BIR-0307, *Bifidobacterium* BIR-0312, *Bifidobacterium* BIR-0324, *Bifidobacterium* BIR-0326 y *Bifidobacterium* BIR-0349.

Las cepas han sido aisladas a partir de heces de individuos sanos (adultos y niños), y son productoras de compuestos de naturaleza proteica con características similares a las bacteriocinas pero con un espectro de acción más amplio que comprende bacterias, tanto Gram-positivas, como Gram-negativas. Este espectro de inhibición tan amplio no es una característica común a todas las bifidobacterias humanas de origen fecal ya que sólo seis del total de aislados presentan esta propiedad.

Estas cepas son altamente resistentes al pH ácido. La selección y aislamiento de las cepas mediante incubación previa de las muestras fecales en un medio ácido ha permitido la selección directa de aislados resistentes al pH propio de los jugos gástricos, que constituye la principal barrera biológica que puede limitar la supervivencia de los probióticos a su paso por el tracto gastrointestinal y durante los procesos de fermentación de alimentos y su período de almacenamiento.

Las cepas del género *Bifidobacterium* seleccionadas son también resistentes a altas concentraciones de sales biliares y cloruro sódico y a altas temperaturas, el método de aislamiento selectivo utilizado mediante pre-



incubación de las muestras fecales a pH ácido, permitió la selección directa de cepas resistentes al pH ácido y pudo favorecer el desarrollo de otras resistencias cruzadas, obteniéndose cepas tolerantes a las condiciones de estrés gastrointestinal y tecnológico. Por lo tanto, estas cepas cuentan con  
5 mayores posibilidades de sobrevivir y ser funcionales que las cepas probióticas actualmente comercializadas.

Las cepas seleccionadas del género *Bifidobacterium* presentan un perfil de resistencia-sensibilidad a antibióticos común a este género que garantiza su seguridad. La realización de pruebas sistemáticas de sensibilidad a antibióticos  
10 es esencial como criterio de selección de nuevos probióticos y cultivos protectores para su uso en alimentación a fin de garantizar la ausencia de resistencias a antibióticos transmisibles.

La presente invención proporciona además compuestos antibacterianos derivados del metabolismo de las bifidobacterias, en forma de extractos. Estos  
15 compuestos antibacterianos derivados del metabolismo de las bifidobacterias constituyen un objeto adicional de la presente invención y son reivindicados en la presente invención.

Los metabolitos son secretados al medio de cultivo durante el crecimiento de las bifidobacterias y los extractos que los contienen se obtienen  
20 a partir de los sobrenadantes libres de células de estos cultivos mediante liofilización, centrifugación, precipitación, extracción o filtración. El espectro de actividad incluye a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas responsables de alteraciones en alimentos y potencialmente patógenas pertenecientes a los géneros (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*,  
25 *Brochothrix*, *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* *Escherichia*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Arcobacter*, etc.). Los compuestos responsables de la actividad antibacteriana secretados a los medios de cultivo por las seis bifidobacterias y presentes en los extractos neutralizados ensayados son sustancias de naturaleza proteica y poseen  
30 características bioquímicas similares a las de las bacteriocinas de bacterias lácticas, pero no cumplen los criterios de su definición ya que poseen un espectro de inhibición excepcionalmente amplio incluyendo, no sólo a bacterias

Gram-positivas, sino también a un amplio número de bacterias Gram-negativas.

Los compuestos antibacterianos derivados del metabolismo de estas bacterias, así como el uso de estos compuestos como agentes antibacterianos  
5 frente a patógenos gastrointestinales o frente a bacterias patógenas y alterantes de alimentos, están también reivindicados en la presente invención.

El procedimiento de obtención de los extractos que contienen los compuestos arriba mencionados también se reivindica en la presente invención.

10 Puesto que las cepas seleccionadas del género *Bifidobacterium* sintetizaron compuestos con actividad antibacteriana de amplio espectro, frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, en las condiciones a las que están expuestas en el tracto intestinal, pueden actuar como probióticos con función protectora a este nivel y ser utilizados con fines médicos. El uso de las  
15 cepas de la presente invención como probióticos es otro objeto de la presente invención.

Las bifidobacterias seleccionadas crecen y se mantienen viables en diversos alimentos y bebidas constituyendo, por tanto, vehículos idóneos para su aporte. Por ejemplo, en las leches fermentadas y no fermentadas se  
20 comprobó su capacidad para secretar compuestos antimicrobianos al medio de cultivo durante su crecimiento. Las cepas del género *Bifidobacterium* seleccionadas, así como sus metabolitos adicionados en forma de extractos, actúan como inhibidores del desarrollo de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en alimentos y bebidas. Es decir, actúan como cultivos  
25 bioprotectores en alimentos como la leche. El uso de estas cepas y de sus extractos como agentes bioprotectores de alimentos constituye otro objeto de la presente invención.

Puesto que pueden fermentar y coagular la leche, podrían ser utilizadas para la elaboración de leches fermentadas y otros derivados lácteos. Este uso  
30 también ha sido reivindicado en la presente invención.

**Descripción detallada**

Un objeto de la presente invención lo constituye una cepa bacteriana aislada útil como producto probiótico, en adelante cepa bacteriana aislada de la presente invención, caracterizada porque es una cepa aislada de heces de humanos sanos perteneciente al género *Bifidobacterium*, porque produce compuestos antibacterianos de naturaleza peptídica con características similares a las bacteriocinas de amplio espectro de acción que comprende bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y porque es resistente a condiciones de estrés gastrointestinal y tecnológico, pertenecientes al siguiente grupo: a condiciones del jugo gástrico, altas concentraciones de sales biliares y cloruro sódico y altas temperaturas .

Hay que destacar que esta cepa ha sido aislada a partir de heces de individuos sanos (adultos y niños), y es productora de compuestos de naturaleza proteica con características similares a las bacteriocinas pero con un espectro de acción más amplio que comprende bacterias, tanto Gram-positivas, como Gram-negativas. Este espectro de inhibición tan amplio no es una característica común a todas las bifidobacterias humanas de origen fecal ya que sólo seis del total de aislados presentan esta propiedad.

Debido a que experiencias previas demostraron que mediante aislamientos convencionales tan sólo un 40% de las cepas de bifidobacterias de origen fecal eran resistentes a pH ácido, se utilizó un procedimiento de aislamiento más selectivo que permitiera mejorar este porcentaje y aislar directamente sólo las cepas ácido-resistentes. Tras pre-incubación de las muestras fecales a pH ácido durante 16 h, 60 aislados fueron asignados al género *Bifidobacterium*. De acuerdo con los resultados del análisis por RAPDs, 24 del total de aislados fueron cepas distintas. La identificación a nivel de especie de las cepas de mayor interés por su amplio espectro de actividad antibacteriana se realizó utilizando PCRs específicas de especie. Las cepas del género *Bifidobacterium* BIR-0304, BIR-0307, BIR-0312 y BIR-0349 se asignaron a la especie *B. longum infantis*; la cepa BIR-0324 a la especie *B. catenulatum* y la cepa BIR-0326 a *B. bifidum*.

Por tanto, las cepas del género *Bifidobacterium* seleccionadas son altamente resistentes al pH ácido. El procedimiento de selección de las cepas,

mediante incubación previa de las muestras fecales en un medio ácido, permite la selección directa de aislados resistentes al pH propio de los jugos gástricos, que constituye la principal barrera biológica que puede limitar la supervivencia de los probióticos a su paso por el tracto gastrointestinal y durante los procesos de fermentación de alimentos y su período de almacenamiento (Ejemplo 1).  
5 Todas las cepas fueron resistentes a las condiciones propias de los jugos gástricos manteniendo su viabilidad en torno a  $10^6$ - $10^8$  UFC/ml tras incubación prolongada.

Además, Las cepas del género *Bifidobacterium* seleccionadas son  
10 resistentes a altas concentraciones de sales biliares y cloruro sódico. Todas las cepas estudiadas mostraron capacidad para crecer a concentraciones de bilis de entre 1 y 5% (Figura 1A) y de NaCl de entre 2 y 10% (Figura 1B). Además, estas cepas presentan muy buena capacidad de crecimiento a temperaturas superiores a la óptima (hasta 60 °C) incluyendo las habitualmente utilizadas en  
15 los procesos de elaboración de leches fermentadas (Por ejemplo 42-45 °C). Por tanto, el método de aislamiento selectivo utilizado mediante pre-incubación de las muestras fecales a pH ácido, permitió la selección directa de cepas resistentes al pH ácido y pudo favorecer el desarrollo de otras resistencias cruzadas, obteniéndose cepas tolerantes a las condiciones de estrés  
20 gastrointestinal y tecnológico (altas concentraciones de cloruro sódico, altas temperaturas incluidas en los procesos tecnológicos de elaboración de diversos alimentos como los productos lácteos y procesos de liofilización). Globalmente, la invención proporciona cepas resistentes y estables en las condiciones propias del tracto gastrointestinal y de los procesos tecnológicos con mayores  
25 posibilidades de sobrevivir y ser funcionales que las cepas probióticas actualmente comercializadas (Ejemplo 1).

Así, un objeto particular de la presente invención lo constituye una cepa del género *Bifidobacterium* perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, al siguiente grupo: *Bifidobacterium* BIR-0304  
30 (CECT 7039), *Bifidobacterium* BIR-0307 (CECT 7040), *Bifidobacterium* BIR-0312 (CECT 7041), *Bifidobacterium* BIR-0324 (CECT 7042), *Bifidobacterium* BIR-0326 (CECT 7043) y *Bifidobacterium* BIR-0349 (CECT 7044).

La determinación de la sensibilidad a antibióticos es un criterio esencial para la selección de nuevos probióticos y, en general, de cepas bacterianas que vayan a ser utilizadas para alimentación (humana y animal) a fin de garantizar su uso seguro y, en el caso de probióticos, su compatibilidad con la administración de antibióticos en terapias combinadas y en el tratamiento de trastornos originados por el consumo de éstos. Las cepas seleccionadas del género *Bifidobacterium* presentan un perfil de resistencia-sensibilidad a antibióticos común a este género que garantiza su seguridad. Las cepas estudiadas fueron resistentes al metronidazol, gentamicina, ácido nalidíxico, trimethoprim, kanamicina, vancomicina y polimixina. Las resistencias intrínsecas a ciertos antibióticos que presentan las cepas de la presente invención, como el metronidazol y la vancomicina, son útiles para terapias combinadas que incluyan estos probióticos y antibióticos, por ejemplo en el tratamiento de las infecciones por *Helicobacter pylori* y *Clostridium difficile*. Sólo la cepa *Bifidobacterium* BIR -0349 fue sensible a la gentamicina y la cepa *Bifidobacterium* BIR-0324 al trimethoprim. Sin embargo, todas fueron sensibles a la rifampicina, amoxicilina, penicilina G, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina y claritromicina. (Ejemplo 1).

Otro objeto de la presente invención lo constituyen compuestos antibacterianos, en forma de extracto, derivados del metabolismo de las bifidobacterias de la presente invención. Los metabolitos son secretados al medio de cultivo durante el crecimiento de las mencionadas bifidobacterias y los extractos que los contienen se obtienen a partir de los sobrenadantes libres de células de estos cultivos por ejemplo mediante liofilización. El procedimiento de obtención de los extractos también se reivindica en la presente invención. Este procedimiento de obtención es el siguiente: (i) inoculación de un medio de cultivo al 1% (entre el 0.01 y el 50%) con cada bifidobacteria e incubación del mismo, (ii) recuperación del sobrenadante del cultivo por centrifugación al final de la fase exponencial del crecimiento (o bien durante la fase exponencial o estacionaria de crecimiento) (iii) concentración del sobrenadante por liofilización (o bien por precipitación con sulfato amónico o solventes orgánicos y posterior diálisis o evaporación, por extracción con solventes orgánicos o por filtración) y (iv) suspensión del líofilo en un volumen de tampón que represente

el 10% (entre el 90 y el 0.5% ) del volumen inicial del medio de cultivo y neutralización o no del extracto obtenido y esterilización por filtración. La actividad antimicrobiana se detecta en los extractos, neutralizados (en los que se elimina el efecto de los ácidos orgánicos) y sin neutralizar (en los que el efecto de los ácidos orgánicos se suma al de compuestos de otra naturaleza; ver Ejemplo 2 y 3). El espectro de actividad incluye a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas responsables de alteraciones en alimentos y potencialmente patógenas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Brochothrix*, *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Arcobacter*, etc.

La actividad antimicrobiana de estos compuestos fue determinada por la técnica de la doble capa y la de difusión en agar frente a dos microorganismos indicadores Gram-positivos, *L. innocua* y *L. lactis*, esto permitió la selección de ocho cepas del género *Bifidobacterium* de entre las 24 aisladas de heces. Posteriormente, el estudio se orientó hacia la detección de la actividad antibacteriana debida exclusivamente a la secreción de compuestos de naturaleza proteica, por lo que se utilizó sólo la técnica de difusión en agar y extractos neutralizados, y se amplió el número de microorganismos indicadores, incluyendo bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Se seleccionaron, finalmente, las seis cepas que mostraron el espectro de inhibición más amplio (ver Tabla I). Entre ellas, la cepa *Bifidobacterium* BIR-0312 fue la que inhibió un número mayor de microorganismos indicadores. Los perfiles de inhibición de las cepas *Bifidobacterium* BIR-0304, BIR-0307, BIR-0312, BIR-0324 y BIR-0326 fueron similares mientras que la cepa BIR-0349 mostró un espectro más restringido. La mayoría de las bacterias potencialmente patógenas Gram-positivas (*Clostridium difficile*, *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) y Gram-negativas (*Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli* y *Arcobacter butzleri*) fueron inhibidas por, al menos, cuatro de las bifidobacterias seleccionadas.

Los compuestos responsables de la actividad antibacteriana secretados a los medios de cultivo por las seis bifidobacterias y presentes en los extractos neutralizados ensayados son sustancias de naturaleza proteica cuya

producción o liberación al medio es máxima al final de la fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria, cuando se utiliza como medio de cultivo caldo MRS, conteniendo cisteína y agentes como el Tween (0,1-10,0%). La naturaleza proteica se confirma por la destrucción de su actividad tras su  
5 tratamiento con todas las proteinasas ensayadas. Tan sólo la incubación con proteinasa K incrementó el efecto inhibitor sobre *Helicobacter pylori*, debido a que la propia proteinasa actuaba como inhibidor del crecimiento de este microorganismo y, dependiendo de la concentración, de forma sinérgica junto a otros compuestos de los extractos de las bifidobacterias.

10 Los compuestos responsables de la inhibición son termoestables manteniendo su actividad tras su incubación a 80°C durante al menos 3 min y a 100°C durante al menos 1 min. También son estables y activos en un amplio intervalo de pH (2-11) (Ejemplo 2). Por tanto, su actividad es compatible con las condiciones propias del tracto gastrointestinal y con las de un amplio número  
15 de procesos tecnológicos (fermentación y maduración de productos lácteos, cárnicos, etc.).

La masa molecular aparente de los compuestos antibacterianos es menor de 100 kDa, determinada por ultrafiltración (Ejemplo 2).

Por tanto, los compuestos responsables de la actividad antibacteriana  
20 poseen características bioquímicas similares a las de las bacteriocinas de bacterias lácticas, pero no cumplen los criterios de su definición ya que poseen un espectro de inhibición excepcionalmente amplio incluyendo, no sólo a bacterias Gram-positivas, sino también a un amplio número de bacterias Gram-negativas. Así, la actividad antimicrobiana de los extractos frente a bacterias  
25 Gram-positivas (por ejemplo *Listeria innocua*) y Gram-negativas (por ejemplo *Salmonella typhimurium* y *Helicobacter pylori*) se destruye tras su tratamiento con diversas proteasas (tripsina, proteasa A, pepsina y catepsina B), pero no con amilasas y lipasas (Ejemplo 2). El hecho de que el espectro de inhibición se amplíe a patógenos Gram-negativos es una característica inusual en las  
30 bacteriocinas convencionales de bacterias Gram-positivas y confiere a la cepa aislada de la presente invención y a sus metabolitos grandes ventajas como probióticos y bioprotectores frente a microorganismos que no estén próximamente relacionados.

Los compuestos antibacterianos de naturaleza proteica producidos por las cepas seleccionadas del género *Bifidobacterium* son capaces de inhibir cepas de *Helicobacter pylori* (multi) -resistentes a antibióticos habitualmente utilizados para su tratamiento (por ejemplo metronidazol y claritromicina),  
5 pudiendo constituir una terapia alternativa a dicho tratamiento farmacéutico.

Las cepas seleccionadas del género *Bifidobacterium* de la presente invención sintetizaron compuestos con actividad antibacteriana de amplio espectro, frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, en las condiciones a las que están expuestas en el tracto intestinal, presencia de  
10 sales biliares y pancreatina, por lo que pueden actuar como probióticos con función protectora a este nivel y ser utilizados con fines médicos. Dicha actividad antibacteriana fue debida a compuestos secretados al medio de cultivo y, en gran parte, a compuestos de naturaleza proteica ya que los halos de inhibición debidos al efecto de los extractos neutralizados fueron sólo  
15 ligeramente inferiores (entre 1 y 3 mm) a los de los extractos sin neutralizar (ver Figura 3-B, pocillos A y B) (Ejemplo 3).

Se determinó el posible uso de leche y medios basados en leche como sustrato para el crecimiento de las bifidobacterias y vehículos para su aporte en forma de células viables. En leche, todas las bifidobacterias seleccionadas e  
20 inoculadas al 1% fueron capaces de crecer, alcanzando niveles de  $10^6$ - $10^9$  UFC/ml, tras períodos de incubación de entre 24 y 48 h. El pH de la leche se redujo de valores iniciales de 6,4 a valores entre 4,0 y 5,2 y se observó cierto grado de coagulación, especialmente importante en las muestras inoculadas con la cepa *Bifidobacterium* BIR-0324 y su aroma fue el típico del yogur. En L-  
25 EL-G, todas las bifidobacterias seleccionadas fueron capaces de crecer, y el aumento en el número de viables fue ligeramente superior (entre 1 y 0,5 unidades logarítmicas) al obtenido en L. El grado de acidificación alcanzado también fue mayor, obteniéndose valores finales de pH entre 3,0 y 4,6. Se observó también un mayor grado de coagulación y, este fue especialmente  
30 importante, en las muestras inoculadas con las cepas *Bifidobacterium* BIR - 0312, BIR-0324 y BIR-0326 y su aroma fue el típico de leches fermentadas azucaradas.



Las bifidobacterias seleccionadas fueron capaces de sintetizar compuestos con actividad antibacteriana frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos en leche y medios basados en leche, como se demuestra por la técnica de la doble capa. Se obtuvieron halos de inhibición de 3 a 12 mm, excepto en el caso de la cepa *Bifidobacterium* BIR-0349 (ver Figura 3-A). La capacidad para secretar compuestos antimicrobianos al medio de cultivo durante su crecimiento en estos medios se verificó mediante el análisis de la actividad de sus extractos. Concretamente, en la Figura 3-B se observa el efecto inhibitor de los extractos neutralizados y sin neutralizar de la cepa *Bifidobacterium* BIR-0324 crecida en L-EL-G frente a *S. typhimurium*, detectándose halos muy similares, sólo 3 mm mayor en el extracto no neutralizado. Estos resultados confirman, por tanto, que dicha actividad es debida a compuestos de naturaleza proteica y que son secretados *in situ* durante su crecimiento en medios basados en leche.

Por lo tanto, las cepas del género *Bifidobacterium* de la presente invención seleccionadas crecen y se mantienen viables en diversos alimentos constituyendo vehículos idóneos para su aporte. Las leches fermentadas y no fermentadas, constituyen ejemplos de alimentos que sirven de soporte para el mantenimiento de su viabilidad (Ejemplo 4); además, se encuentran entre los productos más adecuados para la administración de cepas probióticas, debido a que la leche y sus derivados son integrantes habituales de la dieta en países desarrollados, tienen alto valor nutritivo, son fáciles de digerir y gozan de gran aceptación en los diversos grupos de población.

Las cepas del género *Bifidobacterium* seleccionadas pueden fermentar la leche y coagular sus proteínas; por tanto, pueden ser utilizadas para la elaboración de leches fermentadas, leches bífidus y otros derivados lácteos como por ejemplo, el yogur (Ejemplo 4).

Las cepas del género *Bifidobacterium* de la presente invención seleccionadas, así como sus metabolitos adicionados en forma de extractos, actúan como inhibidores del desarrollo de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en alimentos y bebidas. Las bifidobacterias seleccionadas actuaron como cultivos bioprotectores en leche, reduciendo la viabilidad de *Salmonella* en, al menos, dos unidades logarítmicas y de *Listeria* en, al menos, seis (ver

Tabla II). Los efectos protectores consecuencia directa de los metabolitos secretados por las bifidobacterias, se confirmaron por adición exclusiva a la leche contaminada de sus extractos. La adición de extractos no neutralizados, en los que se sumarían los efectos de los ácidos orgánicos y los de compuestos de naturaleza proteica, produjeron una reducción de los niveles de *Listeria* a valores inferiores a 100 UFC/ml y la adición de extractos neutralizados, con los que se evaluaría inicialmente el efecto de compuestos de naturaleza proteica, provocó reducciones de la bacteria contaminante de, al menos, dos unidades logarítmicas. Por tanto, los compuestos de naturaleza proteica en forma de extractos así como los cultivos de las cepas del género *Bifidobacterium* que los producen pueden actuar, en alimentos como la leche, como bioprotectores o conservantes naturales inhibiendo el desarrollo de microorganismos contaminantes (Ejemplo 5).

Por lo tanto, otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la cepa bacteriana aislada en la presente invención en la elaboración de un alimento o bebida probiótica, y que de una forma concreta cumpla funciones profilácticas o terapéuticas frente a patógenos gastro-intestinales. De forma preferente dicho uso de la cepa bacteriana en la elaboración de un alimento probiótico consiste en la elaboración de una leche fermentada, una leche bifidus y otros derivados lácteos.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la cepa bacteriana aislada en la presente invención como fermento o cultivo iniciador y cultivo bioprotector de alimentos o bebidas frente a bacterias de alteración y de interés sanitario y de forma preferente en alimentos como leches fermentadas una leche bifidus y otros derivados lácteos.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la cepa bacteriana aislada en la presente invención como cultivo bioprotector de alimentos o bebidas frente a bacterias alterantes de alimentos y de interés sanitario.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de los extractos proteicos de la presente invención como compuestos terapéuticos frente a patógenos gastrointestinales u otro tipo de bacteria patógena, preferentemente

el patógeno gastrointestinal es una cepa de la especie *Helicobacter pylori* multi-resistente.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de los extractos proteicos de la presente invención como conservantes biológicos frente a  
5 bacterias alterantes y de interés sanitario en alimentos o bebidas y de forma preferente en una leche fermentada, una leche bifidus y otros derivados lácteos.

Un cultivo de *Bifidobacterium* BIR-0304 ha sido depositado en la  
10 Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con sede en Burjasot (Valencia), el día 21 de Diciembre de 2004, correspondiéndole el número de depósito CECT 7039.

Otro cultivo de *Bifidobacterium* BIR-0307 ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT ), con sede en Burjasot (Valencia),  
15 el día 21 de Diciembre de 2004, correspondiéndole el número de depósito CECT 7040.

Otro cultivo de *Bifidobacterium* BIR-0312 ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con sede en Burjasot (Valencia),  
20 el día 21 de Diciembre de 2004, correspondiéndole el número de depósito CECT 7041.

Otro cultivo de *Bifidobacterium* BIR-0324 ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con sede en Burjasot (Valencia),  
el día 21 de Diciembre de 2004, correspondiéndole el número de depósito CECT 7042.

Otro cultivo de *Bifidobacterium* BIR-0326 ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con sede en Burjasot (Valencia),  
25 el día 21 de Diciembre de 2004, correspondiéndole el número de depósito CECT 7043.

Por último, otro cultivo de *Bifidobacterium* BIR-0349 ha sido depositado  
30 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con sede en Burjasot (Valencia), el día 21 de Diciembre de 2004, correspondiéndole el número de depósito CECT 7044.

**DESCRIPCIONES DE LAS FIGURAS**

**Figura 1.-** Representación de la tolerancia de las cepas del género *Bifidobacterium* a condiciones de estrés intestinales y tecnológicas. Se muestra un ejemplo de la capacidad de crecimiento de una de las cepas seleccionadas (*Bifidobacterium* BIR-0314) en presencia de altas concentraciones de bilis (Ox-gall; Fig. 1A) y sal (NaCl; Fig. 1B), en caldo MRS-C, a 37 °C. El crecimiento se monitorizó mediante medidas de absorbancia a 655 nm en un espectrofotómetro de placas de multipocillo.

**Figura 2.-** Representación del efecto inhibitor de las cepas del género *Bifidobacterium* frente a *Helicobacter pylori* mediante la técnica de difusión en agar. Las flechas señalan los halos de inhibición causados por los compuestos antibacterianos presentes en los extractos obtenidos a partir de los cultivos de las bifidobacterias seleccionadas. El control negativo (C) muestra la ausencia de inhibición del extracto obtenido a partir del medio de cultivo que no fue fermentado por las bifidobacterias.

**Figura 3.- A.** Representación del efecto inhibitor de las cepas del género *Bifidobacterium* crecidas en distintos medios de cultivo sobre *Salmonella typhimurium* por la técnica de la doble capa. Los medios utilizados para crecer las bifidobacterias fueron: MRSC-OX-P, MRSC con un 0,5 % de sales biliares (Ox-gall) y 0,1 g/l de pancreatina; L, leche; L-EL-G, leche con un 0,5% de extracto de levadura y un 1% de glucosa; PCL, Plate Count leche. El efecto inhibitor se determinó midiendo los halos de inhibición y está expresado en milímetros (mm)\*. **B.** Representación del efecto inhibitor de los extractos de las cepas del género *Bifidobacterium* crecidas en distintos medios de cultivo sobre *Salmonella typhimurium* por la técnica de difusión en agar. A= MRSC-OX-P, neutralizado; B= MRSC-OX-P, sin neutralizar; C=MRSC, sin neutralizar; D=MRSC, neutralizado; E=MRSC sin inocular, control negativo; F= L-EL-G sin neutralizar; G= L-EL-G neutralizado; H= L-EL-G sin inocular, control negativo.

**EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION****EJEMPLO 1 . PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO SELECTIVO DE CEPAS DEL GÉNERO *BIFIDOBACTERIUM* RESISTENTES A DIVERSAS CONDICIONES DE ESTRÉS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS.****5    *Aislamiento selectivo e identificación de los aislados.***

Se procedió al aislamiento de cepas del género *Bifidobacterium* a partir de heces de individuos sanos (adultos de entre 25-35 años de edad y niños de entre 6 y 12 meses) que no hubieran ingerido alimentos que contuvieran bifidobacterias durante al menos el mes anterior al análisis y que no hubieran sido sometidos a tratamientos con antibióticos durante los últimos seis meses. Las muestras se mantuvieron a 4° C y se analizaron sin que transcurrieran más de dos horas desde su recogida. Dos gramos de cada una de ellas se diluyeron en tampón fosfato 10 mM conteniendo una concentración de NaCl 130 mM (PBS) y se homogeneizaron en un stomacher Lab-Blender 400 (Seward Medical, Londres, UK), durante 3 min. A fin de aislar directamente sólo cepas resistentes a las condiciones ácidas de los jugos gástricos, de cada uno de los homogeneizados se tomaron muestras de 1 ml y se inocularon en caldo MRS (de Man Rogosa and Sharpe; Scharlau, Barcelona) conteniendo un 0.05% de cisteína (Sigma, St. Louis, MO; MRS-C), ajustado a pH 2 con HCl. Estas muestras se incubaron a 37 °C durante 16 h en condiciones de anaerobiosis (AnaeroGen, Oxoid, UK). Posteriormente, se hicieron diluciones decimales y alícuotas de 100 µl se sembraron en placas de agar de dos medios selectivos para el aislamiento de bifidobacterias: BSM (Fluka, Buchs, Suiza) y BFM (Nebra y Balnch, 1999). Después de tres días de incubación, se seleccionaron entre 8 y 10 colonias características de las diluciones más altas de cada medio y se analizó su morfología bajo tinción de Gram.

La identidad de los aislados se confirmó mediante PCR específica de género, de acuerdo con la metodología descrita por Kaufman *et al.* (1997. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1268-1273). Se utilizaron cebadores (LM26 y LM3) que amplifican un fragmento de 1.35 kb del gen del ARN ribosómico 16S. La diferenciación de los aislados a nivel de cepa se realizó por la técnica de

RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA)-PCR, utilizando el cebador Bif y la metodología descrita por Tynkynen *et al.* (1999. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3908-3914). De los 60 aislados, 24 fueron cepas distintas. La identificación a nivel de especie de las cepas de mayor interés por su amplio espectro de actividad antibacteriana (ver ejemplo 2) se realizó mediante el uso de PCRs múltiples y simples utilizando cebadores específicos de especie basados en secuencias del gen del ARN ribosómico 16S (Matsuki *et al.* 2003. Genus- and species-specific PCR primers for the detection and identification of Bifidobacteria Curr. Issues Intest. Microbiol. 4: 61-69).

La cepas del género *Bifidobacterium* BIR-0304, BIR-0307, BIR-0312 y BIR-0349 se asignaron a la especie *B. longum infantis*; la cepa BIR-0324 a la especie *B. catenulatum* y la cepa BIR-0326 a *B. bifidum*.

15

#### *Resistencia a condiciones de estrés gastrointestinal y tecnológicas*

La resistencia de las bifidobacterias aisladas a las condiciones ácidas de los jugos gástricos, que constituyen la primera barrera biológica que limita la viabilidad de los probióticos tras su ingestión, se confirmó para cada una de las cepas recuperadas. Para ello, se prepararon suspensiones de células ( $10^8$  células/ml) de cada cepa en PBS, conteniendo 3 g/l de pepsina (Sigma, St. Louis, MO) y ajustada a pH 2 con HCl y se incubaron a 37 °C durante un total de 120 min. A distintos tiempos (0, 90 y 120 min), incluyendo el tiempo medio de vaciado gástrico (90 min), se tomaron alícuotas para determinar la viabilidad mediante recuentos en placas de agar MRS-C. Posteriormente, se estudió la tolerancia de las cepas resistentes al pH ácido a otras condiciones de estrés, como la bilis, el NaCl y las altas temperaturas. Para conocer la tolerancia de las cepas objeto de estudio a la bilis, se evaluó su capacidad para crecer en MRS-C, al que se adicionaron diversas concentraciones (0,5-1,5 %) de Ox-gall (Sigma, St. Louis, MO). Alícuotas de 200 µl de cada medio, inoculadas al 1% con cultivos de 24 h, se cargaron en placas multipocillo y se incubaron a 37 °C. El crecimiento se monitorizó mediante medidas de absorbancia a 655 nm en un espectrofotómetro 550 Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA). Del mismo

30

modo, se determinó la tolerancia de las cepas a altas concentraciones de NaCl (3-10%) y a altas temperaturas (42-60 °C).

#### *Sensibilidad a antibióticos*

- 5           La sensibilidad de las cepas objeto de estudio se determinó mediante el uso de discos de antibióticos (Oxoid, Basingstoke, UK) y el método de difusión en agar y, en el caso del metronidazol y la claritromicina mediante el uso de E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia). 100 µl de un cultivo de 24 h se inocularon en 9 ml de MRS-C conteniendo un 0.7% de agar fundido y se vertió sobre una capa  
10 de agar sólido. Una vez solidificada la capa superior, se colocaron los discos o tiras de antibiótico en su superficie y, tras incubar a 37°C durante 24 h, se midieron los halos de inhibición.

#### **EJEMPLO 2. PROCEDIMIENTO DE SELECCIÓN DE BIFIDOBACTERIAS 15 CAPACES DE PRODUCIR PROTEÍNAS ANTIBACTERIANAS DE AMPLIO ESPECTRO Y DE EXTRACTOS CON DICHA ACTIVIDAD.**

*Detección de actividad antibacteriana en cultivos y extractos obtenidos a partir de ellos y análisis del espectro de inhibición.*

- 20           La actividad antibacteriana de las cepas del género *Bifidobacterium* aisladas selectivamente por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, se determinó mediante dos métodos: (i) por la técnica de la doble capa y (ii) por la técnica de difusión en agar.

- 25           La actividad antibacteriana de cada cepa se evaluó globalmente mediante la técnica de la doble capa utilizando como microorganismos indicadores dos bacterias Gram-positivas (*Listeria innocua* y *Lactococcus lactis*). Las bifidobacterias potencialmente activas se sembraron en placas de MRS-C en líneas de unos 2 cm y se incubaron en condiciones óptimas durante 16 h y su desarrollo posterior se inhibió con cloroformo. El microorganismo  
30 indicador se inoculó a una concentración de  $10^4$ - $10^5$  CFU/ml en 10 ml de agar semisólido adecuado, se vertió sobre la capa de agar del microorganismo protector y se incubó en condiciones óptimas para el primero. *Listeria innocua* se cultivó en Brain Herat (BH) y *L. lactis* en M17 y ambos se incubaron en

aerobiosis a 30°C. Tras 24 h se midieron los posibles halos de inhibición alrededor de las líneas del cultivo protector.

A fin de evaluar la actividad antibacteriana debida a la secreción de compuestos de naturaleza proteica se utilizó la técnica de difusión en agar. 10 ml de caldo MRS-C se inocularon al 1% con un cultivo de 24 h de cada bifidobacteria y se incubaron durante 16 h a 37°C. Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación (12.000 g, 15 min, 4°C) y se concentraron por liofilización. Los líofilos se resuspendieron en 1 ml de tampón fosfato 50 mM a pH 6.5, se neutralizaron con NaOH hasta alcanzar un pH de 6,5 para eliminar los efectos de los ácido orgánicos generados por fermentación, y se esterilizaron por filtración. Estas muestras constituyeron los extractos crudos en los que se determinó la posible actividad de proteínas antibacterianas producidas por las bifidobacterias. El microorganismo indicador se inoculó a una concentración de  $10^4$ - $10^5$  células/ml en 10 ml de agar semisólido adecuado y se vertió sobre una capa sólida de agar del mismo medio. Tras solidificar, se perforaron pocillos de 5 mm, a los que se añadieron 40 µl del extracto libre de células y neutralizado de cada bifidobacteria. Se dejó difundir 1 h a 4°C y, posteriormente, se incubó en las condiciones óptimas para cada microorganismo indicador. Como microorganismos indicadores, inicialmente, se utilizaron dos bacterias Gram-positivas (*Listeria innocua* y *Lactococcus lactis*) y, posteriormente, se amplió el espectro incluyendo un amplio número de bacterias alterantes y patógenos Gram-positivos y Gram-negativos. Entre estos se estudiaron los siguientes indicadores: (i) cepas alterantes de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* que se cultivaron en MRS, y del género *Carnobacterium* que se cultivaron en agar APT y se incubaron a 30°C y en microaerofilia; (ii) cepas alterantes del género *Brochothrix* que se cultivaron en agar STAA y se incubaron a 30°C y en aerobiosis; (iii) cepas del género *Enterococcus* que se cultivaron en BH y se incubaron a 37 °C, en aerobiosis; (iv) cepas del género *Clostridium* que se cultivaron en RCM a 37°C, en anaerobiosis; (v) cepas del género *Listeria* y *Enterobacter* que se cultivaron en BH e incubaron a 30 °C, en aerobiosis; (vi) cepas de los géneros *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Salmonella* y *Vibrio*, que se cultivaron en BH y se incubaron a 37 °C, en aerobiosis; (vii) cepas del género *Aeromonas* que se



cultivaron en BH y se incubaron a 20°C, en aerobiosis; (viii) cepas de los géneros *Helicobacter* y *Campylobacter*, que se cultivaron en agar sangre de caballo (ASC) y de oveja (ASO), respectivamente, y se incubaron a 37 °C en microaerofilia; y (ix) cepas del género *Arcobacter* que se cultivaron en agar

5 ASO y se incubaron a 30°C, en aerobiosis. También se incluyó como indicador una cepa del mismo género y de la especie *B. bifidum*, que se cultivó en agar TPY y se incubó a 37°C, en anaerobiosis. Todos los medios de cultivo fueron de Oxoid (Basingstoke, UK) excepto el agar MRS y STAA que fue de Scharlau (Barcelona, España).

**Tabla I.- Representación del espectro de inhibición de las cepas del género *Bifidobacterium* seleccionadas mediante la técnica de difusión en agar.**

| <b>Bacteria</b><br><b>Indicadora</b> | <b>Espectro de inhibición (mm)* de las cepas <i>Bifidobacterium</i></b> |          |          |          |          |          |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                                      | BIR-0304                                                                | BIR-0307 | BIR-0312 | BIR-0324 | BIR-0326 | BIR-0349 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i>       | 9,2                                                                     | -        | 9,1      | -        | 11,1     | 14,4     |
| <i>Lactococcus lactis</i>            | 10,1                                                                    | 9,2      | 14,3     | 10,1     | 10,5     | 19,2     |
| <i>Leuconostoc spp.</i>              | -                                                                       | -        | -        | -        | -        | 10,3     |
| <i>Enterococcus faecium</i>          | -                                                                       | -        | -        | -        | -        | -        |
| <i>Carnobacterium piscicola</i>      | 10,1                                                                    | -        | 9,0      | 9,2      | -        | -        |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i>       | -                                                                       | -        | 9,0      | -        | -        | -        |
| <i>Brochothrix thermosphacta</i>     | 16,3                                                                    | 15,1     | 14,3     | 12,1     | -        | -        |
| <i>Listeria innocua</i>              | 17,1                                                                    | 18,2     | 16,6     | 15,5     | 10,3     | 10,1     |
| <i>Listeria monocytogenes</i>        | 15,3                                                                    | -        | 11,2     | 10,3     | 11,2     | -        |
| <i>Clostridium difficile</i>         | 9,3                                                                     | 13,3     | 12,3     | 9,2      | 10,0     | -        |
| <i>Staphylococcus aureus</i>         | 10,2                                                                    | 9,1      | 15,2     | -        | 19,4     | -        |
| <i>Escherichia coli</i>              | 13,5                                                                    | 18,0     | 14,0     | 15,2     | 15,3     | 10,4     |
| <i>E. coli</i> O157:H7               | -                                                                       | -        | -        | -        | -        | 10,2     |
| <i>Salmonella typhimurium</i>        | 14,0                                                                    | 15,2     | 12,0     | 14,2     | 9,0      | -        |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>        | -                                                                       | -        | -        | -        | -        | 9,2      |
| <i>Aeromonas salmonicida</i>         | -                                                                       | -        | 9,0      | -        | 9,0      | 10,0     |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i>       | -                                                                       | -        | -        | -        | 9,3      | 9,0      |
| <i>Helicobacter pylori</i>           | 10,0                                                                    | 9,1      | 9,3      | 12,3     | 9,0      | -        |
| <i>Campylobacter coli</i>            | 9,1                                                                     | 9,2      | 13,2     | 10,1     | 15,3     | -        |
| <i>Arcobacter butzleri</i>           | 13,3                                                                    | 9,0      | 10,2     | 11,5     | 12,4     | -        |

\*, El efecto inhibitor de los extractos, libres de células y neutralizados, obtenidos a partir de los cultivos de las bifidobacterias seleccionadas frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas se determinó mediante medidas de los halos de inhibición y está expresado en milímetros (mm)\*. El signo (-) indica ausencia de inhibición.

Posteriormente, el estudio se orientó hacia la detección de la actividad antibacteriana debida exclusivamente a la secreción de compuestos de naturaleza proteica, por lo que se utilizó sólo la técnica de difusión en agar y extractos neutralizados, y se amplió el número de microorganismos indicadores, incluyendo bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Se seleccionaron, finalmente, las seis cepas que mostraron el espectro de inhibición más amplio (ver Tabla I). Entre ellas, la cepa *Bifidobacterium* BIR-0312 fue la que inhibió un número mayor de microorganismos indicadores. Los perfiles de inhibición de las cepas *Bifidobacterium* BIR-0304, BIR-0307, BIR-0312, BIR-0324 y BIR-0326 fueron similares mientras que la cepa BIR-0349 mostró un espectro más restringido. La mayoría de las bacterias potencialmente patógenas Gram-positivas (*Clostridium difficile*, *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) y Gram-negativas (*Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli* y *Arcobacter butzleri*) fueron inhibidas por, al menos, cuatro de las bifidobacterias seleccionadas.

#### *Caracterización de los compuestos responsables de la actividad antibacteriana*

La caracterización de los compuestos responsables de la actividad antibacteriana de los extractos neutralizados, obtenidos por el procedimiento descrito en el apartado anterior, se realizó mediante los siguientes ensayos:

- (i) Sensibilidad a diversos enzimas proteolíticos (tripsina, proteinasa K, proteasa A, pepsina y catepsina B) lipolíticos (lipasa A) y amilolíticos ( $\alpha$ -amilasa) suministrados por Sigma (St. Louis, MO). Los extractos se incubaron en presencia de 2 mg/ml de cada enzima y fueron incubados en condiciones óptimas de actuación para cada una de ellas, durante 2 h. Tras cada tratamiento se determinó la actividad residual utilizando como control los extractos no incubados con ningún enzima.
- (ii) Estabilidad a la temperatura y pH. Los extractos se incubaron a distintas temperaturas (80 y 100 °C) durante 10-30 min y a distintos pH (3-10), durante 1 h. Tras cada tratamiento se determinó la actividad residual utilizando controles no tratados.

- (iii) Masa molecular aparente. Se determinó mediante el uso de sistemas de filtración-centrifugación (Millipore, Bedford, Mass) con membranas de límites de exclusión entre 3 y 100 kDa. Los extractos se fraccionaron de forma progresiva con filtros de distinto límite de exclusión y se determinó en que fracciones (retenido y filtrado) se concentraba la actividad.

Como microorganismos indicadores se utilizaron bacterias Gram-positivas (*L. innocua* y *L. lactis*) y Gram-negativas (*H. pylori*).

### 10 EJEMPLO 3. PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS DE NATURALEZA PROTEICA EN CONDICIONES INTESTINALES.

- La capacidad de las cepas seleccionadas del género *Bifidobacterium* para producir compuestos antibacterianos en las condiciones propias del tracto intestinal se determinó por la técnica de la doble capa y la de difusión en agar.
- 15 En el primer caso las cepas seleccionadas se inocularon en líneas en agar MRS-C conteniendo 0.5 % de bilis (Ox-gall, sigma, St. Louis, MO) y 0,1 g/l de pancreatina (Sigma, St. Louis, MO), y se incubaron a 37 °C, durante 16 h. Sobre estas placas de agar se vertieron los cultivos del microorganismo indicador (*Listeria innocua* y *Salmonella typhimurium*) y se incubaron durante
- 20 24 h a temperatura óptima para el indicador. En el segundo ensayo, se estudió el efecto inhibidor de los extractos obtenidos a partir de cultivos de las seis bifidobacterias crecidas en caldo MRS-C, conteniendo 0.5 % de bilis y 0,1 g/l de pancreatina. Alícuotas (40 µl) de estos extractos se adicionaron a los pocillos perforados en placas de agar semisólido en las que estaba inoculado el
- 25 microorganismo indicador (*Listeria innocua* y *Salmonella typhimurium*), se dejaron difundir a 4 °C, durante 1 h y, posteriormente, se incubaron en condiciones óptimas para cada indicador durante 24 h. Tras el período de incubación se midieron los halos de inhibición alrededor de las líneas o los pocillos.

#### **EJEMPLO 4. CAPACIDAD PARA CRECER, FERMENTAR Y COAGULAR LA LECHE Y PARA PRODUCIR COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS DE NATURALEZA PROTEICA EN ESTE MEDIO.**

La capacidad de las bifidobacterias para crecer, fermentar y coagular la  
5 leche se determinó inoculando al 1% cultivos de 24 h de cada una de ellas en  
leche desnatada al 10% (L) y leche desnatada al 10 %, conteniendo un 0.5%  
de extracto de levadura y un 1% de glucosa (L-EL-G). Los cultivos se incubaron  
a 37 °C y a distintos tiempos se determinó la viabilidad de las bifidobacterias  
mediante recuentos en placas de agar MRS-C, el pH, la consistencia y el  
10 aroma de las leches cultivadas.

La capacidad de las cepas seleccionadas para producir compuestos  
antibacterianos *in situ* en los medios basados en leche (L, L-EL-G y PCL) se  
determinó por la técnica de la doble capa y por la de difusión en agar. En el  
primer caso, las cepas seleccionadas se inocularon en líneas en los medios  
15 basados en leche descritos y se incubaron a 37 °C, durante 16 h. Sobre estas  
placas de agar se vertieron los cultivos del microorganismo indicador (*Listeria  
innocua* y *Salmonella typhimurium*) y se incubaron, durante 24 h, a temperatura  
óptima para el indicador. En el segundo ensayo, se estudió el efecto inhibitor  
de los extractos obtenidos a partir de cultivos de las bifidobacterias en L y L-EL-  
20 L tras su incubación durante 16 h a 37 °C, en anaerobiosis. Alícuotas (40 µl) de  
los extractos, neutralizados y sin neutralizar, se adicionaron a los pocillos  
perforados en placas de agar semisólido en las que estaba inoculado el  
microorganismo indicador (*Listeria innocua* y *Salmonella typhimurium*), se  
dejaron difundir a 4 °C, durante 1 h y, posteriormente, se incubaron en  
25 condiciones óptimas para cada indicador durante 24 h. Tras el período de  
incubación se midieron los halos de inhibición alrededor de las líneas de  
siembra y de los pocillos, en cada caso.

#### **EJEMPLO 5. FUNCIÓN BIOPROTECTORA DE LAS CEPAS DEL GÉNERO 30 *Bifidobacterium* Y DE SUS EXTRACTOS EN LECHE.**

Se utilizó leche descremada al 10% como modelo de un alimento en el  
que las cepas seleccionadas podrían desempeñar una función bioprotectora  
frente a bacterias alterantes y patógenas. La leche, previamente esterilizada,

se inoculó con las bifidobacterias bioprotectoras, de modo que alcanzaran niveles de  $10^7$  UFC/ml, y se contaminaron con cultivos de *Listeria innocua* y *Salmonella typhimurium*, de modo que alcanzaran niveles finales de  $10^4$ - $10^5$  UFC/ml, y se incubaron a 37°C, durante 48 h. Paralelamente, se analizaron  
5 controles en los que sólo se inoculó la bacteria contaminante. A distintos tiempos se tomaron alícuotas y se evaluó comparativamente la viabilidad de los microorganismos contaminantes en presencia o ausencia de la bifidobacteria bioprotectora. Los recuentos de *Listeria* se hicieron en agar Palcam (Merck, Darmstadt, Alemania) y los de *Salmonella* en agar Hektoen (Scharlau,  
10 Barcelona, España) incubando en aerobiosis a 30 y 37°C, respectivamente, durante 48 h.

A fin de estudiar el efecto bioprotector de los compuestos antimicrobianos secretados al medio por las bifidobacterias y adicionados, en forma de extractos a la leche, previamente inoculada con el microorganismo  
15 contaminante (*Listeria innocua*;  $10^5$  UFC/ml), se le añadieron 0.2 volúmenes del extracto obtenido en MRS-C, neutralizado y sin neutralizar. Se incubó a 37°C durante 48 h. Paralelamente, se analizaron controles en los que se inoculó la bacteria contaminante y un volumen equivalente de medio no fermentado. Como en el caso anterior se evaluó la viabilidad del  
20 microorganismo contaminante a distintos tiempos mediante recuentos en placa.

Las cepas del género *Bifidobacterium* de la presente invención seleccionadas, así como sus metabolitos adicionados en forma de extractos, actúan como inhibidores del desarrollo de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en alimentos. Las bifidobacterias seleccionadas actuaron como  
25 cultivos bioprotectores en leche, reduciendo la viabilidad de *Salmonella* en, al menos, dos unidades logarítmicas y de *Listeria* en, al menos, seis (ver Tabla II). Los efectos protectores consecuencia directa de los metabolitos secretados por las bifidobacterias, se confirmaron por adición exclusiva a la leche contaminada de sus extractos. La adición de extractos no neutralizados, en los que se  
30 sumaría los efectos de los ácidos orgánicos y los de compuestos de naturaleza proteica, produjeron una reducción de los niveles de *Listeria* a valores inferiores a 100 UFC/ml y la adición de extractos neutralizados, con los que se evaluaría inicialmente el efecto de compuestos de naturaleza proteica, provocó

reducciones de la bacteria contaminante de, al menos, dos unidades logarítmicas. Por tanto, los compuestos de naturaleza proteica en forma de extractos así como los cultivos de las cepas del género *Bifidobacterium* que los producen pueden actuar, en alimentos como la leche, como bioprotectores inhibiendo el desarrollo de microorganismos contaminantes (Ejemplo 5).

**Tabla II.- Representación del efecto inhibidor de las bifidobacterias seleccionadas sobre *Listeria innocua* y *Salmonella typhimurium* en co-cultivos en leche y por adición directa de los extractos, obtenidos a partir de los sobrenadantes de los cultivos de las bifidobacterias, a cultivos simples de cada uno de los microorganismos en leche.**

| Inóculo en leche                                                               | Viabilidad del microorganismo contaminante (UFC/ml) |                   |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------|
|                                                                                | Tiempo de Incubación (h)                            |                   |
|                                                                                | 0 h                                                 | 48 h              |
| <i>L.innocua</i>                                                               | $1,3 \times 10^5$                                   | $5,5 \times 10^7$ |
| <i>L.innocua</i> + <i>Bifidobacterium</i> BIR-0326                             | $1,3 \times 10^5$                                   | $<10^2$           |
| <i>L.innocua</i> + medio no inoculado                                          | $6,0 \times 10^5$                                   | $4,4 \times 10^8$ |
| <i>L.innocua</i> + extracto neutralizado de <i>Bifidobacterium</i> BIR-0326    | $6,0 \times 10^5$                                   | $2,0 \times 10^6$ |
| <i>L.innocua</i> + extracto sin neutralizar de <i>Bifidobacterium</i> BIR-0326 | $6,0 \times 10^5$                                   | $<10^2$           |
| <i>S. typhimurium</i>                                                          | $4,5 \times 10^4$                                   | $1,5 \times 10^5$ |
| <i>S. typhimurium</i> + <i>Bifidobacterium</i> BIR-0324                        | $4,5 \times 10^4$                                   | $<10^2$           |

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Cepa bacteriana aislada útil como producto probiótico caracterizada porque es una cepa aislada de heces de humanos sanos perteneciente al género *Bifidobacterium*, porque produce compuestos antibacterianos de naturaleza proteica con características similares a las bacteriocinas de amplio espectro de acción que comprende bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y porque es resistente a condiciones de estrés gastrointestinal y tecnológico, pertenecientes al siguiente grupo: a condiciones del jugo gástrico, altas concentraciones de sales biliares, altas concentraciones de cloruro sódico y altas temperaturas.
- 2.- Cepa bacteriana aislada según la reivindicación 1 caracterizada por la resistencia a las condiciones del jugo gástrico.
- 3.- Cepa bacteriana aislada según la reivindicación 1 caracterizada porque la tolerancia a altas concentraciones sales biliares se encuentra entre 1-5% de bilis.
- 4.- Cepa bacteriana aislada según la reivindicación 1 caracterizada porque la tolerancia a altas concentraciones de cloruro sódico se encuentra entre el 2-10%.
5. Cepa bacteriana aislada según la reivindicación 1 caracterizada porque la tolerancia a altas temperaturas se encuentra entre 42-60°C.
- 6.- Cepa bacteriana aislada según las reivindicaciones 1 a la 5 caracterizada porque pertenece al siguiente grupo: *Bifidobacterium* BIR-0304 (CECT 7039), *Bifidobacterium* BIR-0307 (CECT 7040), *Bifidobacterium* BIR-0312 (CECT 7041), *Bifidobacterium* BIR-0324 (CECT 7042), *Bifidobacterium* BIR-0326 (CECT 7043) y *Bifidobacterium* BIR-0349 (CECT 7044).
- 7.- Extracto proteico derivado del metabolismo de la cepa bacteriana de las reivindicaciones 1 a la 6 caracterizado porque contiene compuestos de naturaleza proteica con características similares a las bacteriocinas con propiedades antibacterianas de amplio espectro (frente a Gram-positivas y Gram-negativas).



8.- Extracto proteico según la reivindicación 7 caracterizado porque contiene compuestos con actividad antimicrobiana que:

- a) tienen una masa molecular aparente menor de 100 kDa
- b) son termoestables
- 5 c) presentan estabilidad y actividad en un intervalo de pH de 2-11
- d) son sensibles a enzimas proteolíticas
- e) son resistentes a enzimas lipolíticas y amilolíticas

9.- Procedimiento de obtención de extracto proteico según las reivindicaciones 7 y 8 caracterizado porque se obtiene a partir de los sobrenadantes libres de  
10 células de cultivos de las cepas bacterianas aisladas según las reivindicaciones 1 a la 6 en condiciones adecuadas.

10.- Procedimiento de obtención de extracto proteico según la reivindicación 9 caracterizado porque se obtiene mediante liofilización, centrifugación, precipitación, extracción o filtración.

15 11.- Uso de la cepa bacteriana aislada según las reivindicaciones 1 a la 6 en la elaboración de un alimento o bebida probiótica.

12.- Uso de la cepa bacteriana aislada según la reivindicación 11 caracterizado porque el alimento o bebida probiótica cumple funciones profilácticas o terapéuticas frente a patógenos gastro-intestinales.

20 13.- Uso de la cepa bacteriana aislada según las reivindicaciones 11 y 12 caracterizado porque el alimento o bebida probiótica consiste, entre otros, en una leche fermentada, leche bifidus y otros derivados lácteos.

14.- Uso de la cepa bacteriana aislada según las reivindicaciones 1 a la 6 como fermento o cultivo iniciador y cultivo bioprotector de alimentos o bebidas frente  
25 a bacterias de alteración y de interés sanitario.

15.- Uso de la cepa bacteriana aislada según la reivindicación 14 caracterizado porque el fermento se utiliza para la elaboración de, entre otros, leches fermentadas, leches bifidus y otros derivados lácteos.

16.- Uso del extracto proteico según las reivindicaciones 7 y 8 como conservante biológico de alimentos o bebidas frente a bacterias alterantes de alimentos y de interés sanitario.

5 17.- Uso del extracto proteico según las reivindicaciones 7 y 8 como compuesto terapéutico frente a patógenos gastrointestinales u otro tipo de bacteria patógena.

18.- Uso del extracto proteico según la reivindicación 17 caracterizado porque el patógeno gastrointestinal es una cepa de la especie *Helicobacter pylori* (multi)-resistente.

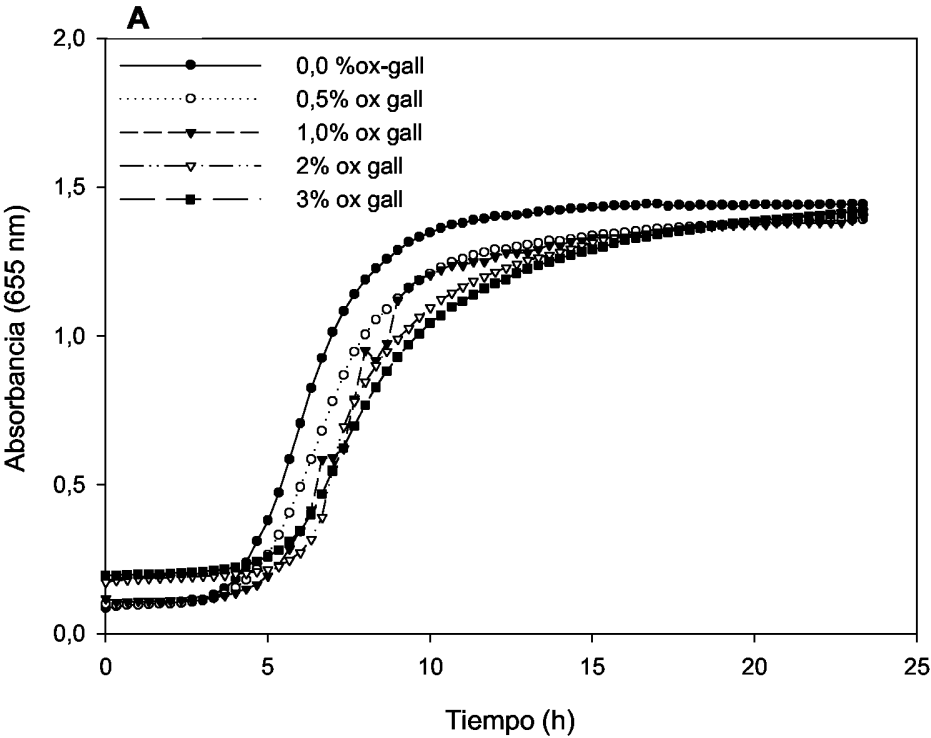


Figura 1 (A)

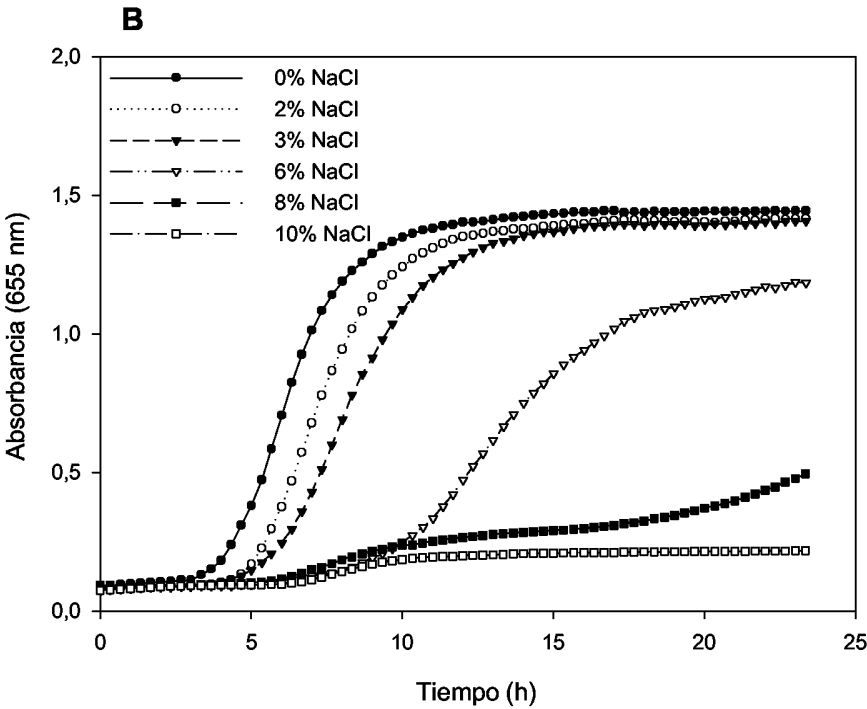
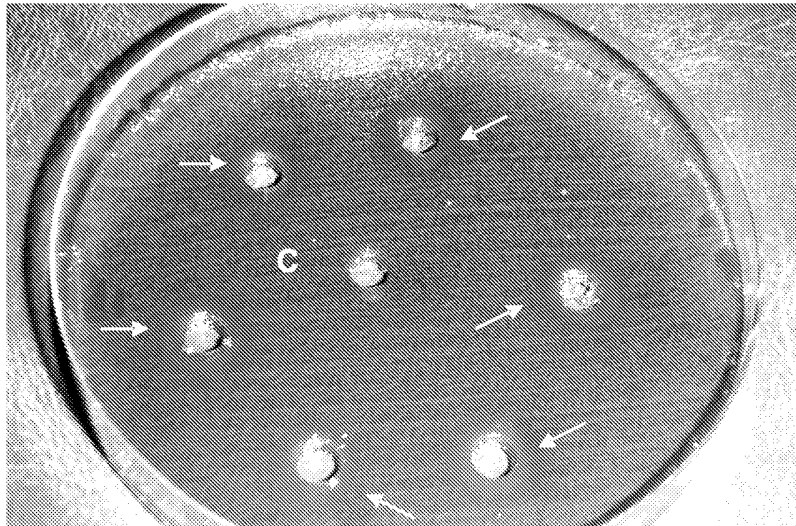


Figura 1 (B)

2/3

**FIGURA 2**

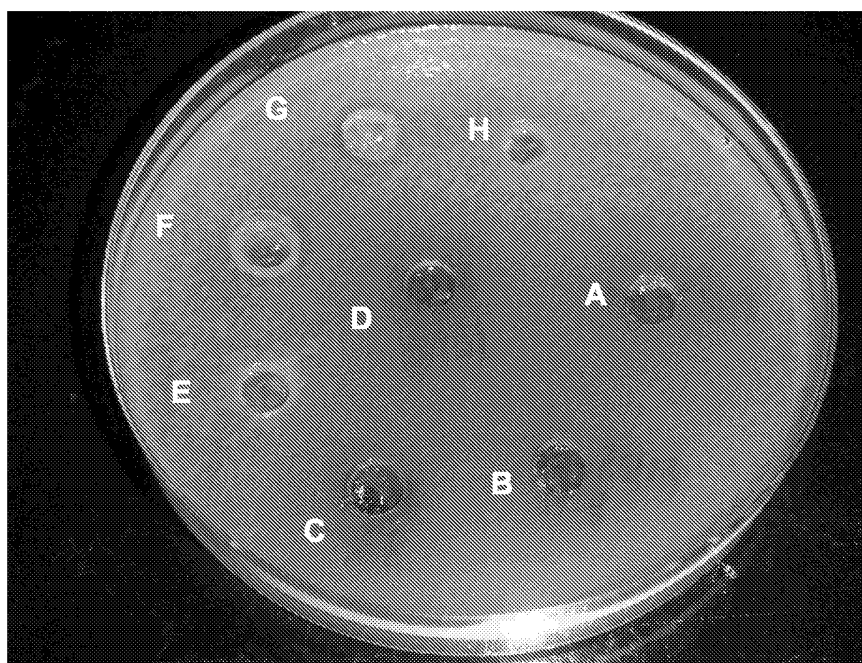


3/3

FIGURA 3A

| Cepas del género<br><i>Bifidobacterium</i> | Efecto inhibidor (mm)* sobre <i>S.</i><br><i>typhimurium</i> |   |        |     |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---|--------|-----|
| Medios de cultivo                          | MRS-OX-P                                                     | L | L-EL-G | PCL |
| BIR-0307                                   | 10                                                           | 4 | 8      | -   |
| BIR-0326                                   | 20                                                           | 3 | 10     | 3   |
| BIR-0312                                   | 20                                                           | - | 12     | 5   |
| BIR-0349                                   | 5                                                            | - | -      | -   |
| BIR-0304                                   | 24                                                           | 3 | 12     | 3   |
| BIR-0324                                   | 18                                                           | 6 | 9      | 5   |

FIGURA 3B



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES 2005/070173

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**see on attached page**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, PAJ, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| P,X       | COLLADO, M.C et al. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal Bifidobacterium stains. Journal of food protection, 2005, vol 68, <b>pages</b> 1034-1040.                                 | 1-18                  |
| X         | OLIVEIRA, M.C. C. M. y BERNARDO F..M.A. Bacteriocins with broad inhibitory spectrum against food-borne pathogens. ASM 101st General Meeting, session 14. P. Abstract 64, 2001.                                   | 1,2,5,7,11-16         |
| X         | YILDIRIM, Z y JOHNSON, M. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by Bifidobacterium bifidum NCFB 1454. Journal of Food Protection, 1998, vol 61, <b>pages</b> 47-51. | 1,2,6,7               |
| X         | GIBSON, G.R y WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. Journal of Applied Bacteriology, 1994, vol. 77, <b>pages</b> 412-420.                                       | 1,2,7, 9,10           |
| X         | WO 9835014 A2 (FORBAIRT Y UNIVERSITY OF CORK) 13.08.1998, reivindicaciones 6-11, <b>page</b> 6, line 15 - <b>page</b> 9, line 32, table 6.                                                                       | 7-10,16-18            |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                              |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                                                                | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                     |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date                                                                                            | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                    |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                                                                |                                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Date of the actual completion of the international search<br><b>17 April 2006 (17.04.2006)</b> | Date of mailing of the international search report<br><b>26 April 2006 (26.04.2006)</b> |
| Name and mailing address of the ISA/<br><br>Facsimile No.                                      | Authorized officer<br><br>Telephone No.                                                 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ ES 2005/070173

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see on additional page**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2005/070173

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                 | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | MOTA-MEIRA M. et al. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. Antimicrobial Agents and chemotherapy, 2000, Vol. 44 (1) <b>pages</b> 24-29.                                                         | 7-10,16-18            |
| A         | FUJIWARA, S et al. Proteinaceous factor in culture supernatant fluids of bifidobacteria wich prevents the binding of enteroxigenic Escherichia coli to gangliotetraosylceramide. Applies and Enviromental Microbiology, 1997, <b>pages</b> 506-512 | 1,6,7,9-17            |
| A         | WO 0301097 A1 (ALIMENTARY HEALTH LIMITED) 06.02.2003, <b>the whole document</b>                                                                                                                                                                    | 1-6, 11-15            |
| A         | WO 0198516 A2 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) 27.12.2001, <b>the whole document</b>                                                                                                                                                       |                       |
| A         | TOURE, R et al. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against Listeria monocytogenes. Journal of Applied Microbiology, 2003, vol. 95, <b>pages</b> 1058-1069.                                |                       |



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2005/070173

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                                                                                                                                                 | Publication<br>date                                                                                                                               |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WO 9835014 A                              | 13.08.1998          | CA 2280704 A<br>NO 993818 A<br>EP 1002051 A<br>NZ 337505 A<br>JP 2002514068 T<br>AU 748744 B<br>US 2004038379 A<br>US 2004214304 A<br>MX P                                 | 13.08.1998<br>11.10.1999<br>24.05.2000<br>27.07.2001<br>14.05.2002<br>13.06.2002<br>26.02.2004<br>28.10.2004<br>19.04.2005                        |
| -----<br>WO03010297 A                     | -----<br>06.02.2003 | -----<br>RU2004101955 A<br>ZA200400555 A<br>MXPA04000738 A<br>JP2005508617 T<br>IE20020626 A<br>EP1409644 A<br>CN1561387 A<br>CA2454803 A<br>BR0211442 A<br>US2003092163 A | -----<br>10.05.2005<br>21.09.2004<br>08.07.2004<br>07.04.2005<br>19.03.2003<br>21.04.2004<br>05.01.2005<br>06.02.2003<br>09.11.2004<br>15.05.2003 |
| -----<br>WO 0198516 A                     | -----<br>27.12.2001 | -----<br>AU 7201101 A<br>US 2002058326 A<br>US 6746672 B<br>EP 1294851 A<br>US 2004191233 A                                                                                | -----<br>02.01.2002<br>16.05.2002<br>08.06.2004<br>26.03.2003<br>30.09.2004                                                                       |
| -----                                     | -----               | -----                                                                                                                                                                      | -----                                                                                                                                             |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES 2005/070173

**IPC**

*C12N 1/20 (2006.01)*

*C12P 21/00 (2006.01)*

*A23L 1/03 (2006.01)*

*A61K 35/74 (2006.01)*

*C12R 1/04 (2006.01)*

Continuation of Box III

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

Claims 6 to 18 (in part):

*Bifidobacterium* strain BIR-0304 (CECT 7039), protein extract obtained therefrom, method for obtaining it, and use of same.

Claims 6 to 18 (in part):

*Bifidobacterium* strain BIR-0307 (CECT 7040), protein extract obtained therefrom, method for obtaining it, and use of same.

Claims 6 to 18 (in part):

*Bifidobacterium* strain BIR-0312 (CECT 7041), protein extract obtained therefrom, method for obtaining it, and use of same.

Claims 6 to 18 (in part):

*Bifidobacterium* strain BIR-0324 (CECT 7042), protein extract obtained therefrom, method for obtaining it, and use of same.

Claims 6 to 18 (in part):

*Bifidobacterium* strain BIR-0326 (CECT 7043), protein extract obtained therefrom, method for obtaining it, and use of same.

Claims 6 to 18 (in part):

*Bifidobacterium* strain BIR-0349 (CECT 7044), protein extract obtained therefrom, method for obtaining it, and use of same.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/ ES 2005/070173

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, PAJ, BIOSIS

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                    | Relevante para las reivindicaciones n° |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| P,X        | COLLADO, M.C et al. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal Bifidobacterium stains. Journal of food protection, 2005, vol 68, páginas 1034-1040.                                 | 1-18                                   |
| X          | OLIVEIRA , M.C. C. M. y BERNARDO F..M.A. Bacteriocins with broad inhibitory spectrum against food-borne pathogens. ASM 101st General Meeting, session 14. P. Abstract 64, 2001.                             | 1,2,5,7,11-16                          |
| X          | YILDIRIM, Z y JOHNSON, M. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by Bifidobacterium bifidum NCFB 1454. Journal of Food Protection, 1998, vol 61, páginas 47-51. | 1,2,6,7                                |
| X          | GIBSON, G.R y WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. Journal of Applied Bacteriology, 1994, vol. 77, páginas 412-420.                                       | 1,2,7, 9,10                            |
| X          | WO 9835014 A2 (FORBAIRT Y UNIVERSITY OF CORK) 13.08.1998, reivindicaciones 6-11, página 6, línea 15-página 9, línea 32, tabla 6.                                                                            | 7-10,16-18                             |

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

|                                                                                                                                                                                              |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Categorías especiales de documentos citados:                                                                                                                                               | "T" | documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.     |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.                                                                                      | "X" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.                                                                                    |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.                                                                   | "Y" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" | documento que forma parte de la misma familia de patentes.                                                                                                                                                                                                                 |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.                                                                           |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.                                                         |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

17.04.2006 (17 de abril de 2006)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

26 ABRIL 2006 (26-04-2006)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.  
Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

A. Polo Díez

Nº de teléfono + 34 91 349 5524

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2005/070173

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
  
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
  
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

## VER HOJA ADICIONAL

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
  
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
  
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
  
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2005/070173

| C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |                                                                                                                                                                                                                                          |                                        |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Categoría*                                           | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                 | Relevante para las reivindicaciones n° |
| X                                                    | MOTA-MEIRA M. et al. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. Antimicrobial Agents and chemotherapy, 2000, Vol. 44 (1) páginas 24-29.                                                    | 7-10,16-18                             |
| A                                                    | FUJIWARA, S et al. Proteinaceous factor in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic Escherichia coli to ganglioside GM1. Applied and Environmental Microbiology, 1997, páginas 506-512 | 1,6,7,9-17                             |
| A                                                    | WO 0301097 A1 (ALIMENTARY HEALTH LIMITED) 06.02.2003, todo el documento.                                                                                                                                                                 | 1-6, 11-15                             |
| A                                                    | WO 0198516 A2 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) 27.12.2001, todo el documento.                                                                                                                                                    |                                        |
| A                                                    | TOURE, R et al. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against Listeria monocytogenes. Journal of Applied Microbiology, 2003, vol. 95, páginas 1058-1069.                           |                                        |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2005/070173

| Documento de patente citado<br>en el informe de búsqueda | Fecha de<br>publicación | Miembro(s) de la<br>familia de patentes                                                                                                                           | Fecha de<br>publicación                                                                                                                  |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WO 9835014 A                                             | 13.08.1998              | CA 2280704 A<br>NO 993818 A<br>EP 1002051 A<br>NZ 337505 A<br>JP 2002514068 T<br>AU 748744 B<br>US 2004038379 A<br>US 2004214304 A<br>MX P                        | 13.08.1998<br>11.10.1999<br>24.05.2000<br>27.07.2001<br>14.05.2002<br>13.06.2002<br>26.02.2004<br>28.10.2004<br>19.04.2005               |
| WO03010297 A                                             | 06.02.2003              | RU2004101955 A<br>ZA200400555 A<br>MXPA04000738 A<br>JP2005508617 T<br>IE20020626 A<br>EP1409644 A<br>CN1561387 A<br>CA2454803 A<br>BR0211442 A<br>US2003092163 A | 10.05.2005<br>21.09.2004<br>08.07.2004<br>07.04.2005<br>19.03.2003<br>21.04.2004<br>05.01.2005<br>06.02.2003<br>09.11.2004<br>15.05.2003 |
| WO 0198516 A                                             | 27.12.2001              | AU 7201101 A<br>US 2002058326 A<br>US 6746672 B<br>EP 1294851 A<br>US 2004191233 A                                                                                | 02.01.2002<br>16.05.2002<br>08.06.2004<br>26.03.2003<br>30.09.2004                                                                       |

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

*C12N 1/20 (2006.01)*

*C12P 21/00 (2006.01)*

*A23L 1/03 (2006.01)*

*A61K 35/74 (2006.01)*

*C12R 1/04 (2006.01)*



Reivindicaciones 6-18 (parte): Cepa Bifidobacterium BIR-0304 (CECT 7039), extracto proteico obtenido de ella, procedimiento para obtenerlo y uso de los mismos.

Reivindicaciones 6-18 (parte): Cepa Bifidobacterium BIR-0307(CECT 7040), extracto proteico obtenido de ella, procedimiento para obtenerlo y uso de los mismos.

Reivindicaciones 6-18 (parte): Cepa Bifidobacterium BIR-0312 (CECT 7041), extracto proteico obtenido de ella, procedimiento para obtenerlo y uso de los mismos.

Reivindicaciones 6-18 (parte): Cepa Bifidobacterium BIR-0324 (CECT 7042), extracto proteico obtenido de ella, procedimiento para obtenerlo y uso de los mismos.

Reivindicaciones 6-18 (parte): Cepa Bifidobacterium BIR-0326 (CECT 7043), extracto proteico obtenido de ella, procedimiento para obtenerlo y uso de los mismos.

Reivindicaciones 6-18 (parte): Cepa Bifidobacterium BIR-0349 (CECT 7044), extracto proteico obtenido de ella, procedimiento para obtenerlo y uso de los mismos.