(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 543 738**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/02 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2010 E 10708583 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2521791**

(54) Título: **Método para seleccionar bacterias con acción antioxidante**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.08.2015

(73) Titular/es:

COMPAGNIE GERVAIS DANONE (50.0%)
17, Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR y
BIOPOLIS S.L. (50.0%)

(72) Inventor/es:

GROMPONE, GIANFRANCO;
DEGIVRY, MARIE-CHRISTINE;
RAMÓN VIDAL, DANIEL;
MARTORELL GUEROLA, PATRICIA;
GONZÁLEZ MARTÍNEZ, NURIA;
GENOVÉS MARTÍNEZ, SALVADOR;
LEGRAIN-RASPAUD SOPHIE;
CHAMBAUD, ISABELLE y
BOURDET-SICARD, RAPHAËLLE

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Método para seleccionar bacterias con acción antioxidante

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para seleccionar bacterias de calidad alimentaria con propiedades antioxidantes.

Técnica anterior

Todos los sujetos vivos mantienen un ambiente reductor dentro de sus células. Sin embargo, debido al metabolismo aerobio por las mitocondrias y a otros factores, se producen especies reactivas derivadas de oxígeno, tales como peróxidos y radicales de oxígeno libres. El ambiente reductor es conservado por enzimas, tales como superóxido-dismutasa, catalasa y glutatión-peroxidasa. Si se altera el estado redox normal, las especies reactivas de oxígeno pueden dañar todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y especialmente el DNA. Este desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad para destoxificar los compuestos intermedios reactivos o reparar el daño causado por las especies reactivas de oxígeno se denomina estrés oxidante. En los seres humanos, el estrés oxidante es un factor importante en el envejecimiento y en las enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento, tales como cáncer, artritis, diabetes, arterioesclerosis, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de Parkinson, insuficiencia cardíaca, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington. La teoría del envejecimiento debido a los radicales libres establece que los organismos envejecen porque las células acumulan con el tiempo daños causados por especies reactivas de oxígeno.

Con el fin de evitar los efectos adversos del estrés oxidante, es necesaria la selección de componentes dietéticos que tengan propiedades antioxidantes. Especialmente bacterias de calidad alimentaria, en particular bacterias de ácido láctico, son componentes dietéticos antioxidantes adecuados, ya que su uso da como resultado ventajosamente un efecto a largo plazo de la acción antioxidante, por medio de la colonización del tracto intestinal.

La Patente de EE.UU. 6.884.415 describe un producto alimenticio antioxidante producido por la fermentación de un producto alimenticio que contiene *Lactobacillus plantarum* que tiene una actividad similar a la de la superóxido-dismutasa (SOD) y una actividad de catalasa (CAT), en presencia de un material natural que contiene manganeso. Sin embargo, se sabe que las bacterias de calidad alimentaria, incluyendo bacterias de ácido láctico, pueden tener propiedades antioxidantes no dependientes de la actividad de la catalasa ni de la SOD.

La solicitud de patente internacional WO 03/002131 describe una cepa de *Lactobacillus fermentum* como producto probiótico antioxidante. Las propiedades antioxidantes de esta cepa se caracterizaron *in vitro* por ensayos enzimáticos y medidas del potencial redox del glutatión.

La solicitud de patente internacional WO 00/20013 describe una cepa de *Lactobacillus* o *Propionibacterium* que da lugar a cantidades elevadas de ácido propiónico en el intestino de un mamífero para la fabricación de un medicamento para reducir los factores del estrés oxidante, tales como IL-6, especies reactivas de oxígeno y moléculas de adherencia. Uskova *et al*., 2009, *Voprosy Pitania*, vol. 78, 2009, páginas 18-23, describen que diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Streptococcus* tienen propiedades antioxidantes *in vitro*.

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) es un gusano transparente que vive en libertad (nematodo) en ambientes de suelos templados. *C. elegans* se alimenta de bacterias, en particular de la cepa OP50 de *Escherichia coli*. Por este motivo ha sido utilizado ampliamente como organismo modelo por una variedad de razones. Las cepas son baratas y fáciles de criar y pueden ser congeladas. Cuando se descongelan posteriormente, permanecen vivas, permitiendo su almacenamiento a largo plazo. Tienen un ciclo de vida corto y reproducible. *C. elegans* tiene la ventaja de ser un organismo eucariota multicelular que es lo suficientemente sencillo para ser estudiado con gran detalle. Este gusano tiene cerca del 40% de los genes ortólogos humanos entre todo el genoma, que lo convierte en un organismo relevante para la situación humana.

Caenorhabditis elegans se ha utilizado como sistema modelo animal para evaluar el daño oxidante y los efectos sobre el envejecimiento (Larsen, 1993, PNAS 90:8905-8909). El estudio se ha llevado a cabo con una cepa mutante que tiene hiper-resistencia al estrés oxidante en comparación con su cepa precursora.

Además, Ikeda *et al*. (*2007*, AEM 73:6404-6409) han estudiado el efecto de las bacterias de ácido láctico sobre el ciclo de vida y resistencia a la *Salmonella* de *C. elegans.* Los autores sugieren que *C. elegans* puede ser un modelo adecuado para la selección de cepas de bacterias probióticas (que ejercen efectos beneficiosos sobre la salud humana cuando se ingieren en número suficiente) o sustancias antienvejecimiento dietéticas. Sin embargo, la resistencia frente al estrés oxidante no fue evaluada en este estudio. También se sabe que el largo ciclo de vida de *C. elegans* está relacionado con la vía de la insulina y relacionado con los genes ortólogos en los seres humanos implicados en el factor de crecimiento insulinoide y la diabetes (Glenn *et al.*, 2004, J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 59:1251-1260).

Sumario de la invención

Los autores de la presente invención han encontrado que el sistema modelo animal *Caenorhabditis elegans* es un modelo adecuado para seleccionar la capacidad de bacterias de calidad alimentaria para contrarrestar los efectos dañinos del estrés oxidante. El ensayo de selección se puede realizar en medios líquidos en placas de microtitulación a la que se añaden bacterias, así como en placas de agar-agar con céspedes de bacterias como alimentación.

En particular, el efecto de estas bacterias de calidad alimentaria sobre la prevención de los daños que se producen por estrés oxidante, particularmente en forma de especies reactivas oxidantes, se puede analizar usando C. *elegans.* Se encontró que un modo adecuado de imponer el estrés oxidante a *C. elegans* era la adición de peróxido de hidrógeno. El método de selección de la presente invención es relativamente sencillo e incluso los resultados obtenidos son relevantes para la situación humana. Finalmente, el método permite ventajosamente seleccionar cepas de bacterias de calidad alimentaria con un efecto global anti-estrés oxidante, sin estar limitado a la selección de un mecanismo específico implicado en un efecto antioxidante, tal como la presencia de una enzima particular (por ejemplo, CAT, SOD) o la liberación de un factor particular, como es el caso de la técnica anterior.

Descripción detallada de la invención

Método de selección utilizando *Caenorhabditis elegans*

En una realización, la presente invención se refiere a un método para seleccionar bacterias de calidad alimentaria con propiedades antioxidantes, que comprende:

a. una etapa de sincronización del desarrollo de gusanos *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*);

b. una etapa de alimentación de dichos gusanos *C. elegans* con las bacterias de calidad alimentaria que se han de analizar;

c. una etapa de incubación de los gusanos *C. elegans* en presencia de estrés oxidante;

d. una etapa de determinación de la viabilidad de dichos gusanos *C. elegans* que se incubaron en presencia de estrés oxidante; y

e. una etapa de selección de las bacterias de calidad alimentaria que proporcionan la mayor supervivencia de dichos *C. elegans* en presencia de estrés oxidante.

En otra realización, la presente invención se refiere al uso de *Caenorhabditis elegans* en un método para seleccionar bacterias de calidad alimentaria con propiedades antioxidantes.

El desarrollo de *C. elegans* sincronizado por el método de acuerdo con la presente invención se realiza ventajosamente en gusanos que están en el mismo estadio de desarrollo. Los métodos para que se desarrollen y sincronicen gusanos *C. elegans* son conocidos en la técnica (En: W.B. Wood (ed) "The nematode *Caenorhabditis elegans*". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp 587-606; Chen *et al.*, 2008, J. Cell Commun. Signal. 2:81-92). Un modo adecuado de conseguir el desarrollo sincronizado es recoger huevos de adultos preñados y comenzar la eclosión de los huevos. Un modo adecuado para eclosionar los huevos es incubarlos durante una noche en medio M9 (MRS (medio de Man, Rogosa y Sharpe) al 10% en volumen, 100 µg/mL de fluorodesoxiuridina) más 5 µg/mL de colesterol. Posteriormente, se pueden aislar los gusanos en el estadio L_1 y dejar que se desarrollen como se conoce en la técnica (En: W.B. Wood (ed) "The nematode *Caenorhabditis elegans*"; antes citado). Preferiblemente, los gusanos se dejan que se desarrollen en los pocillos de una placa de microtitulación. Preferiblemente, los gusanos se dejan que se desarrollen sin agitación durante tres días a 25ºC y con una humedad relativa de 80-85%.

En una realización preferida del método de la presente invención, se utiliza la cepa mutante BA17 fem-1(hc17) de C. *elegans* (Nelson *et al.*, 1978, Dev. Biol. 66:386-409). Esta cepa tiene inhibida ventajosamente la fertilidad a 25ºC, haciendo con ello más fácil controlar su desarrollo y reproducción.

En una realización preferida de la etapa *b.* del método de la presente invención, se utiliza como alimentación de control *Escherichia coli* (*E. coli*), preferiblemente *E. coli* OP50 (que es una fuente de alimentación normal para *C. elegans*).

En lugar de con alimentación de control los gusanos se pueden desarrollar en presencia de las bacterias de calidad alimentaria que se han de analizar.

Preferiblemente, están presentes al menos 50 gusanos por condición de ensayo (presencia o ausencia de estrés oxidante), con el fin de encontrar diferencias relevantes entre las diferentes condiciones.

Cuando los gusanos han llegado al estadio adulto, preferiblemente después de 3 días de cultivo, pueden ser incubados en presencia de estrés oxidante. Un modo adecuado de aplicar el estrés oxidante es por adición de peróxido de hidrógeno, preferiblemente, a una concentración comprendida entre una concentración final de de H_2O_2 de 1 mM y 20 mM, más preferiblemente entre 2 mM y 10 mM, incluso más preferiblemente entre 2 mM y 5 mM. Una concentración óptima de peróxido de hidrógeno es 5 mM. Preferiblemente, como control no se añade H_2O_2.

En una realización preferida de la etapa *c*. del método de la presente invención, se incuban *C. elegans* en presencia de estrés oxidante durante 5 minutos a 48 horas, más preferiblemente de 1 hora a 10 horas. Un tiempo adecuado para esta etapa de incubación es 5 horas.

Un modo de realizar la etapa de incubación en presencia de estrés oxidante es en medios líquidos, por ejemplo, en pocillos de placas de microtitulación. Este método tiene como ventaja que pueden analizarse simultáneamente muchas condiciones. Alternativamente, el método se puede llevar a cabo en un medio sólido, por ejemplo, placas de agar-agar. Este método es más laborioso y consume más tiempo que el ensayo en placas de microtitulación, pero tiene la ventaja de que se pueden excluir los efectos directos de las bacterias de calidad alimentaria sobre el agente que confiere estrés oxidante, tal como peróxido de hidrógeno.

En una realización de la etapa *c.* del método de la presente invención, los gusanos *C. elegans* también se pueden incubar en ausencia de estrés oxidante como control.

En una realización preferida de la etapa *d.* del método de la presente invención, la evaluación de la resistencia antioxidante se expresa como viabilidad. Esta se puede observar por microscopía. Los gusanos se consideran muertos si están paralizados y no se observa ningún movimiento.

En una realización de la etapa *d.* del método de la presente invención, cuando gusanos C. *elegans* se incuban en ausencia de estrés oxidante como control en la etapa *c*., entonces la viabilidad de dichos gusanos *C. elegans* que son incubados en presencia de estrés oxidante se compara con la viabilidad de dichos gusanos *C. elegans* que son incubados en ausencia de estrés oxidante.

La etapa final *e.* del método de la presente invención se pueden realizar seleccionando las bacterias de calidad alimentaria que confieren una alta tasa de supervivencia a los gusanos *C. elegans* en presencia de estrés oxidante.

En una realización preferida de dicha etapa *e*., la supervivencia de *C. elegans* en ausencia de estrés oxidante se evalúa simultáneamente y se fija en 100%.

En otra realización de dicha etapa *e*., el efecto de las bacterias de calidad alimentaria sobre la supervivencia (o viabilidad) de los gusanos *C. elegans* se compara con el efecto de la alimentación de control, tal como *E. coli.*

Bacterias de calidad alimentaria

Las bacterias de calidad alimentaria de acuerdo con la presente invención se refieren a bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Weisella*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Corynebacterium* y *Brevibacterium*.

Preferiblemente, las bacterias de calidad alimentaria son bacterias de ácido láctico (LAB). Las bacterias de ácido láctico de acuerdo con la presente invención se refieren a bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium* y *Weisella*. Más preferiblemente, las bacterias de calidad alimentaria se seleccionan del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Bifidobacterium*.

Las cepas de calidad alimentaria analizadas se pueden cultivar como se conoce en la técnica. A modo de ejemplo, cepas que pertenecen a los géneros *Bifidobacterium, Lactobacillus* y S*treptococcus* se cultivan en medios MRS con cisteína, MRS y Elliker, respectivamente.

En una realización preferida del método de la presente invención, para el ensayo en placas de microtitulación, las bacterias de calidad alimentaria ensayadas son viables.

En otra realización preferida del método de la presente invención, las bacterias de calidad alimentaria se cultivan previamente y se recogen en la fase de desarrollo logarítmico.

En otra realización preferida del método de la presente invención, los cultivos de las diferentes bacterias de calidad alimentaria se añaden al medio de desarrollo líquido que contiene *C. elegans* a una concentración final de $1x10^5$ células/mL a $1x10^8$ células/mL, más preferiblemente de $1x10^6$ células/mL a $1x10^7$ células/mL. Una concentración preferida para un ensayo en medios líquidos es $4x10^7$ UFC/mL. Alternativamente, cuando se analiza *C. elegans* sobre placas de agar-agar, las bacterias de calidad alimentaria de ensayo pueden estar presentes en forma de colonias o céspedes sobre las placas de agar-agar.

En otra realización preferida del método de la presente invención, las bacterias de calidad alimentaria se añaden al medio de desarrollo de *C. elegans* en presencia de un antibiótico que inhiba el posterior desarrollo de las bacterias de calidad alimentaria. Además, debe estar presente un antibiótico para evitar un desarrollo adicional de las bacterias durante el ensayo. Preferiblemente, los gusanos se desarrollan y se incuban en presencia de un antibiótico, más preferiblemente kanamicina, incluso más preferiblemente kanamicina en una concentración de 10 a 100 µg/mL. Ventajosamente, la kanamicina también inhibe el desarrollo de la alimentación de control *E. coli.* Otros antibióticos adecuados para inhibir algunas cepas de lactobacilos son vancomicina, neomicina y eritromicina.

Aplicación

El método de la presente invención se usa preferiblemente para seleccionar cepas de bacterias de calidad alimentaria que protejan contra el estrés oxidante y/o para evitar el daño impuesto por el estrés oxidante. Estas bacterias de calidad alimentaria se pueden utilizar posteriormente en la fabricación de composiciones farmacéuticas, suplementos nutricionales y/o productos alimenticios.

Dichas composiciones son adecuadas para seres humanos que padecen estrés oxidante. Especialmente los ancianos son un grupo objetivo apropiado, ya que el intestino envejecido y la inmunosenescencia son propensos a una resistencia menos eficaz al estrés oxidante y a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Ejemplo 1: Selección de bacterias de ácido láctico en la supervivencia de *C. elegans* con o sin estrés oxidante en placas de microtitulación

Se analizaron 100 cepas de calidad alimentaria que pertenecían a los géneros *Bifidobacterium, Lactobacillus* y *Streptococcus* para determinar sus propiedades antioxidantes. Estos géneros se cultivaron en medios MRS con cisteína, MRS y Elliker, respectivamente. A medida que se realizaba el bioensayo de la actividad antioxidante *in vivo* con muestras de células vivas de diferentes bacterias de ácido láctico, se recogían las células en el desarrollo en fase logarítmica. Después del análisis de las curvas de desarrollo, el tiempo óptimo para la recuperación celular era después de 15 horas de incubación a DO^{600}= 1, 1,5 y 1,7 para *Streptococcus, Lactobacillus* y *Bifidobacterium,* respectivamente. Los cultivos de las diferentes bacterias de ácido láctico obtenidos como se describe anteriormente se añadieron a la mezcla a una concentración final de $4x10^6$ células/mL.

Posteriormente, se analizó la sensibilidad de las 100 cepas bacterianas a la kanamicina, un antibiótico usado para evitar el desarrollo de *Escherichia coli.* Este antibiótico tiene que estar presente para evitar un desarrollo adicional de las bacterias durante el ensayo. Se encontró que una concentración de 30 µg/mL de kanamicina era suficiente para inhibir *E. coli* OP50; el 20% de las cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* no fue inhibido por este antibiótico. Sin embargo, puesto que las bifidobacterias no eran capaces de proliferar en condiciones aerobias, no es esencial la presencia de un antibiótico. Otros antibióticos adecuados para inhibir algunas cepas de lactobacilos eran vancomicina (250 µg/mL), neomicina (10-35 µg/mL) y eritromicina (1-100 µg/mL).

Los experimentos han sido realizados con la cepa mutante BA17 fem-1(hc17) de C. *elegans* que tiene la fertilidad inhibida a 25ºC. Los gusanos BA17 fueron sincronizados aislando huevos de adultos preñados a 20ºC, eclosionando los huevos durante una noche en medio M9 (MRS al 10% en volumen, 110 µg/mL de fluorodesoxiuridina) más 5 µg/mL de colesterol y aislando los gusanos en el estadio L_1 en los pocillos de una placa de microtitulación. Los gusanos se desarrollaron sin agitación durante 3 días a 25ºC y una humedad relativa de 80-85%. Estas larvas se transfirieron a una placa que contenía medio M9 más colesterol y se incubaron durante 3 días a 25ºC y 80-85% de humedad, sometiéndolos mientras a una alimentación de control o experimental. Al menos estaban presentes 50 gusanos por pocillo.

Después de 3 días, cuando los gusanos habían alcanzado el estadio adulto, se aplicó el estrés oxidante añadiendo peróxido de hidrógeno H_2O_2 (2 mM, 3 mM y 5 mM) o sin H_2O_2 (sin control de estrés). Durante este experimento se utilizaron dos controles: pocillos con *Escherichia coli* en lugar de una bacteria de ácido láctico como control de la alimentación bacteriana y pocillos con *E. coli* y H_2O_2 2 mM, 3 mM o 5 mM como control del estrés oxidante. Se encontró que era óptima una concentración de H_2O_2 de 5 mM. La resistencia antioxidante se expresó como viabilidad, evaluada después de 5 horas por microscopía. Los gusanos se incubaron en estas condiciones durante 5 horas. Para puntuar la capacidad antioxidante de los gusanos se consideró que estaban muertos (estresados) si estaban paralizados.

En ausencia de estrés oxidante durante el tiempo de incubación con *E. coli* la viabilidad varió entre 100 y alrededor del 90%. En un ensayo inicial las bacterias de ácido láctico tenían tasas de supervivencia similares o mejores, lo cual es indicativo de una longevidad similar o mejorada. Los resultados del efecto de algunas cepas seleccionadas se muestran en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Efecto de la alimentación con bacterias de ácido láctico sobre la longevidad de *C. elegans.*

Cepa	Viabilidad, %
S2A	95,7
S1B	98,0
S2B	94,1
S1C	94,5
S1D	98,2
S1E	100,0
S1F	95,0
S1G	98,2
S1H	97,1
L2A	91,9
L5A	100
L6A	94,1
L8A	96,0
L9A	91,75
E. coli OP50	89,5

Se analizó el efecto de 99 cepas de bacterias de ácido láctico sobre la supervivencia de *C. elegans* bajo estrés oxidante con H_2O_2 2, 3 y 5 mM. Se encontró que H_2O_2 5 mM era la mejor concentración para el ensayo del estrés oxidante. En presencia de H_2O_2 5 mM, la viabilidad de los gusanos en presencia de *E. coli* OP50 era aproximadamente el 93% en comparación con la viabilidad en ausencia de estrés oxidante. Esto es indicativo de una protección del 93% frente al estrés oxidante para *E. coli* OP50.

La Tabla 2 siguiente muestra el efecto de las bacterias de ácido láctico seleccionadas sobre el nivel de protección frente al estrés oxidante, en comparación con el efecto protector ejercido por la cepa de *E. coli* OP50 de control fijado en 100%.

Tabla 2: Nivel de protección frente al estrés oxidante por H_2O_2 5 mM, conferido por algunas bacterias de ácido láctico en comparación con la protección conferida por *E. coli* OP50.

Cepa	Nivel de protección, %
E. coli OP50	100
Lactobacilos	
L8F	14,6
L9F	21,6
L10F	9,7
L1G	102,5
L3G	7
L4G	30
L6G	23
L7G	95
L8G	18
L9G	81
L10G	77
L1H	70
L4H	87
L5H	6
L7H	3
L8H	9
L10H	8
L8B	76,8
L9A	18,7
L9B	13,3
L10B	5,2
L11B	70,9
L2C	15,7

Cepa	Nivel de protección, %
L4C	12,8
L6C	0,0
L8C	59,3
L10C	105
L11C	96,3
L4D	7,5
L6B	21,2
L8B	82,2
L5C	4,1
L7C	5,7
L2D	0,0
L5D	0,0
L2E	0,0
L3F	0,0
L4F	85,1
L6F	0,0
L7F	11,0
L11A	102
L4B	109
L3B	80,1
L6A	26,3
L2A	100
L2B	16,0
L5A	9,8
L7B	0,0
L5B	89,6
L8A	111

Cepa	Nivel de protección, %
L8D	87,1
L9D	91,6
L10D	94,1
L11D	100
L3E	104
L4E	59,4
L5E	34,2
L6E	56,7
L8E	54,2
L9E	58,1
L10E	88,6
L1F	87,5
L2F	52,2
L3A	3
L1B	1
Bifidobacterias	
B1B	35,8
B1C	26,2
B1D	7,4
B1E	0,0
B1G	9,0
B2G	5,9
Estreptococos	
S2A	84,3
S1B	61,5
S2B	85,0

Cepa	Nivel de protección, %
S1C	45,8
S1D	93,8
S1E	89,7
S1F	8,2
S1G	11,7
S1H	42,3

De la Tabla 2 anterior se deduce que, sorprendentemente, las cepas de *Bifidobacterium* no conferían resistencia al estrés oxidante, mientras que conferían un ciclo de vida prolongado a C. *elegans* cuando se cultivaban en condiciones anaerobias (Ikeda *et al.,* 2007; antes citado). Además, sorprendentemente, solo muy pocas cepas de *Streptococcus* y *Lactobacillus* fueron capaces de conferir resistencia al estrés oxidante en un nivel mayor que el de la cepa de control. Las cepas que mejoraban la viabilidad en ausencia de estrés oxidante no eran necesariamente las cepas que proporcionaban también la mejor protección frente el estrés oxidante. Esto indica que el efecto mejorado de las bacterias de ácido láctico sobre la viabilidad no sólo es causado por un efecto sobre el estrés oxidante ya que sólo muy pocas cepas específicamente seleccionadas de *Streptococcus* y *Lactobacillus* tienen capacidad anti-estrés oxidante, en comparación con la *E. coli* OP50 de control.

Ejemplo 2: Efecto de cepas seleccionadas de bacterias de ácido láctico sobre la resistencia frente al estrés oxidante de *C. elegans* de tipo natural desarrollado en placas de agar-agar.

Se desarrollaron *C. elegans* N2 de tipo natural en placas de agar-agar con un medio de desarrollo de nematodos (NG) durante 5 días (para sincronizar los gusanos) con céspedes de *E. coli* OP50 o con céspedes de cepas seleccionadas de bacterias de ácido láctico del Ejemplo 1 que les confirieron una protección frente al estrés oxidante y se incubaron con H_2O_2 3 mM durante 5 horas. La viabilidad de los gusanos se evaluó justo antes y después de la incubación de 5 horas y se determinó el porcentaje de supervivencia bajo estrés oxidante determinando el porcentaje de gusanos que murieron durante el tiempo de incubación. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Nivel de protección frente al estrés oxidante por H_2O_2 3 mM, conferido por las bacterias de ácido láctico con relación a la protección conferida por *E. coli* OP50 en placas de agar-agar.

Cepa	Protección frente al estrés oxidante,% con relación a *E. coli* OP50
L10C	162
L11D	162
L3E	106
L11C	57
L4B	69
L8A	0
S1D	38
S1E	49

En el ensayo en placas de agar-agar (en lugar de pocillos) se mostró que cepas específicas de bacterias de ácido láctico ejercían un efecto protector frente al estrés oxidante, pero no todas las cepas analizadas en el Ejemplo 1

resultaron ser eficaces frente al estrés oxidante. De las 99 cepas, 3 cepas de *Lactobacillus*, 10C, 11D y 3E, fueron eficaces frente al estrés oxidante.

De las cepas de *Streptococcus* analizadas (S2B, S1E y S1D) ninguna fue capaz de proteger frente al estrés oxidante a un nivel superior al de E. *coli* OP50 en el ensayo en placas de agar-agar.

De lo anterior se deduce que el método en placas de agar-agar resulta ser más selectivo que el ensayo en placas de microtitulación. Dado que el ensayo en placas de agar-agar es más laborioso y consume más tiempo que el ensayo en placas de microtitulación, el ensayo en placas de agar-agar puede usarse adecuadamente cuando sólo se analizan pocas cepas de calidad alimentaria.

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar bacterias de calidad alimentaria con propiedades antioxidantes, que comprende:

a) una etapa de sincronización del desarrollo de gusanos *Caenorhabditis elegans*;

b) una etapa de alimentación de gusanos *C. elegans* con las bacterias de calidad alimentaria que se han de analizar;

c) una etapa de incubación de gusanos *C. elegans* en presencia de estrés oxidante;

d) una etapa de determinación de la viabilidad de dichos gusanos *C. elegans* que se incubaron en presencia de estrés oxidante; y

e) una etapa de selección de las bacterias de calidad alimentaria que permiten la mayor supervivencia de dichos gusanos *C. elegans* en presencia de estrés oxidante.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que:

- la etapa *c* comprende además una etapa de incubación de gusanos *C. elegans* en ausencia de estrés oxidante como control, y por que

- la etapa *d* comprende además una etapa de comparación de la viabilidad de dichos gusanos *C. elegans* que fueron incubados en presencia de estrés oxidante con la viabilidad de dichos gusanos *C. elegans* que fueron incubados en ausencia de estrés oxidante.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que dichos gusanos *C. elegans* son cepas mutantes BA17 fem-1(hc17) de *C. elegans.*

4. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 3, caracterizado por que dicho *C. elegans* se desarrolla en los pocillos de una placa de microtitulación.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 3, caracterizado por que el *C. elegans* se desarrolla en placas de agar-agar.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 5, caracterizado por que un grupo de gusanos recibe una alimentación a base de *Escherichia coli*, más preferiblemente *E. coli* OP50, como control.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 6, caracterizado por que los gusanos se desarrollan y se incuban en presencia de un antibiótico.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 7, caracterizado por que dicho antibiótico es kanamicina, preferiblemente kanamicina a una concentración de 10 a 100 µg/mL.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 8, caracterizado por que dicho estrés oxidante se aplica añadiendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2), preferiblemente a una concentración final de 1 a 20 mM.

10. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 9, caracterizado por que dicha etapa *c.* se realiza durante 5 minutos a 48 horas, preferiblemente durante 1 hora a 10 horas.

11. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 10, caracterizado por que dichas bacterias de calidad alimentaria son cepas que pertenecen a las bacterias de ácido láctico.

12. El uso de *Caenorhabditis elegans* en un método para seleccionar bacterias de calidad alimentaria con propiedades antioxidantes.

13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado por que dichas bacterias de calidad alimentaria son bacterias de ácido láctico.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, caracterizado por que el *C. elegans* es la cepa mutante BA17 fem-1(hc17) de C. *elegans.*