

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 541**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A23L 1/03** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2012 E 12718244 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2707476**

54 Título: **Cepa de Lactobacillus fermentum CECT 7472 con propiedades probióticas**

30 Prioridad:

**06.05.2011 EP 11382132**

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

**29.10.2015**

73 Titular/es:

**BIOTMICROGEN, S.L. (25.0%)  
Avde. Innovación, 1 Parque Tecnológico de  
Ciencias de la Salud  
18100 Armilla, ES;  
CAJAMAR CAJA RURAL, SOCIEDAD  
COOPERATIVA DE CRÉDITO (25.0%);  
SOCIEDAD COOPERATIVA ANDALUZA LA  
PASTORA DE TABERNO (25.0%) y  
SOCIEDAD COOPERATIVA ANDALUZA LOS  
FILABRES (25.0%)**

72 Inventor/es:

**LASSERROT CUADRADO, AGUSTÍN;  
RUIZ LÓPEZ, MARIA DOLORES y  
RUIZ BRAVO LÓPEZ, ALFONSO**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 549 541 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 de *Lactobacillus fermentum* CECT 7472 con propiedades probióticas

La presente invención se relaciona con los campos de microbiología y tecnología de alimentos y particularmente, con una cepa probiótica novedosa de *Lactobacillus fermentum* para uso en el beneficio de la salud.

## 5 Técnica antecedente

La *Listeria monocytogenes* es uno de los agentes causantes de infecciones transmitidas por alimentos potencialmente fatales. Los síntomas clínicos van desde gastroenteritis febril hasta formas invasivas graves que incluyen meningitis, encefalitis, abortos, septicemia e infecciones perinatales. Esta bacteria es un patógeno facultativo Gram-positivo, que desarrolló múltiples estrategias para hacer frente a los mecanismos de defensa innatos del anfitrión. La *L. monocytogenes* puede contaminar la leche directamente como consecuencia de mastitis por *Listeria* y es una bacteria que se puede encontrar en el queso, yogur y otros alimentos, ya que puede resistir el proceso de maduración de la mayoría de estos derivados lácteos.

Debido a los grandes porcentajes de mortalidad (meningitis, 70%; septicemia, 50%; e infecciones perinatales, 80%), hay un creciente interés en la búsqueda de buenas estrategias terapéuticas contra la listeriosis (infección provocada por *L. monocytogenes*).

Hoy en día, la listeriosis se trata rápidamente con penicilina o ampicilina parenteral, y para los pacientes alérgicos a la penicilina, se utiliza trimetoprim-sulfametoxazol. Todos estos métodos terapéuticos se basan en composiciones farmacéuticas, que aparte de los efectos secundarios asociados a las mismas, no tienden a ser beneficiosos para el paciente.

Por otro lado, la *Yersinia enterocolitica*, que es una bacteria en forma de coccobacillus Gram-negativa, provoca diarrea severa en los humanos, junto con necrosis parcelar de Peyer, linfadenopatía crónica y abscesos hepáticos o esplénicos. Otros síntomas pueden incluir entero-colitis, fiebre, adenitis mesentérica, eritema nudoso e ileítis terminal aguda, que se puede confundir con apendicitis o enfermedad de Crohn. Debido a que la *Yersinia* es una bacteria siderófila (amante al hierro), las personas con hemocromatosis hereditaria (una enfermedad que resulta en altos niveles de hierro en el cuerpo) son más susceptibles a la infección por *Yersinia* (y otras bacterias siderófilas). De hecho, el contaminante más común de la sangre almacenada es *Y. enterocolitica*.

El tratamiento de las infecciones por *Y. enterocolitica* a menudo requiere terapia antibiótica agresiva, que normalmente suele implicar ciprofloxacina, cloranfenicol, ampicilina, y polimixina.

La *Lactobacillus fermentum* es una bacteria de ácido láctico Gram-positiva (LAB), que se encuentra comúnmente en muchos productos alimenticios fermentados, especialmente los productos lácteos. Las cepas de *L. fermentum* son especialmente adecuadas para la preparación industrial de productos alimenticios fermentados gracias a su buen índice de supervivencia a través del proceso industrial y el período de conservación, así como también su alto perfil de acidificación y buenas propiedades organolépticas. Algunas cepas de *L. fermentum* también se consideran como probióticos. Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administra en cantidades adecuadas, proporcionan beneficios para la salud del anfitrión. Para ser denominadas como probióticas, las bacterias deben cumplir varios requisitos relacionados con su falta de toxicidad, su resistencia a los ambientes ácidos y sales biliares, su viabilidad en alcanzar vivas el tracto gastrointestinal inferior (GIT), y su adhesión a las células de la mucosa intestinal, entre otros. La mayoría de las bacterias probióticas pertenecen al grupo LAB pero, sin embargo, se sabe en general que las características y beneficios probióticos son extremadamente dependientes de la cepa, incluso entre LAB de la misma especie, como es ampliamente aceptado y con el consenso de los comités científicos.

Algunas cepas de *Lactobacillus* han mostrado cierta actividad contra infecciones por *L. monocytogenes*. Con respecto a esto, el informe de Kotsou et al, "In vitro Assessment of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains from Infant Gut Microflora", Food Biotechnology 2008, Vol. 22, pp. 1-17, representa diferentes especies de *Lactobacillus* con propiedades probióticas y reporta una actividad in vitro contra la *L. monocytogenes*. Aunque una de las especies de *Lactobacillus* es una cepa de *L. fermentum* (denominada LF-B21), los datos del informe no permiten correlacionar la actividad contra el patógeno con esta cepa. La LF-B21 adicionalmente tiene la desventaja de que es pobremente resistente al ambiente de las sales biliares. Por otra parte, Kotsou et al. indican claramente que con el fin de tener de datos concluyentes se requieren pruebas en animales, es decir, el comportamiento in vitro no es una condición indispensable para que los ensayos in vivo tengan éxito.

Para enfrentar infecciones por *Y. enterocolitica* se debe mencionar el documento de Frick et al., "Lactobacillus fermentum Attenuates the Proinflammatory Effect of *Yersinia enterocolitica* on Human Epithelial Cells", Inflamm. Bowel Disease - 2007, Vol. 13, pp. 83-90. Este documento muestra una cepa de *L. fermentum* (DSMZ 20052) que reporta actividad in vitro como un inmunomodulador y un agente anti-inflamatorio contra una cepa de *Yersinia*

enterocolítica no virulenta (curada con plásmido, pYV-) cuando se produce la infección por Y. enterocolítica. A saber, la cepa DSMZ 20052 tiene la capacidad de inhibir la secreción de IL-8 inducida por Y. enterocolítica. Los autores informan que el efecto anti-inflamatorio se debe a un fosfolípido soluble producido por la cepa de L. fermentum. No obstante, ni la adhesión a ni la invasión de Y. enterocolítica en células HeLa se inhibe por la coinfección con L. fermentum. Finalmente se concluyó que esta cepa de L. fermentum puede tener propiedades probióticas que modulan las respuestas inflamatorias intestinales, ofreciendo de esta manera nuevas estrategias terapéuticas, y que se deben realizar pruebas adicionales en modelos animales. Como se expuso anteriormente, se obtuvo este plásmido curado pYV- Yersinia enterocolítica como se indica en la referencia bibliográfica Heesemann et al., "Genetic manipulación de virulence of Yersinia enterocolítica", Contrib Microbilia Immunol - 1987, Vol. 9, pp. 312-316. Se sabe ampliamente que las cepas de plásmidos Curados se utilizan por ser cepas no virulentas. Por lo tanto, Frick et al. no muestran la capacidad o la función de la L. fermentum para tratar y limpiar infecciones por Yersinia enterocolítica. Muestran la capacidad de inhibir la inflamación inducida por Yersinia.

Varios documentos describen cepas de Lactobacillus y algunas de L. fermentum que muestran actividad in vitro contra un amplio espectro de patógenos, como Listeria monocytogenes, Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Yersinia enterocolítica, Staphylococcus aureus, Shigella flexneri, Bacillus subtilis y Pseudomonas aeruginosa, entre otros. Ejemplos de dichos documentos son los informes de Bao et al., "Screening of potential properties of Lactobacillus fermentum isolated from traditional dairy products", Food Control 2010, Vol. 21, pp. 695-701; y el informe de Mojgani et al., "Screening of locally Isolated Acid Bacteria for Use as Probiotics in Poultry in Iran", The Journal of Poultry Science 2007, Vol. 44, pp. 357-365. Cabe de señalar que las diferentes cepas de L. fermentum descritas ya sea por Bao et al. o por Mojgani et al. proceden de múltiples fuentes (productos lácteos no bien definidos de nacionalidades minoritarias, o de aves de corral, respectivamente). Esta variabilidad en la fuente de los microorganismos conduce a diferentes especímenes (cepas) con propiedades in vitro específicas.

No obstante, hay que mencionar que todos estos documentos mencionados anteriormente muestran datos in vitro que no se pueden extrapolar directamente a los datos in vivo. De hecho, es ampliamente aceptado que no existe una relación entre la capacidad in vitro de una cepa para inhibir el crecimiento de enteropatógenos y la posible protección conferida por la misma cepa en un modelo in vivo. Los ensayos in vitro no representan un entorno entérico real o equivalente. En este contexto, y sin estar limitado por la teoría, pueden suceder diversas situaciones no concurrentes. Por ejemplo, una cepa de L. fermentum puede ser activa contra un enteropatógeno in vitro debido a la secreción de una bacteriocina, cuya bacteriocina nunca será secretada una vez que la cepa esté en un ambiente entérico, probablemente debido a la complejidad de este sistema alternativo in vivo.

Por lo tanto, la técnica falla en el suministro de cepas de L. fermentum con ventajas probadas y el mantenimiento de efectos in vivo. Por lo tanto, haciendo imposible su aplicabilidad a favor de la salud por medio de formulaciones factibles. Más aún, y a pesar de los avances en el campo de los probióticos orales, es claro a partir de lo anterior que las nuevas cepas probióticas son necesarias, que tienen un amplio rango de beneficios en el tracto intestinal u otros órganos, no presentan efectos adversos y permiten la fabricación de formulaciones factibles.

#### Resumen de la invención

Los inventores han aislado una nueva cepa probiótica de L. fermentum que no altera las características organolépticas de los productos comestibles y también retiene su actividad probiótica en formulaciones comestibles agradables, tales como alimentos funcionales. Adicionalmente, la cepa de L. fermentum es altamente activa contra los trastornos gastrointestinales o síntomas de los mismos síntomas de los mismos. Adicionalmente, la cepa tiene efectos inmunomoduladores ventajosos.

De esta manera, en un primer aspecto la invención proporciona una nueva cepa aislada de Lactobacillus fermentum depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bajo el número de acceso CECT 7472, el 4 de diciembre de 2008.

La cepa de L. fermentum de la invención, aislada de leche de cabra (Capra aegagrus hircus, de origen español y de la raza denominada murciano-granadina) se deposita, de acuerdo con el Tratado de Budapest, el día 4 de diciembre de 2008 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en la Universidad de Valencia C.P 46980 Catedrático Agustín Escardino N° 9 Patema, Valencia (España) (anteriormente en la Universidad de Valencia C.P 46100 Burjasot, Valencia (España)), por el depositante Sr. Agustín Lasserrot Cuadrado, ubicado en BIOT, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida de la Innovación n°1, C.P 18100 Armilla, Granada (España). La cepa de L. fermentum se identifica por el depositante con la referencia D3, y recibe el número de acceso CECT CECT 7472 después que la Autoridad Internacional de Depósito declara la cepa como viable.

El depositante, Sr. Agustín Lasserrot autorizado por BIOTMICROGEN, S.L., ubicada en el Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. de la Innovación 1, 18100 Armilla, Granada (España), se refiere al material biológico depositado en la solicitud de patente Europea que tiene el número de referencia de representante P1829EP00, y tiene su autorización no reservada e irrevocable para el material depositado que está disponible al público desde la fecha de presentación de esta solicitud de patente.

- 5 La cepa, objeto de la invención, es ventajosa sobre las otras cepas de la técnica anterior, debido a que es activa contra las infecciones provocadas por las cepas virulentas de enteropatógenos de Listeria monocytogenes y Yersinia enterocolitica. De hecho, la Lactobacillus fermentum CECT 7472 es capaz de acortar de forma significativa la colonización del tracto intestinal por una cepa de Yersinia enterocolitica virulenta, promoviendo de esta manera la eliminación de Yersinia y la pronta cicatrización de las enfermedades provocadas por dicha bacteria. Por el otro lado, la cepa es capaz de limpiar la presencia del patógeno intracelular L. monocytogenes de órganos vitales, tales como el bazo y el hígado. Por lo tanto, las enfermedades provocadas por Listeria se curan o evitan.
- En el sentido de esta invención “patógenos intracelulares” son microorganismos que son capaces de crecer y reproducirse dentro de las células de un anfitrión.
- 10 El término “enteropatógeno” se debe entender como abarcando cualquier microorganismo que causa la enteropatía o patología en el intestino.
- Las ventajas mencionadas anteriormente son de gran relevancia, pero la cepa de L. fermentum CECT 7472 también proporciona otras aplicaciones interesantes derivadas del hecho de que se puede formular como un producto comestible, y se puede administrar fácilmente.
- 15 En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un cultivo bacteriano puro que comprende la L. fermentum CECT 7472.
- Este cultivo puro, así como la propia cepa, se puede utilizar en un producto comestible que comprende una cantidad nutricionalmente efectiva o suficientemente saludable de la cepa, junto con cantidades apropiadas de otros ingredientes comestibles.
- 20 Los términos “cantidad efectiva” y “cantidad suficientemente saludable” como se utiliza aquí significa una cantidad de un agente activo lo suficientemente alta para proporcionar el beneficio deseado, pero lo suficientemente baja para evitar efectos secundarios dentro del alcance del juicio médico.
- Como se mencionó anteriormente, la formulación de la cepa de la invención como un producto comestible proporciona composiciones atractivas y agradables que se pueden administrar en la comida. De esta manera, la cepa produce sus efectos ventajosos al consumir los alimentos.
- 25 El término “producto comestible” se utiliza aquí en su sentido más amplio, incluyendo cualquier tipo de producto, en cualquier tipo de presentación, que puede ser ingerida por un animal, pero con exclusión de los productos farmacéuticos y veterinarios.
- 30 Otro aspecto de la invención es, por lo tanto, un proceso para la preparación de dicho producto comestible, y el cultivo de L. fermentum CECT 7472 del mismo en un medio adecuado, tal como un sustrato de alimentos. El proceso comprende agregar la cepa en el producto. El producto comestible puede contener múltiples ingredientes comestibles o solo uno.
- 35 Más aún, la cepa de L. fermentum CECT 7472 mantiene sus características probióticas cuando se incluye en el producto comestible.
- La cepa de Lactobacillus fermentum CECT 7472 es también para su uso como promotor de la salud del tracto gastrointestinal.
- 40 Un “promotor de salud del tracto gastrointestinal” es cualquier ingrediente que mejora la salud del tracto gastrointestinal en términos para proporcionar una buena calidad de vida gastrointestinal (digestión, absorción, defecación), que a su vez se sabe tiene un buen impacto en el la calidad de vida completa de un individuo que incluye el estado físico, psicológico y social. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la salud es un estado del bienestar social, físico y psicológico completo y no la sola ausencia de enfermedades.
- 45 La cepa de L. fermentum CECT 7472 de la invención es adicionalmente probablemente útil como un agente profiláctico y/o terapéutico, debido a la capacidad de interferir con la Listeria monocytogenes y Yersinia enterocolitica.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica que muestra las unidades logarítmicas (ULOG) de la Y. enterocolitica detectada en las heces de ratones tratados (cuadrado) y no tratados (triángulo) en relación con los días posteriores a la infección (d).

La Figura 2 y La Figura 3 son gráficos que indican el logaritmo de las unidades de formación de colonia de L. monocytogenes por gramo de tejido (Log CFU/g) en hígado y bazo, respectivamente. Las barras negras son los animales de control (no tratados con L. fermentum); las barras blancas son los animales tratados (previamente tratados con L. fermentum); d3 significa en el día 3 postinfección; d6 significa en el día 6 postinfección.

- 5 La Figura 4 es un diagrama de barras que representa el número de diferentes bacterias adheridas por la célula Caco-2 (N/c) en un ensayo de adhesión realizado con Y. enterocolitica O9 (Y. enterocolitica O9); L. fermentum CECT 7472 (L. fermentum) y Bacillus subtilis (B. subtilis).

10 La Figura 5 y La Figura 6 muestran las unidades de formación de colonia (Log<sub>10</sub> CFU) en el bazo de ratones BALB/c después de varios días (d) post-inoculación de L. fermentum CECT 7472 en animales de control y animales inmunodeprimidos, respectivamente.

15 La Figura 7 es un diagrama de barras que muestra el estado físico general de algunos individuos que consumen leche de cabra que contiene 10<sup>7</sup> CFU/ml de Lactobacillus fermentum CECT 7472. T0 es el tiempo 0 o antes del consumo; y T1 es el tiempo 1 o después del consumo. Los valores en el eje Y indican el estado físico general, que es una forma para evaluar la satisfacción y calidad de vida gastrointestinal de los individuos, de acuerdo con la prueba de GIQLI.

La Figura 8 es una imagen de microscopio óptica de 1000x de células Caco-2. Las flechas muestran la cepa L. fermentum CECT 7472 adheridas a la superficie de las células.

#### Descripción detallada de la invención

20 Aunque ha habido diversos intentos en utilizar cepas probióticas para tratar o prevenir muchas enfermedades, existe una gran variabilidad cuando se utilizan los probióticos en el tratamiento de trastornos gastrointestinales. Ahora se ha encontrado que la L. fermentum CECT 7472 es altamente activa contra los enteropatógenos peligrosos y patógenos intracelulares, prevenir y/o reducir los síntomas gastrointestinales provocados por estos.

Cuando se utiliza como ingrediente en un producto lácteo comestible de la cepa de L. fermentum CECT 7472 está presente en un rango de 10<sup>9</sup> a 10<sup>10</sup> CFU/g (unidades de formación de colonias de CFU).

25 El producto comestible se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de un producto lácteo, un yogurt, una cuajada, un queso, una leche fermentada, una leche en polvo, un producto fermentado a base de leche, producto fermentado a base de carnes, un helado en crema, un producto fermentado a base de cereal, un polvo con base en leche, una bebida, una harina, una goma para mascar, una comida para mascotas, un complemento dietético, un alimento funcional, una formulación de nutrición, y una fórmula para adultos mayores y niños.

30 Particularmente, los productos comestibles de interés son los complementos dietéticos y fórmulas infantiles. En el sentido de la presente invención, los complementos dietéticos incluyen también nutracéuticos, que se saben son extractos de alimentos que tienen un efecto nutricional en la salud humana. Los alimentos para animales también se incluyen en el alcance de la invención. Las composiciones de la invención se pueden utilizar también como ingrediente en otros productos alimenticios.

35 Como se ilustra adelante, la cepa de L. fermentum CECT 7472 es especialmente adecuada para productos de leche de cabra, a pesar de que se puede utilizar en todos los tipos de leche. Por lo tanto, vale la pena mencionar que un yogur líquido o sólido de leche de cabra con altas características organolépticas se puede hacer utilizando la cepa de la invención como aditivo junto con iniciadores fermentados comunes, tales como Lactobacillus delbrueckii bulgaricum, Streptococcus thermophilus.

40 Cuando se emplea la cepa de L. fermentum CECT 7472 de la invención como un ingrediente de una composición de producto comestible, dicha cepa se utiliza preferiblemente en la forma de un líquido en inóculos medianos.

45 Los ejemplos adelante demuestran que la cepa es adecuada para su uso en beneficio de la salud gastrointestinal, mejorando de este modo los trastornos del tracto gastrointestinal o síntomas de los mismos. En el sentido de la presente invención los "trastornos gastrointestinales" son enfermedades y síndromes de los diferentes órganos que constituyen el tracto gastrointestinal, e incluyen diarrea, síndrome del intestino irritable, enfermedad intestinal inflamatoria, dolor abdominal, estreñimiento, enfermedad de Crohn, o hinchazón, necrosis parcelar de Peyer, linfadenopatía crónica, gastroenteritis y abscesos hepáticos o esplénicos. Todas estas enfermedades pueden tener una etiología bacteriana o es el resultado de factores complejos, tales como la predisposición genética de cualquier individuo, o de otros.

Cuando los trastornos gastrointestinales o síntomas asociados provienen de infecciones enteropatógenas, se ha determinado que la cepa L. fermentum CECT 7472 es especialmente útil cuando los patógenos son de Y. enterocolitica y L. monocytogenes.

5 De esta manera, la cepa L. fermentum CECT 7472 es especialmente útil como promotor de la salud del tracto gastrointestinal cuando el tracto está invadido por un patógeno seleccionado del grupo que consiste de Yersinia enterocolitica y Listeria monocytogenes. En la misma forma, un producto comestible que comprende la cepa proporciona el mismo efecto.

10 Adicionalmente, otra característica ventajosa de la cepa de la invención es su función como agente modulador de la respuesta inmune. A saber, la cepa L. fermentum CECT 7472 promueve la producción de la interleuquina-10 (IL-10) anti-inflamatoria, regulación por aumento de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), y por consiguiente la activación de macrófagos inhibe el crecimiento de patógenos.

La producción de citoquinas por las células de bazo de L. fermentum tratada y la respuesta de ratones no tratados para mitógenos de células B y células T se mide mediante ensayos ELISA comerciales.

15 Por lo tanto, la cepa L. fermentum CECT 7472 muestra la capacidad de modular per se la producción de citoquinas, que son moléculas mensajeras que regulan las respuestas inflamatorias e inmunes en el cuerpo. Estos efectos inmunomoduladores son beneficiosos para el anfitrión, ya que ayudan a lograr una resistencia a las enfermedades mejorada y disminuye el riesgo de alergias. Se sabe que las bacterias Gram negativas que viven en el GIT muestran las moléculas de LPS (lipopolisacárido) en su superficie celular, que induce la producción de marcadores inflamatorios de las células mucosas intestinales. Los lipopolisacáridos (LPS) constituyen el antígeno O y las bacterias Gram negativas endotoxina, que desempeñan una función importante en la patogénesis de las infecciones bacterianas, así como en la interacción con el anfitrión y su sistema de defensa. La suplementación probiótica con L. fermentum CECT 7472 en la forma de un producto comestible, puede cambiar esta situación, para favorecer una mayor presencia de bacterias Gram positivas en el GIT (incluyendo el grupo de bacterias del ácido láctico), y el aumento de propiedades antagonistas contra algunos microorganismos Gram negativos y por lo tanto reducir la presencia de LPS en el GIT.

Todas estas aplicaciones de la L. fermentum CECT 7472 en favor de la salud de los animales, que incluye humanos, entonces inspira a fabricar alimentos funcionales formulados con esta cepa efectiva tales como yogures u otros productos lácteos fermentados.

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y variaciones de la palabra, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la técnica luego del examen de la descripción o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitantes de la presente invención. Adicionalmente, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas descritas en este documento.

### 35 Ejemplos

#### Ejemplo 1. Aislamiento y caracterización de la cepa

40 El aislamiento inicial se llevó a cabo a partir de leche de cabra en agar MRS (marca comercial RENEL). La leche era de cabras españolas de la especie *Capra hircus* (*Capra hircus aegagrus*, de origen España y de la raza denominada murciano-granadina). La detección se llevó a cabo utilizando tinción de Gram y la prueba de producción de catalasa, descartando todos aquellos que no fueron bacilos gram-positivos y negativos a catalasa. Después, se realizó una caracterización bioquímica de las cepas seleccionadas y se identificaron las principales especies como que pertenecen principalmente al género *Lactobacillus*, *Lactobacillus plantarum* (42%) y *Lactobacillus acidophilus* (15%) y, en una menor cantidad, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. paracasei* y *L. fermentum*. Una vez que se caracterizaron las cepas, se aislaron en cultivo puro y se conservaron a 4° C para estudios posteriores.

45 El patrón de fermentación de *Lactobacillus D3* (CECT 7472) es el siguiente:

- D-Ribosa
- D-galactosa
- D-Glucosa
- D-Manosa

- D-maltosa
- D-lactosa
- D-rafinosa
- D-gluconato de Potasio

5 **Ejemplo 2.** Efecto de la cepa Lactobacillus fermentum CECT 7472 en un modelo in vivo de infección por Yersinia enterocolitica.

Se utilizó un modelo de infección por Yersinia enterocolitica virulenta para evaluar la resistencia a los enteropatógenos. Dos grupos de seis ratones hembras BalbC/c, de 20 g de peso cada uno, a uno se le administró (vía intraesofágica) durante doce días, Lactobacillus fermentum CECT 7472, y al otro (el grupo control) sólo se le administró el vehículo.

Después del período de tratamiento de doce días, las tandas de estudio y control se inocularon con Yersinia enterocolitica O9, se infectaron con la suspensión a una concentración de  $10^8$  CFU de bacterias a través de la vía intraesofágica con una cánula rígida. A partir de entonces, se realizaron coprocultivos cuantitativos periódicamente, durante quince días, en cada animal para determinar la cantidad de Yersinia por gramo de heces. Diariamente, hasta el final del experimento, a los animales se les administró una dosis convencional de Lactobacillus fermentum CECT 7472.

Los resultados mostraron que ambos lotes fueron infectados con el enteropatógeno (que se detectó en las heces desde el primer día después de la inoculación). No hubo diferencias significativas entre ambos casos durante el primer mes, pero, finalmente, en el día 50 después de la infección todos los animales tratados con el Lactobacillus fermentum CECT 7472 fueron capaces de eliminar la Y. enterocolitica, debido a que la Yersinia no se encontró en las heces. Al grupo de control le tomó 70 días eliminar las bacterias, lo que demuestra que el efecto de la Lactobacillus fermentum CECT 7472 aunque no impide el desarrollo de la infección, actúa favorablemente para recuperarse de la infección y superarla en un corto periodo de tiempo significativo.

Los resultados obtenidos en el anterior ensayo in vivo se representan en la Figura 1, en donde se muestra el logaritmo de las unidades de formación de colonias de Y. enterocolitica en las heces versus el día postinfección. Los datos en cuadrados corresponden a los valores obtenidos de los animales tratados, y los datos en triángulos son los controles (no tratados).

**Ejemplo 3.** Efecto de la cepa L. fermentum CECT 7472 en un modelo in vivo de infección por L. monocytogenes

Para demostrar la resistencia a patógenos intracelulares se utilizó un modelo de infección por Listeria monocytogenes. Al igual que en el modelo de Yersinia (Ejemplo 2), se ensayaron dos grupos de seis animales. A un grupo se le administró continuamente la Lactobacillus fermentum CECT 7472 seleccionada durante doce días y al grupo de control sólo se le administró el vehículo. Después, ambos grupos se inocularon con una suspensión de Listeria monocytogenes por vía intraesofágica.

Este modelo de infección induce una sepsis en general en el animal después de cuarenta y ocho horas. Por lo tanto, en el tercer y sexto día después de infección, la mitad de cada grupo fue sacrificado por dislocación cervical. Se tomaron los hígados y bazo en todos los casos y se homogeneizaron para ser cultivados con el fin de enumerar las bacterias de infección.

La Figura 2 y la Figura 3 son gráficos que indican el logaritmo de unidades de formación de colonias de L. monocytogenes por gramo de tejido (cfu/g) en el hígado y bazo, respectivamente, en el tercer y sexto día postinfección de los ratones. Los datos que se derivan de estas figuras muestran claramente que los animales de control (barras negras) presentan siempre niveles más altos de microorganismos que los animales tratados. Vale la pena mencionar que en el sexto día después de infección el bazo estaba libre del patógeno intracelular, lo que indica que la presencia de la cepa probiótica L. fermentum CECT 7472, actúa como agente profiláctico para evitar o reducir el desarrollo de infecciones causadas por L. monocytogenes.

45 **Ejemplo 4.** Caracterización de las propiedades probióticas de la cepa L. fermentum CECT 7472.

Con el objetivo de determinar las características probióticas de la nueva cepa aislada de L. fermentum, se realizaron varios ensayos que finalmente resultaron en la conclusión de que la cepa CECT 7472 es un buen probiótico.

Es importante señalar que cada cepa bacteriana interactúa con el epitelio del GIT en una forma específica. Por esta razón, cuando se define una cepa prebiótica, se necesita la mención de una cepa específica, en lugar de una generalización de especie. Es decir, los datos de una cepa específica no se extrapolan directamente a enteros completos de la especie en sí misma.

5 4.1. Resistencia al ambiente de ácido gástrico y de sales biliares.

De acuerdo con las directrices de la FAO, que son las directrices emitidas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, los probióticos utilizados en alimentos deben sobrevivir en su paso por el tracto gastrointestinal y ser capaces de crecer en el intestino. Por lo que deben ser resistentes al ácido gástrico y ser capaces de crecer con las sales biliares. Adicionalmente, los probióticos deben tener efectos beneficiosos en el anfitrión.

La cepa L. fermentum CECT 7472 es significativamente resistente al ácido gástrico y es capaz de crecer con una alta concentración de sales biliares, demostrando de esta manera su capacidad para atravesar las barreras gástricas y llegar al colon para establecerse allí.

4.1.1 Resistencia al ambiente de ácido gástrico.

15 Una concentración de  $10^8$  CFU/ml de suspensión bacteriana de un cultivo de L. fermentum de 24 horas se trató con HCL 0.15N durante 45 minutos para simular las condiciones gástricas. Después de la incubación, las diluciones decimales se sembraron en agar MRS y se incubaron a 37° C durante 24 a 48 horas. Se preparó un grupo de control utilizando solución salina estéril en lugar de HCl. Finalmente, se enumeraron las colonias en condiciones de HCl y control.

20 4.1.2 Ambiente de resistencia a sales biliares.

Se colocaron en placas diluciones decimales de un cultivo de L. fermentum CECT 7472 de 12 horas a una concentración de  $10^8$  CFU/ml en agar MRS complementado con diferentes concentraciones biliares 0,05% para simular las condiciones gastrointestinales. Las placas se incubaron a 37° C durante 24 a 48 horas. Se preparó un grupo de control al sembrar las diluciones en agar MRS sin complementación de bilis utilizando solución salina estéril. Finalmente, se enumeraron las colonias en todas las condiciones ensayadas.

La Tabla 1 ilustra las unidades de formación de colonias finales de L. fermentum CECT 7472 detectadas después de los tratamientos con ácido y bilis. Se utilizó como control una solución salina.

Tabla 1:

	Descripción	Conteo (CFU/mL)
HCL	Solución salina (Control)	$2,8 \cdot 10^6$
	HCl 0.15 N	$8,0 \cdot 10^5$
Bilis	Solución salina (Control)	$2,9 \cdot 10^8$
	Bilis 0.05 %	$1,3 \cdot 10^8$

30 4.2. Efecto sobre enteropatógenos.

La cepa de L. fermentum CECT 7472 mostró actividad antimicrobiana contra diversos enteropatógenos, gram-positivos y gram-negativos.

Los ensayos in vitro mostraron inhibición de las siguientes cepas:

- Cepa Yersinia enterocolitica, IP383, serotipo 09,

35 - Listeria monocytogenes ATCC 13932

- Salmonella enteric Serovariedad Enteritidis, serotipo Londres

5 Una gota de una suspensión bacteriana a  $10^8$  CFU/ml de un cultivo de 24 horas L. fermentum CECT 7472 se sembró en el centro de placas de Petri de agar MRS y se incubó a 35° C durante 24 horas. Luego, se inocularon tubos TSA con diferentes suspensiones bacterianas de Yersinia enterocolitica, Listeria monocytogenes y Salmonella enteritidis serovariedad enteritidis, a una concentración de  $10^{10}$  CFU/ml. Después, se vertió sobre las placas previamente sembradas de la cepa L. fermentum CECT 7472. Estas placas se incubaron a 37° C durante 24 horas y se midieron los halos de inhibición de crecimiento alrededor de L. fermentum CECT 7472.

La Tabla 2 muestra los halos de inhibición en milímetros detectados en las placas para cada cepa del patógeno ensayado.

Tabla 2:

Cepas	Halo (mm)
<u>Y. enterocolitica</u>	54
<u>L. monocytogenes</u>	65
<u>S. enterica</u>	30

10 Como se puede observar en la Tabla 2, la cepa L. fermentum CECT 7472 inhibe altamente el crecimiento de los patógenos.

#### 4.3. Adhesión a células Caco-2.

La capacidad de adherirse a la superficie de enterocitos se considera como un requerimiento para las bacterias probióticas.

15 Para evaluar la capacidad de adherencia a las estirpes celulares se utilizaron células Caco-2. Esta estirpe celular proviene de cáncer de colon humano. Estas células muestran muchas características de las células epiteliales intestinales humanas, que tiene características morfológicas y bioquímicas similares a los enterocitos. Por lo tanto, los resultados de ensayos con células Caco-2 serán capaces de correlacionarse con aquellos de los enterocitos humano.

20 La estirpe celular se cultivó en una única capa y luego se incubó con la cepa durante 2 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después, la única capa se fijó y se tiñó con azul de metileno.

La capacidad de adhesión se realizó al contar la cantidad de bacterias adheridas por célula en 10 campos consecutivos utilizando un microscopio. Como control positivo y negativo se utilizó Yersinia enterocolitica O9 y Bacillus subtilis, respectivamente. Estos resultados se muestran en la Figura 4.

25 Los resultados en la Figura 4, que muestran el número de células bacterianas adheridas por célula de Caco-2, revelan claramente que la L. fermentum CECT 7472 de la invención se adhiere bien al modelo celular intestinal. Por lo tanto, se puede concluir que la L. fermentum CECT 7472 se adhiere bien a las células del epitelio del colon de los individuos a quienes se administra el probiótico. En la Figura 8 también se muestra una imagen de microscopio óptico al 1000 x de la cepa adherida a las células.

#### 30 **Ejemplo 5.** Ensayos de toxicidad y los datos de bioseguridad.

35 La cepa seleccionada pertenece al género Lactobacillus, un género que se ha utilizado históricamente en la fermentación de alimentos, siendo clasificada generalmente como segura, incluida en la clasificación internacional GRAS. Generalmente reconocido como seguro es una denominación creada por el organismo de Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) en 1958. La FDA adjudica las categorías de GRAS a las sustancias o compuestos considerados seguros para la salud, y por lo tanto no requieren evaluaciones adicionales.

Sin embargo, se realizan pruebas de bioseguridad de la cepa L. fermentum CECT 7472, que son los siguientes:

##### 5.1. Producción de enzimas perjudiciales.

Se sabe que algunos probióticos, debido a su metabolismo, son capaces de producir actividades enzimáticas nocivas, tales como  $\alpha$ -quimotripsina,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -glucosidasa y N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa.

5 Para detectar la presencia de estas enzimas se utilizó un equipo de APIZYM-Biomerieux comercial. Este equipo es un método cuantitativo para determinar simultáneamente hasta 19 actividades enzimáticas. La cepa L. fermentum CECT 7472 no mostró ninguna de esas actividades enzimáticas dañinas.

#### 5.2. No infectividad en animales inmunocomprometidos.

10 Para comprobar la bioseguridad de L. fermentum CECT 7472 se utilizaron ratones hembra BALB-c, de 20 g de peso cada uno. Se utilizaron dos tandas, una inmunocompetente y la otra inmunocomprometida, este último grupo mediante inmunosupresión. Este tratamiento asegura leucopenia en los animales durante cinco días después de la última inyección. Todos los animales se inocularon con L. fermentum CECT 7472 y posteriormente se extrajeron los bazo en condiciones estériles para ser homogenizados en una solución estéril, de la cual se tomaron disoluciones decimales y más tarde se llevaron a un medio MRS (medio Man, Rogosa y Sharpe) para una incubación posterior a 37° C durante 24 horas con el fin de enumerar finalmente las colonias, expresadas como bacterias viables por órgano.

15 La Figura 5 representa los datos correspondientes a los animales inmunocompetentes y Figura 6 corresponde a la inmunodeprimido. Estos resultados verifican que hay buena depuración de bacterias a través del bazo, concluyendo que la L. fermentum CECT 7472 no es perjudicial como un microorganismo patógeno, ya sea en animales inmunocompetentes o inmunodeprimidos.

Los datos corresponden al resultado de tres repeticiones.

20 La Figura 5 representa la CFU log<sub>10</sub> de L. fermentum CECT 7472 versus el día postinoculación de la cepa probiótica aislada en ratones inmunocompetentes. De foma análoga, en la Figura 6 se ilustran los datos de ratones inmunodeprimidos.

#### 5.3. Translocación de la barrera intestinal

25 Para demostrar que la L. fermentum CECT 7472 no es capaz de translocación de la barrera intestinal se llevó a cabo un ensayo con doce ratones BALB-c inmunosuprimidos. A estos ratones se les administró 100 microlitros de L. fermentum CECT 7472 en una concentración de 10<sup>9</sup> microorganismos viables por microlitro ( $\mu$ L) a través de vía intraesofágica durante doce días. Después del tratamiento los animales fueron sacrificados, y se extrajeron sus ganglios linfáticos mesentéricos y bazo en condiciones estériles, posteriormente se homogeneizaron en una solución estéril de la que se tomaron disoluciones decimales y más tarde se llevaron a un medio MRS para una incubación posterior a 37° C durante 24 horas para finalmente enumerar las colonias, expresadas como bacterias viables por órgano. Se observó falta de crecimiento en todos los cultivos obtenidos de todas las muestras de los animales, lo que indica que la L. fermentum CECT 7472 no es capaz de pasar a través de la barrera intestinal, no es capaz de alcanzar a otras partes del cuerpo. Por lo tanto, no puede producir infección sistémica.

35 Todos estos datos tomados en conjunto indican claramente que la nueva cepa aislada de la invención es biosegura, y se puede administrar con seguridad a un organismo humano o animal.

#### Ejemplo 6. Actividad de inmunomodulación

Para evaluar el efecto inmunomodulador de la cepa L. fermentum CECT 7472, se utilizaron 40 ratones hembras BALB-c de 20 g de peso. A estos animales se les administró los probióticos a través d vía intraesofágica por períodos de entre 12 y 15 días.

#### 40 6.1. Ensayo de proliferación de esplenocitos

En primer lugar, se estudió la capacidad de proliferación de esplenocitos en presencia de mitógeno. Después de administrar el probiótico, las células esplénicas de los animales se cultivaron en placas de microtítulo y se incubaron a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> y bajo humedad saturada durante 72 horas en presencia de dos agentes mitogénicos, LPS (mitógeno estándar de células B) y concanavalina A (Con A, mitógeno estándar de célula T).

45 La proliferación celular se determinó mediante un método colorimétrico que mide reducción de MTT (derivado de tetrazolio) utilizando un lector microELISA (ThermoLabsystems Multiskan EX), establecido previamente para leer la absorbancia a 570 nm y 630 nm. Los resultados se expresaron como la media aritmética de la densidad óptica.

Los resultados obtenidos muestran que la administración del probiótico condujo a un aumento general de la respuesta inmune, que estimula la proliferación mediada por mitógenos de células B (LPS) y también la proliferación de células T (Concavalina A, Con A) Sin embargo, debido a la alta desviación estándar, el aumento en respuesta de Con A no fue estadísticamente significativo. Por lo tanto, hay un efecto de inmunopotenciación que puede resultar en un aumento en la resistencia a infecciones.

6.2. Evaluación in vivo de la capacidad de inmunomodulación de la producción de citoquinas por esplenocitos.

Para cuantificar las citoquinas, se utilizaron equipos ELISA de Thermo Scientific (Rockford, EE.UU.) con anticuerpos monoclonales de ratón. Las lecturas se realizaron utilizando inmunoensayos enzimáticos a partir de sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de animales tratados con el probiótico L. fermentum CECT 7472. Como control se utilizó un grupo de animales que recibieron sólo el vehículo (leche desnatada estéril). Se midieron TNF-alfa, interferón gamma (IFN-γ) y las interleuquinas IL-2, IL-4 y IL-10 y, después el análisis estadístico, se observó un incremento de la inmunidad celular debido al aumento de la producción de interferón gamma (IFN-γ), que actúa al activar los macrófagos, haciéndolos más efectivos en la destrucción de patógenos intracelulares. Este efecto da como resultado una mayor resistencia a infección por estos microorganismos. También se reveló un efecto antiinflamatorio debido al aumento en IL-10, que coincidió con una disminución de TNF-alfa.

Algunas enfermedades intestinales inflamatorias relacionadas con la autoinmunidad se asocian con cambios en el microambiente bacteriano intestinal. El uso de probióticos como la cepa de L. fermentum CECT 7472 puede ayudar a controlar la modulación de células T y células B, así como otros mecanismos inmunológicos implicados en la prevención de estas enfermedades.

**Ejemplo 7.** Composición fermentada de leche de cabra comestible

Los inventores también han desarrollado diversas composiciones comestibles, tales como los alimentos funcionales que se fabrican al agregar en dichas composiciones la cepa L. fermentum CECT 7472.

En una alternativa, dicha cepa se utiliza como un aditivo con los iniciadores de fermentación habituales, tales como la combinación de Lactobacillus bulgaricus delbrueckii y Streptococcus thermophilus.

La fermentación del ácido láctico utiliza azúcares de hidrólisis de lactosa (glucosa y galactosa) como sustratos. La bacterias Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus transforman la lactosa en ácido láctico. Durante el proceso de fermentación, se modifica la estructura de las proteínas de la leche, lo que resulta en la textura típica del producto, que es la razón de la elección y la cantidad del iniciador seleccionado, así como las condiciones de fermentación fisicoquímicas son importantes en el proceso. Adicionalmente, al ácido láctico, se produce una pequeña cantidad de subproductos tales como acetona, acetaldehído, diacetilo y glucanos, sustancias que proporcionan el olor y sabor típico del producto.

Un yogur de leche de cabra se obtuvo al inocular dicha leche con los iniciadores comunes L. delbrueckii bulgaricus y S. thermophilus y después se agregó el proceso de fermentación de L. fermentum CECT 7472 como aditivo en la cantidad de 10<sup>7</sup> CFU/ml.

La leche inoculada con los iniciadores se incubó durante un tiempo promedio de 4 a 5 horas, hasta alcanzar un pH final de aproximadamente 4.7. Luego, se realizó un rápido enfriamiento hasta 4° C y finalmente se embotello en recipientes de polietileno de 125 ml adecuados para uso alimenticio.

La Tabla 3 muestra los datos fisicoquímicos de análisis de dos muestras yogur, así como su tiempo de fermentación y el pH del producto final.

Tabla 3.

Muestra	Tiempo de fermentación (h)	pH final	Lactosa (%)	Acidez (%)	Grasa (%)	Ceniza (%)	Proteínas (%)
Y2	5.50	4.29	3.04	0.85	2.88	0.78	3.68
Y3	6.25	4.32	3.02	0.85	3.80	0.76	3.63

De acuerdo con la legislación vigente sobre el pH del yogur este debe ser igual o inferior a 4.6. Por lo tanto, es necesario determinar su valor para verificar el cumplimiento de la legislación. Por otra parte, la acidez del yogur indica el porcentaje de ácido láctico presente. Ambos valores deben estar correlacionados.

Los valores de los parámetros mostrados en la Tabla 3 se determinaron mediante las siguientes técnicas:

5 - Grasa. Determinación de grasa por el método Gerber. Regla Internacional de la Federación Láctea Internacional, FIL-IDF 22: 1963.

- Acidez. Determinación de acidez mediante volumetría. Regla FIL-IDF-26:1964 de la Federación Láctea Internacional.

- Ceniza. Determinación de extracto seco. Regla FIL-IDF-21: 1962 de la Federación Láctea Internacional.

10 - Lactosa. Determinación de Lactosa. Regla FIL-IDF-28: 1964 de la Federación Láctea Internacional.

- Proteínas. Determinación de proteínas mediante el método Kjeldahl. Regla FIL-IDF-20: 1962 de la Federación Láctea Internacional.

15 Al comparar ambos procesos de fermentación se determinó que el tiempo de fermentación del yogur No. 3 (Y3) fue mayor que en el yogur No. 2 (Y2). Una buena correlación de los resultados, en términos de composición química, se muestra en la tabla. La diferencia en cantidad de grasa entre ambas muestras fue significativa (0.92%) por lo que se determinó que existía una relación directa entre la cantidad total de grasa inicial en la materia prima y el tiempo promedio de fermentación.

20 Otro factor destacado en el proceso de fermentación es la elección correcta de los microorganismos de fermentación. Para desarrollar el producto fermentado, los inventores probaron diferentes iniciadores de algunas marcas comerciales.

Los procesos de fermentación se realizaron utilizando como iniciador la mezcla de S. thermophilus y L. bulgaricus delbrueckii (muestra Y3 de la Tabla 4), o la mezcla de S. thermophilus y L. delbrueckii lactis (muestra Y5 de la Tabla 4)

Tabla 4.

Muestra	Tiempo de fermentación (h)	pH final	Acidez (%)	Grasa (%)	Ceniza (%)
Y5	4.75	4.45	0.90	3.7	0.77
Y3	6.25	4.32	0.85	3.8	0.76

25 Ambos, la L. delbrueckii ssp. Lactis y L. delbrueckii ssp. Bulgaricus resultan en productos con características organolépticas similares en términos de olor y sabor, a pesar de que las fermentaciones con L. delbrueckii ssp. Bulgaricus resultaron en un cuerpo más sólido del producto. Por eso, este inóculo fue elegido para elaborar yogures sólidos.

30 En todas las fermentaciones, de leches similares en términos de composición química y contenido de grasa, los tiempos de fermentación y los valores de pH fueron muy similares, lo que ayudó a la estandarización de los procesos y, por lo tanto, las calidades del producto final.

35 Con respecto al producto de leche de cabra fermentado, vale la pena mencionar las ventajas de este tipo de producto con respecto a otras fuentes de leche. De hecho, ha sido ampliamente aceptado que en los últimos años la leche de cabra está teniendo una función más importante en su consumo debido a sus propiedades nutritivas y digestivas. Muchos estudios han documentado que la leche de cabra es más beneficiosa para la salud que la leche de vaca o de oveja. Los glóbulos de grasa son más pequeños y con un alto contenido de ácidos grasos de cadena media, que promueve su digestión y absorción. Sus proteínas también se digieren más fácilmente y su potencial alérgico es menor. Adicionalmente, tiene alto contenido de fósforo y calcio biodisponible. Su consumo está especialmente recomendado en trastornos digestivos, síndrome de mala absorción y para personas jóvenes y de edad avanzada.

40

Sin embargo, los efectos beneficiosos de la leche de cabra en comparación con otras fuentes de leche no se detienen aquí. También se ha documentado que la absorción de minerales es mayor, produciendo hierro, que puede ser muy útil para personas con osteoporosis o anemia.

5 El producto de leche de cabra fermentado comestible de la presente invención representa una interesante mejora sobre los productos comercializados en el campo de los alimentos funcionales. De hecho, se proporciona en un solo producto los beneficios de la leche de cabra fermentada y los beneficios agregados de la incorporación de un microorganismo L. fermentum CECT 7472 que interactúa ventajosamente con el sistema inmunológico y la salud en general.

**Ejemplo 8.** Prueba de aceptabilidad.

10 Con el fin de determinar si el producto de leche fermentada del Ejemplo 7 era factible y tenía buenas propiedades organolépticas, se realizaron varias pruebas con voluntarios. Los voluntarios evaluaron diferentes muestras de yogur incluyendo un yogur de leche de cabra del Ejemplo 7 (Y3), un yogur comercial de leche de cabra, un yogur comercial ecológico de leche de vaca y un yogur comercial industrial de leche de vaca.

15 Se les hicieron preguntas a los voluntarios a cerca del sabor, color y textura de los yogures. Todos los datos fueron analizados por diferentes metodologías y luego afirmaron que el yogur de leche de cabra del Ejemplo 7 (Y3) fue favorablemente aceptado y 10% de los voluntarios lo consideran como el mejor.

**Ejemplo 9.** Prueba de calidad de vida gastrointestinal en humanos

20 Un estudio nutricional fue diseñado de acuerdo con las directrices de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), el código de Nuremberg, el convenio colectivo de Oviedo (España) y teniendo en cuenta la Ley 15/1999 española sobre la protección de datos personales. Cada voluntario firmó un documento de autorización informado que explica todos los compromisos y riesgos derivados del estudio, así como su autorización para participar libremente sin ser remunerado.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la salud es un estado del bienestar social, físico y psicológico completo y no la sola ausencia de enfermedades.

25 Se les hizo preguntas a los voluntarios acerca de la "calidad de vida gástrica". La prueba utilizada para evaluar la calidad de vida gástrica de los voluntarios estudiados fue la denominada encuesta GIQLI, por lo que el objetivo fue evaluar el estado físico y mental de los voluntarios antes y después del tratamiento con el probiótico. Adicionalmente, esta encuesta se ha utilizado con éxito en algunos estudios para la evaluación nutricional de los alimentos y productos lácteos fermentados en individuos sanos (Vázquez et al, "Application of GIQLI questionnaire to two groups of healthy yogurt consumers", Nutr Hosp - 2005, Vol.20, pp.420-428).

30 En una primera visita, una encuesta de calidad gastrointestinal se realizó a todos los participantes (prueba GIQLI), así como también fueron instruidos para seguir una dieta estandarizada que incluyó algunas restricciones de alimentos y medicinas.

35 Se recogieron las primeras muestras basales (tiempo 0) después de un mes de restricciones de alimentos, donde los voluntarios eliminan algún tipo de alimento de su dieta tal como yogur, queso y pepinillos, así como medicamentos como antiácidos y antibióticos. El propósito de esta muestra fue descartar la presencia de poblaciones nativas de bacterias de ácido láctico en estos individuos y también la interferencia de la medicina.

40 Después de estas primeras muestras basales, los voluntarios comenzaron a tomar el producto fermentado probiótico. Específicamente 200 ml/día de leche de cabra fermentada a una concentración de  $10^7$  CFU/ml de L. fermentum CECT 7472. El tratamiento con el probiótico fue de 30 días.

Las calificaciones de la prueba GIQLI se obtuvieron al final de dos períodos de estudio: después del período de restricciones alimenticias (tiempo 0, T0) y después del período de fermentación de ingestión de productos lácteos (tiempo 1, T1 = 30 días). En la mayoría de los casos, la calificación en el tiempo 1 superó la calificación en el tiempo 0.

45 Como se puede ver en la Figura 7, que es un diagrama de barras que muestra el estado físico general de los individuos en el tiempo 0 (T0) y en el tiempo de 1 (T1), la satisfacción de los individuos fue mayor después del consumo de la leche de cabra que contenía  $10^7$  CFU/ml de Lactobacillus fermentum CECT 7472.

50 La prueba GIQLI determina si el producto tiene una influencia en la calidad de vida gastrointestinal y una buena aceptabilidad para los consumidores en términos de digestión y defecación, así como si tiene una influencia positiva en el estado de bienestar general. Esta prueba es una extensa prueba, útil para analizar diversos aspectos de la

salud. Es una prueba reproducible, y una prueba sensible, lo que significa que es capaz de detectar pequeñas variaciones del estado de salud.

5 Los resultados afirman que el producto de leche de cabra con L. fermentum CECT 7472 tuvo una influencia positiva en la calidad de vida gastrointestinal. Más aún, el producto fue bien tolerado por los individuos, que informaron de un buen estado de bienestar después de ingestión del producto.

El análisis concluyó que los individuos se sintieron mejor después del consumo de la cepa probiótica de la invención.

Todos los ejemplos enumerados adjuntos concluyeron que la cepa L. fermentum CECT 7472, y los productos comestibles que la componen son productos útiles para el control de la microflora intestinal, promoción de la salud y calidad de vida de los individuos.

10 Aunque las cepas de L. fermentum han sido reportadas previamente por tener actividad in vitro contra algunas enteropatógenos, la presente invención va un paso más allá al ofrecer no sólo datos interesantes in vivo, sino también al proporcionar una cepa de L. fermentum que, debido a sus propiedades inherentes, incrementa la mejora de los resultados o efectos sobre las cepas L. fermentum de la técnica anterior. De hecho, y como se indicó anteriormente, la facultad de ser capaz de ser administrada en forma de un producto comestible hace que la cepa L. fermentum CECT 7472, y todos los derivados que la contengan, sean productos de interés en el ámbito de las  
15 industrias de alimentación y nutrición y, en general, para la salud.

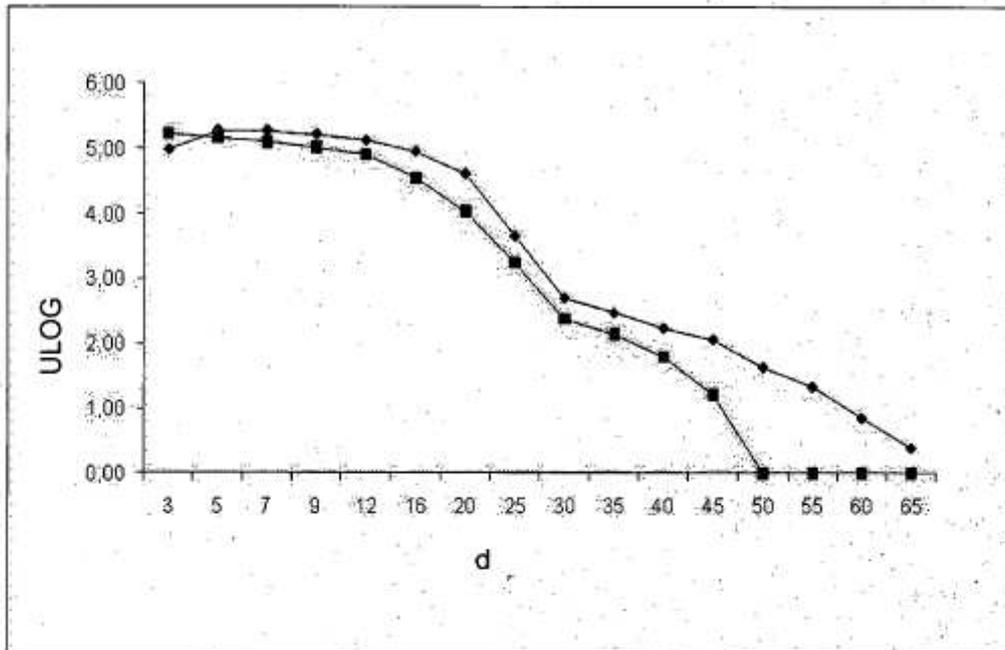
#### Referencias citadas en la solicitud

- Kotsou et al, "In vitro Assessment of Probiotic Properties of Lactobacillus Strains from Infant Gut Microflora", Food Biotechnology 2008, Vol. 22, pp. 1-17.
- 20 - Frick et al., "Lactobacillus fermentum Attenuates the Proinflammatory Effect of Yersinia enterocolitica on Human Epithelial Cells", Inflamm. Bowel Disease, Vol. 13, pp. 83-90.
- Bao et al., "Screening of potential properties of Lactobacillus fermentum isolated from traditional dairy products", Food Control 2010, Vol. 21, pp. 695-701.
- Mojgani et al., "Screening of locally Isolated Acid Bacteria for Use as Probiotics in Poultry in Iran", The Journal of  
25 Poultry Science 2007, Vol. 44, pp. 357-365.
- Vázquez et al., "Application of GIQLI questionnaire to two groups of healthy yogurt consumers", Nutr Hosp-2005, Vol.20, pp.420-428.
- Heesemann et al., "Genetic manipulation of virulence of Yersinia enterocolitica", Contrib Microbila Immunol 1987, Vol. 9, pp. 312-316.

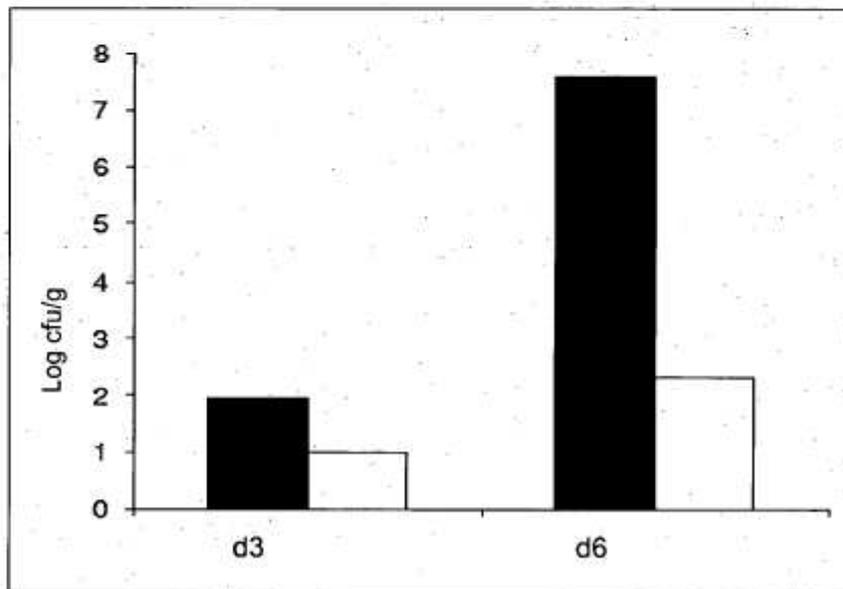
30

**REIVINDICACIONES**

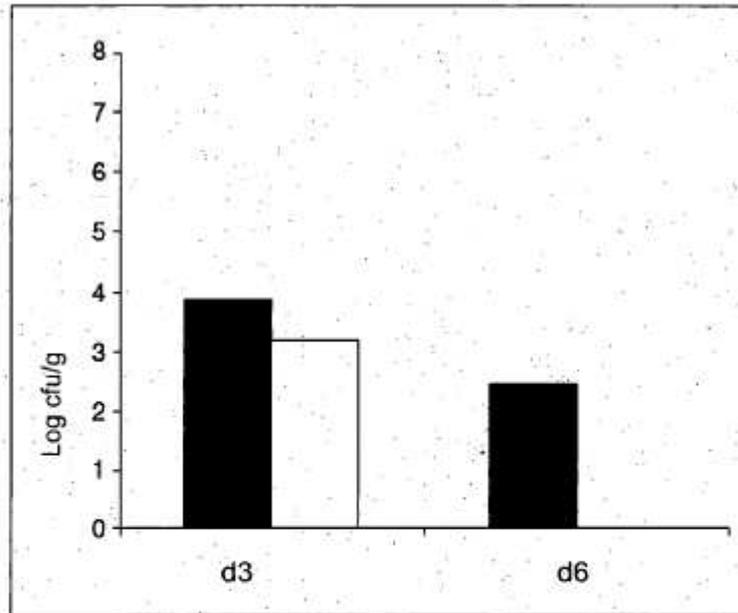
1. Una cepa aislada de Lactobacillus fermentum depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bajo el número de acceso CECT 7472.
2. Un cultivo puro bacteriano que comprende la cepa de la reivindicación 1.
- 5 3. Un producto comestible que comprende una cantidad nutricionalmente efectiva de la cepa como se define en la reivindicación 1, junto con cantidades adecuadas de otros ingredientes comestibles.
- 10 4. El producto comestible de acuerdo con la reivindicación 3, que se selecciona del grupo que consiste de un producto lácteo, un yogurt, una cuajada, un queso, una leche fermentada, una leche en polvo, un producto fermentado a base de leche, un producto fermentado a base de carne, un helado en crema, un producto fermentado a base de cereal, una bebida, una harina, una goma para mascar, un dulce, un alimento dulce, una comida para mascotas, un complemento dietético, un alimento funcional, una fórmula de nutrición clínica, un complemento nutricional, una fórmula para las personas mayores y una fórmula para los niños.
- 15 5. Un proceso para la preparación de un producto comestible como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, que comprende agregar la cepa como se define en la reivindicación 1 o un cultivo como se define en la reivindicación 2 en dicho producto comestible.
6. La cepa de Lactobacillus fermentum CECT 7472 como se define en la reivindicación 1 para uso como un agente probiótico.
7. La cepa de Lactobacillus fermentum CECT 7472 como se define en la reivindicación 1 para uso como promotor de la salud del tracto gastrointestinal.
- 20 8. La cepa de acuerdo con la reivindicación 7, como promotor de la salud del tracto gastrointestinal cuando el tracto está invadido por un patógeno seleccionado del grupo que consiste de Yersinia enterocolitica y Listeria monocytogenes.
9. Un producto comestible como se define en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 como un promotor de la salud del tracto gastrointestinal.
- 25 10. El producto comestible de la reivindicación 9, que promueve la salud del tracto gastrointestinal cuando el tracto está invadido por un patógeno seleccionado de los grupos que consisten de Yersinia enterocolitica y Listeria monocytogenes.



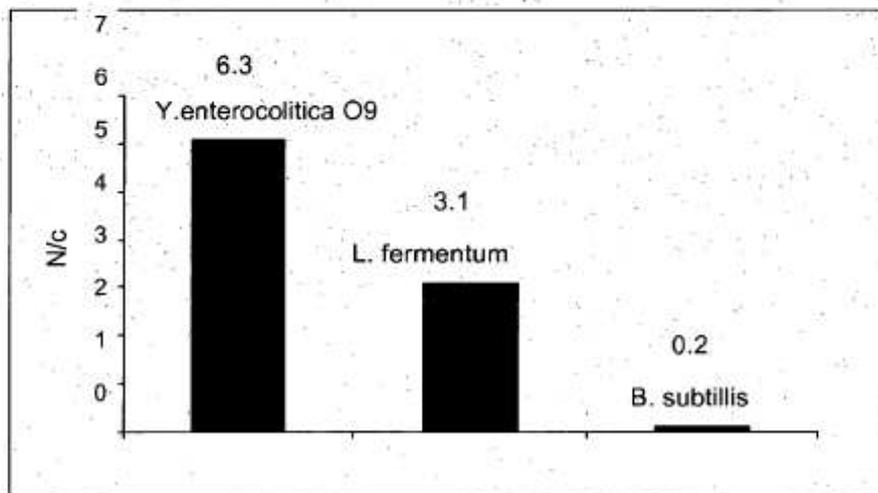
**FIG. 1**



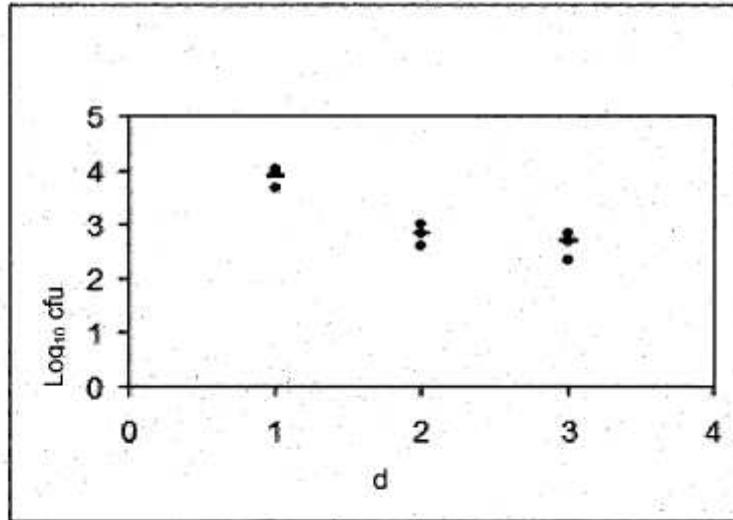
**FIG. 2**



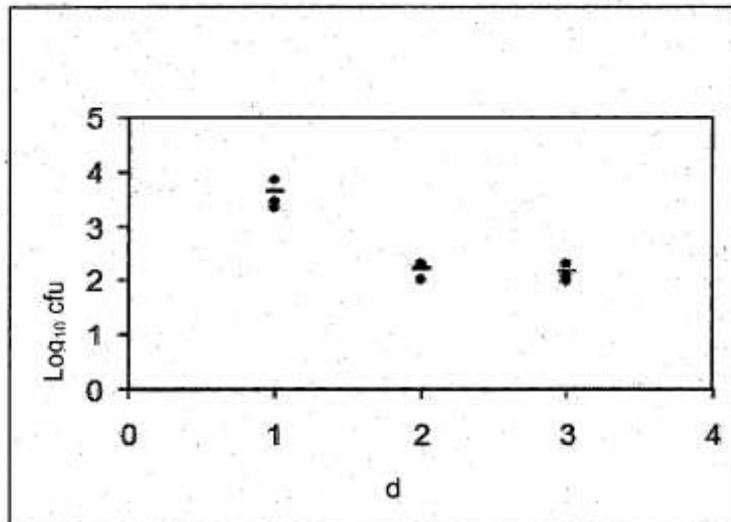
**FIG. 3**



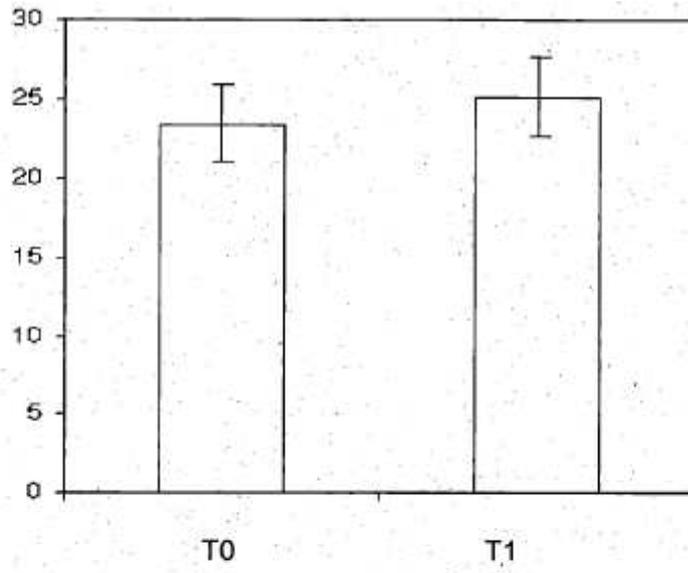
**FIG. 4**



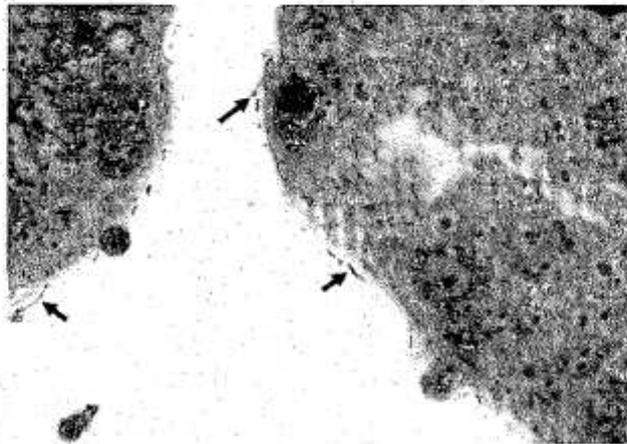
**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**



**FIG. 8**