



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 119**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02742853 .1**

96 Fecha de presentación : **21.06.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1401457**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2004**

54

Título: **Cepa del microorganismo *Lactobacillus fermentum* ME-3 como nuevo probiótico antioxidante.**

30

Prioridad: **29.06.2001 EE 200100356**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.04.2011

73

Titular/es: **University of Tartu
Ülikooli 18
50090 Tartu, EE**

72

Inventor/es: **Mikelsaar, Marika;
Zilmer, Mihkel;
Kullisaar, Tiit;
Annuk, Heidi y
Songisepp, Epp**

74

Agente: **Diéguez Garbayo, Pedro**

ES 2 356 119 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cepa del microorganismo *Lactobacillus fermentum* me-3 como nuevo probiótico antioxidante.

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a la biotecnología y se usará como un nuevo probiótico aplicado en la producción de productos lácteos (yogur, queso) para reducir el estrés oxidativo en sangre humana.

TÉCNICA PRECEDENTE

10 Los probióticos son aditivos alimentarios microbianos vivos, que tienen un efecto beneficioso sobre el equilibrio microbiológico del intestino y la salud humana. Los probióticos se usan como un alimento funcional. Un alimento funcional es un producto alimenticio, consumido adicionalmente al alimento habitual y que contiene biopreparaciones (incluyendo probióticos) u otros componentes que influyen favorablemente en la salud humana o que disminuyen riesgos de enfermedades. Los probióticos se consumen como componentes del alimento (yogur o queso probiótico) o preparaciones no alimentarias (cultivos microbianos liofilizados).

15 La mayoría de los probióticos son bacterias del ácido láctico, principalmente lactobacilos. Los lactobacilos son microorganismos no patógenos que colonizan el tracto intestinal y urogenital humano desde la infancia hasta la vejez. Hoy en día se usan satisfactoriamente varios lactobacilos probióticos comerciales, entre los cuales el *Lactobacillus rhamnosus* GG (Saxelin M. Lactobacillus GG - a human probiotic strain with thorough clinical documentation. Food Rev Int 1997; 13:293-313) es el más conocido. Recientemente, se han descrito y patentado algunas nuevas cepas de lactobacilos, por ejemplo *L. reuterii* (patente coreana KR211529, C12N 1/20, Korea Institute Science Technology, 1999), aislado de un organismo animal y por esta razón inapropiado para la utilización en seres humanos.

20 Varias cepas de *Lactobacillus fermentum* se usan para la corrección y la estabilización de la microflora intestinal en el caso de disbacteriosis e infecciones urogenitales con diferentes etiologías. La cepa del microorganismo *Lactobacillus fermentum* 39 se usa para producir la preparación biológica bacteriana (PCT/SU89/00264 (WO 91/05852), C12N 1/20, A61K 35/74, University of Tartu, 1991). La cepa *Lactobacillus fermentum* 90-TS-4 (RU2133272, C12N 1/20, A61K 35/74, Akivo Lentsner et ál., 1999) se caracteriza por tipificación con lectina como un perfil sensible a manosa de la pared celular. La preparación se prescribe para el uso en ginecología.

25 Hay algunos probióticos muy conocidos, dirigidos contra un solo patógeno (por ejemplo Salmonella) (US5478557, A61K 35/74, US Agriculture, 1995; US5340577, A61K 35/74, US Army, 1994). Hasta ahora no se ha descrito una cepa de lactobacilo con un efecto antimicrobiano intensivo contra numerosos patógenos y patógenos oportunistas.

30 Asimismo, todavía no se conoce una cepa de microorganismo tal que pueda tener resistencia natural a antibióticos contra los fármacos más frecuentemente usados en el tratamiento de infecciones. Esta propiedad permitiría usar tales cepas en el caso de pacientes tratados con antibióticos. Se usa en veterinaria un grupo de diferentes microorganismos, que también contienen una cepa de *L. fermentum*, pero esta cepa no tiene un efecto antimicrobiano y antioxidante simultáneo (RU2119796, A61K 35/66, Zakrôtoje aksionerhoje obshestvo "BAKS", 1998). Las preparaciones antioxidantes como vitamina E y C, betacaroteno y otras ganan hoy en día mucha atención en relación con una nutrición sana. La formación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la respiración de los tejidos puede provocar el daño de las células y el desarrollo de los tejidos. La formación de oxígeno activo puede depender de algunos factores de estrés, tales como el alcohol, los peróxidos y algunos fármacos.

35 Habitualmente, la oxidación excesiva está estrechamente conectada con las enfermedades nutricionales, la edad, la arteriosclerosis, las disfunciones de sistema nervioso central y el tracto intestinal, el cáncer y otros estados patológicos. Un organismo tiene varios sistemas de defensa contra la toxigenicidad del oxígeno. Es importante tomar sustancias antioxidantes para garantizar el funcionamiento de estos sistemas.

40 De las soluciones conocidas, la más cercana a esta invención es la patente que describe un alimento antioxidante, una preparación antioxidante y un método antioxidante (EPO649603, A23L 3/3472, A23L 3/3571, Otsuka Pharma Co Ltd. 1995). El objetivo de esta invención es una preparación que contiene una sustancia natural que implica manganeso (hojas de la planta del té) y el microorganismo *Lactobacillus plantarum* que produce catalasa y un sistema de superoxidasa-dismutasa, incrementando así la actividad antioxidante del organismo huésped. Los autores de esta invención declaran que la preparación previene enfermedades que se desarrollan debido a oxígeno activo. Sin embargo, no describen el efecto de una cepa de *Lactobacillus* particular con una actividad antioxidante decreciente o que capture radicales hidroxilo in vitro. Además de eso, esta cepa de microorganismo también es imperfecta debido a que para obtener el presumible efecto antioxidante en un organismo (in vivo) es necesario añadir alguna materia prima que contenga Mn (hojas de planta del té) a la preparación, debido a que solo en este caso se consigue su actividad de SOD (superóxido dismutasa).

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

El fin de esta invención es presentar la cepa de microorganismo como un nuevo probiótico antioxidante para el uso en la fabricación de un producto lácteo para reducir los índices de estrés oxidativo de la sangre humana.

Las más cercanas a la presente invención son cepas de *Lactobacillus sp.* con capacidad antioxidante (Mikelsaar M. et ál., American Journal of clinical nutrition, vol.73, N° 2S, 2001).

5 El material de referencia mencionado divulga tres cepas diferentes de *Lactobacillus sp.* con capacidad antioxidante pero no investiga adicionalmente si estas cepas podrían usarse para potenciar la actividad antioxidante de suero sanguíneo y aportar un efecto antiaterogénico a un ser humano.

10 El objetivo de la investigación - la cepa del microorganismo *Lactobacillus fermentum* ME-3 - se aisló de una muestra fecal de un niño sano durante un estudio comparativo de la microflora de niños estonios y suecos, usando medio de MRS (Oxoid) y cultivándola en un ambiente de CO₂ (Sepp et ál., Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants, Acta Paediatrica, 1997, 86, 956-961).

15 La cepa del microorganismo *Lactobacillus fermentum* ME-3 se aisló sembrando las diluciones de las heces de un niño estonio sano de un año de edad (10^{-2} - 10^{-7} en tampón de fosfato con ácido tioglicólico al 0,04%; pH 7,2). Las diluciones se sembraron sobre medio de agar de MRS recientemente preparado y se cultivaron a 37°C en un ambiente de CO₂. La cepa, que es el objetivo de la invención, se aisló de una dilución 10^{-5} sobre la base de la morfología característica de las colonias y las células. Sigue una identificación provisional y más precisa según se describe a continuación. Usando pruebas adicionales, la cepa se seleccionó de otros lactobacilos aislados del mismo niño sobre la base de sus propiedades especiales.

20 El hecho de que la cepa microbiana *Lactobacillus fermentum* ME-3 se origine a partir del tracto intestinal de un niño sano prueba su estado GRAS (generalmente reconocido como seguro), es decir que esta cepa de microorganismo es inocua para el organismo humano y es adecuada para la aplicación oral.

Las características culturales-morfológicas se determinaron después de cultivar la cepa sobre agar de MRS y en medio de caldo de MRS (OXOID). Las células microbianas son bastones Gram positivos de conformación regular situados en cadenas paralelas, sin esporas, de grosor medio y diferente longitud (2 x 3-5 µm).

25 **Características fisiológicas-bioquímicas:** el caldo de MRS era adecuado para cultivar la cepa microbiana durante 24-48 horas en un ambiente de CO₂ al 10%, después de lo cual se producía en el caldo un crecimiento homogéneo de turbidez. Las colonias de microorganismo sobre agar de MRS son blancas, redondeadas, con un borde regular. La temperatura de crecimiento óptima es 37°C, se multiplica también a 45°C, pero no crece a 15°C. El ambiente de crecimiento óptimo es a pH 6,5. La prueba de catalasa negativa, la producción de gas mediante fermentación de glucosa, la producción de NH₃ a partir de arginina y la producción de lisozima son las propiedades principales. Durante la reproducción en leche, produce 1,07% de ácido.

35 La cepa con las características mencionadas anteriormente se identificó sobre la base de la actividad bioquímica con el estuche API 50 CHL System (BioMerieux, Francia) como *Lactobacillus fermentum* (%ID 99,6, T 0,87, solo 1 prueba en contra). Se fermentaron los siguientes azúcares y alcoholes - ribosa, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, esculina, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, D-rafinosa, D-tagatosa y gluconato.

40 El perfil de los metabolitos de *Lactobacillus fermentum* ME-3 era característico de un metabolismo heterofermentativo, determinado mediante el método cromatográfico de gases (Hewlett-Packard modelo 6890). El perfil de fermentación dependía del ambiente de incubación: además de los ácidos láctico y acético se producía una gran cantidad de ácido succínico en un ambiente de CO₂, pero en un ambiente anaerobio se producía mucho etanol además de las sustancias mencionadas anteriormente (Tabla 1). Tanto el ácido succínico como el etanol pueden reforzar las propiedades estables de la cepa microbiana en leche fermentada mediante esta cepa.

Tabla 1. La concentración de ácido acético, ácido láctico, ácido succínico y etanol (mg/ml) en medio de MRS en el cultivo de *Lactobacillus fermentum* ME-3 en ambiente microaerófilo y anaerobio durante 24 y 48 h.

<i>Lactobacillus fermentum</i> ME-3	Ácido láctico		Ácido acético		Ácido succínico		Etanol	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Ambiente de CO ₂	10,6	11,1	0,8	0,9	18,4	19,5	9,8	7,5
Ambiente anaerobio	8,2	8,8	1,0	1,0	5,7	9,7	7	33,3

Identificación molecular.

La identificación molecular mediante ITS-PCR (espaciador transcrito interno - reacción en cadena de la polimerasa) usando *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931 como la cepa de referencia verificaba la identificación previa con API 50 CHL.

5 El microorganismo con las propiedades mencionadas anteriormente se depositó en Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-s, el número de registro del depósito es DSM 14241 (19.04.2001).

Actividad antimicrobiana

Lactobacillus fermentum ME-3 expresa un alto efecto antimicrobiano sobre cepas de *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* 1 y 2 y *Helicobacter pylori* in vitro (Tabla 2).

10 Tabla 2. Actividad antimicrobiana de la cepa *Lactobacillus fermentum* ME-3 sobre agar de MRS modificado, en caldo de MRS y leche.

<i>Lactobacillus fermentum</i> ME-3	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> 1 y 2	<i>Helicobacter pylori</i>	
Agar de MRS	Zona de inhibición (mm)					
	24/22	26/21	20/19	25,8/24,7	23,8/19,7	13,2/13,15
Caldo de MRS	Disminución del número total (log ₁₀) en comparación con el número inicial					
	log 6,0	log 6,7	log 0,8	log 6,3	log 3,8	no determinada
Leche	Supresión después de un intervalo de tiempo diferente (24 -48 h)					
	24 t	32 t	24 t	32 t	48 t	no determinada

25 Usando fermentación de leche, era posible mostrar que los patógenos inoculados en leche se destruían en 24-48 h si la leche se fermentaba con *Lactobacillus fermentum* ME-3. Tal propiedad de la cepa podría ayudar a prevenir la multiplicación de patógenos en productos (yogur, queso) fermentados mediante esta cepa, y evitar infecciones alimentarias. Los ácidos orgánicos y el etanol producidos por *Lactobacillus fermentum* ME-3 podrían asegurar el alto efecto antimicrobiano de este microbio.

30 **Resistencia a antibióticos**

De acuerdo con una prueba de difusión en disco (discos BBL Sensi) y una prueba E (AB Biodisk, Solna), *Lactobacillus fermentum* ME-3 era resistente a metronidazol, ofloxacina, aztreonam, cefoxitina y TMP-SMX. Esto permite usar la cepa *L. fermentum* ME-3 como una preparación que acompaña al tratamiento con antibióticos en el caso de infecciones intestinales y uroinfecciones.

35 **Estructuras superficiales de la célula microbiana**

El perfil de carbohidratos de la estructura superficial de células microbianas de *Lactobacillus fermentum* ME-3 se determinó mediante tipificación con lectina. La cepa de lactobacilo se aglutinaba con lectina de *Griffonia simplicifolia*, que es específica para los ligandos de Gal y GalNAc en la pared celular.

40 La cepa *Lactobacillus fermentum* ME-3 no reaccionaba con las otras lectinas siguientes: *Concanavalin ensiformis* (Con A), *Griffonia simplicifolia* II, *Arachis hypogaea* (PNA), *Vicia sativa* (VSA) y *Tritium vulgare* (WGA).

De ahí que la especial composición del glicocáliz de la pared celular de *Lactobacillus* ME-3 se hiciera clara con la tipificación con lectina, contenía residuos de galactosa y N-acetilgalactosamina. Estos compuestos actúan como adhesinas para acoplarse a los receptores de la mucosa sobre las células epiteliales del tracto urinario superior.

Esta es una posibilidad para bloquear las vellosidades resistentes a manosa de *Escherichia coli* que hace a la presente cepa aplicable en la profilaxis de las infecciones del tracto urinario.

Propiedades antioxidantes

5 Los lactobacilos se incubaron en un caldo de MRS (Oxoid Ltd.) durante 24 h y se centrifugaron a 4°C (1500 p/min) 10 min para obtener un precipitado, se lavaron con sal isotónica (4°C) y se suspendieron hasta la densidad de KCl (Sigma, EE. UU. de A.) al 1,15%. La densidad de la suspensión era a una DO₆₀₀ 1,1 10⁹ células bacterianas en ml⁻¹.

10 Para obtener lisados, las células se rompieron mediante sonicación (B-12 Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut) en 35 vibraciones s⁻¹ 10 min en un baño de hielo y a continuación durante 10 min a -18°C. La suspensión se centrifugó a 4°C 10000 g/r durante 10 min y el sobrenadante se filtró (MILLEY-GS, estéril, 0,22 µm; Millipore S.A., 67 Molsheim, Francia) para obtener un extracto libre de células. Las células de *Lactobacillus fermentum* ME-3 y el lisado producían H₂O₂ en una cantidad notable (Tabla 3).

15 Tabla 3. Capacidad antioxidante total de las cepas de *Lactobacillus fermentum* ME-3 y E-338-1-1 (de acuerdo con las pruebas de LA y TAS), contenido de peróxido de hidrógeno, relación redox de glutatonas y actividad de superóxido dismutasa.

Propiedades	<i>Lactobacillus fermentum</i> ME-3	<i>Lactobacillus fermentum</i> E-338-1-1
	Células intactas	Células intactas
TAA en la prueba LA (%)	29 ± 0,7 (n=5)	0
TAS (mmol/l)	0,16 ± 0,03 (n=5)	0
H ₂ O ₂ (µg/ml)	31 ± 26 (n=3)	49 ± 20 (n=3)
	Lisado de células	Lisado de células
Prueba LA (%)	59 ± 3,8 g (n=5)	0
H ₂ O ₂ (µg/ml)	229 ± 37 (n=4)	137 ± 25 (n=3)
TGSH	12,5 ± 4,1	5,5 ± 3,0
GSSG (µg/ml)	2,59 ± 2,01	5,5 ± 2,4
GSH (µg/ml)	9,95 ± 3,30	Marcas
GSSG/GSH	0,28 ± 0,17	0 ^e
SOD (U/mg de proteína)	0,859 ± 0,309 (n=3)	No determinada
Explicaciones: prueba LA - prueba de ácido linolénico; TAA - actividad antioxidante total; TAS - estado antioxidante total; GSSG -glutaciona oxidada; GSH - glutaciona reducida; GSSG/GSH - relación redox de glutatonas; SOD - superóxido dismutasa		

20 *Lactobacillus fermentum* ME-3 tiene una actividad de Mn-SOD determinada mediante electroforesis. Para determinar el tipo de SOD, un extracto libre de células de *L. fermentum* ME-3 (30 µg de proteína) se separó sobre gel de poliamida-acrílico no desnaturalizado al 10%. La isoenzima de SOD se determinó al afectar a este gel con H₂O₂ 15 mM, después de lo cual persistía la actividad de SOD. Explicación: el H₂O₂ inhibe Fe-SOD, pero no inhibe Mn-SOD. Esto prueba que *Lactobacillus fermentum* ME-3 tiene actividad de Mn-SOD.

25 La cepa *Lactobacillus fermentum* ME-3 muestra una alta TAA (actividad antioxidante total) en un ambiente lipídico sobre la base de una prueba de ácido linolénico, también un alto valor del TAS (estado antioxidante total) en un ambiente de hidrato (estuche Randox, Reino Unido). En la Tabla 3, se añaden datos de la cepa antioxidante *Lactobacillus fermentum* E-338-1 para comparación (Tabla 3).

Las células y los lisados de la cepa *Lactobacillus fermentum* ME-3 atrapan radicales hidroxilo; esto se ha probado mediante el método del ácido tereftálico (27% ± 5%). Se usaron 15 mM de glutaciona reducida para comparación como un eliminador de radicales hidroxilo muy conocido (84 ± 4,6%). *Lactobacillus fermentum* ME-3 sobrevivía en un ambiente de H₂O₂ altamente oxidante.

El recultivo del cultivo liofilizado mantenido a temperatura ambiente durante mucho tiempo probaba la viabilidad de la cepa y la persistencia de propiedades. Esto asegura que la cepa liofilizada de *Lactobacillus fermentum* ME-3 pueda usarse como un producto no comestible en un esquema de alimento funcional.

MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

5 Un ejemplo de la preparacion de un yogur con propiedades altamente antioxidantes basado en la cepa *Lactobacillus fermentum* ME-3 y el experimento de consumo del yogur por voluntarios sanos.

10 Se usa un cultivo puro de *Lactobacillus fermentum* ME-3 en agar de MRS al 0,15% para producir el yogur, adicionalmente, los cultivos puros de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus buchneri* se siembran en leche de cabra fresca tratada en autoclave durante 20 min a 110°C. Tres cultivos de estas cepas de lactobacilos se mezclan en proporciones iguales junto con 2% de *Streptococcus thermophilus* y se añaden en 0,2% de contenido en leche de cabra tratada en autoclave. *Lactobacillus fermentum* ME-3 con cepas de lactobacilos y estreptococos garantizaría un yogur sabroso y altamente antioxidante (Tabla 4).

Tabla 4. La actividad antioxidante de un cultivo puro de *Lactobacillus fermentum* ME-3 y yogur probiótico

Cepa	Actividad antioxidante total (TAA, %)	
	Células	Yogur
<i>Lactobacillus fermentum</i> ME-3	29	70

15 En las Tablas 5 y 6, s muestran los cambios de la microflora intestinal y los índices de estrés oxidativo de suero sanguíneo de voluntarios sanos antes y después de tomar el yogur de leche de cabra probiótico durante 3 semanas. Estos cambios prueban el efecto antioxidante (incluyendo antiaterogénico) sobre el organismo humano.

Una actividad antioxidante total aún mayor del yogur de leche de cabra en comparación con la actividad antioxidante total de células microbianas intactas de *Lactobacillus fermentum* ME-3 se muestra en la Tabla 4.

20 Cepas microbianas aditivas aseguran la acidez y la consistencia estándares del yogur.

Tabla 5. Los cambios de la microflora intestinal de voluntarios sanos (n=16) antes y después de consumir yogur de leche de cabra probiótico durante 3 semanas

	Antes		Después	
	Personas colonizadas	Relación de Lactoflora (%)	Personas colonizadas	Relación de Lactoflora (%)
Consumo de yogur de leche de cabra (n=16 personas)				
<i>L. fermentum</i>	4*	0,7 - 5,77	16*	0,5 - 49,9#
Toma de leche de cabra (n=4 personas)				
<i>L. fermentum</i>	0	0	1	0 - 32,9
Incremento estadísticamente significativo:				
* La Prueba Exacta de Fisher mostraba la diferencia de números en personas colonizada con <i>Lactobacillus fermentum</i> ME-3 - p<0,0015;				
# La Prueba de la Suma de Rangos de Mann-Whitney mostraba la diferencia de cuota relativa de <i>Lactobacillus fermentum</i> ME-3 en la lactoflora. Por lo tanto, después de consumir yogur 3 semanas, el microbio estaba presente en el tracto intestinal de todos los voluntarios y el número de <i>Lactobacillus</i> sp. se incrementaba notablemente.				

Tabla 6. Los índices de estrés oxidativo de sueros sanguíneos de voluntarios (n=16) antes y después de consumir yogur de leche de cabra probiótico durante 3 semanas

Propiedades	Grado estándar	Suero sanguíneo antes del experimento	Suero sanguíneo después del experimento	Incremento
TAA (prueba LA, %)	36 ± 4,5	38 ± 3,5	45 ± 3,4	16%
TAS, mmol/l	1,2 ± 0,2	0,82 ± 0,14	1,14 ± 0,08	29%
Relación redox de glutationas (GSSG/GSH)	0,17 ± 0,08	0,15 ± 0,01	0,11 ± 0,035	-32%
Fase de retardo de LDL (tiempo de resistencia)	>30 min	41 ± 7,9	46 ± 8,6	11%
Valor básico de conjugados diénicos (valor de extinción)	< 0,3	0,27 ± 0,06	0,23 ± 0,06	-15%
Ox LDL (U/L)	>127	98 ± 12	81 ± 19	-18%
Explicaciones: prueba LA - prueba de ácido linolénico; TAA - actividad antioxidante total; TAS - estado antioxidante total; GSSG - glutatona oxidada; GSH - glutatona reducida; GSSG/GSH - relación redox de glutationas, ox LDL -lipoproteínas de baja densidad oxidadas.				

Así, todos los parámetros determinados en suero sanguíneo de voluntarios sanos cambiaban beneficiosamente durante el experimento de 3 semanas con yogur.

EXPOSICIÓN

5 El fin de la presente invención es ofrecer una cepa de microorganismo como un nuevo probiótico antioxidante contra el estrés oxidativo.

10 En cuanto a la actividad antioxidante de la cepa *Lactobacillus fermentum* ME-3 como el objetivo de la presente invención, se describieron en primer lugar los diferentes parámetros principales y nuevos específicos como expresión de Mn-SOD, estado antioxidante total (TAS, verificado mediante un método aceptado internacionalmente) de alto grado, parámetros principales del sistema de glutatona (una molécula de señal y un antioxidante celular fundamental) y el valor de la relación redox de glutationas.

15 Ningún parámetro antioxidante (incluyendo la antiaterogenicidad) encontrado en experimentos humanos (experimentos in vivo) se hacía público en ningún lugar. Por lo tanto, solo en esta invención, se describió una influencia del consumo de ME-3 sobre índices específicos del suero humano y se divulgaron los valores numéricos adecuados. Realmente, considerando principalmente estos parámetros (el incremento significativo del TAS y la resistencia a oxígeno de LDL, la disminución del nivel de LDL oxidado y sus conjugados diénicos indican conjuntamente una mejora del poder antioxidante sistémico y también una disminución significativa del estrés oxidativo celular), puede reivindicarse que la cepa *Lactobacillus fermentum* ME-3 es un nuevo probiótico antioxidante.

20 La persistencia de la nueva cepa en el tracto gastrointestinal después del consumo y la influencia beneficiosa sobre la composición de los lactobacilos intestinales se describen por primera vez.

Así, la cepa del microorganismo *Lactobacillus fermentum* ME-3 (DSM 14241) representa un nuevo probiótico antioxidante.

REIVINDICACIONES

5 1. Cepa de *Lactobacillus fermentum* ME-3 DSM-14241 para el uso en la fabricación de un producto lácteo para reducir el estrés oxidativo que se mide mediante los parámetros de la actividad antioxidante total (TAA), el estado antioxidante total (TAS) del suero sanguíneo, la fase de retardo de lipoproteína de baja densidad (LDL), la relación redox de glutionas, el nivel de lipoproteína de baja densidad oxidada (ox-LDL) y el valor básico de los conjugados diénicos de sangre humana.

2. Cepa de *Lactobacillus fermentum* ME-3 DSM-14241 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho producto lácteo es leche, yogur o queso.