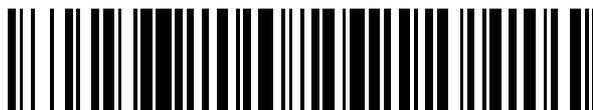


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 136**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2010 PCT/IB2010/000194**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11083354**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2010 E 10703681 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2521769**

54 Título: **Lactobacilos con acción antioxidante**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2016

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17 Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GROMPONE, GIANFRANCO;
DEGIVRY, MARIE-CHRISTINE;
LEGRAIN-RASPAUD, SOPHIE;
CHAMBAUD, ISABELLE y
BOURDET-SICARD, RAPHAËLLE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 587 136 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

Lactobacilos con acción antioxidante

Campo

5 La presente invención se refiere al campo de las composiciones que comprenden bacterias probióticas para uso en la prevención o el tratamiento del estrés oxidativo

Técnica antecedente

10 Todos los sujetos vivos mantienen un ambiente reductor en sus células. Sin embargo, debido al metabolismo aerobio de las mitocondrias y a otros factores se producen especies derivadas de oxígeno reactivo tales como peróxidos y radicales de oxígeno libre. El ambiente reductor está preservado por enzimas tales como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Si se perturba el estado redox normal, las especies de oxígeno reactivo pueden dañar todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y especialmente el ADN. Este desequilibrio entre la producción de especies de oxígeno reactivo y la capacidad de detoxificar los intermedios reactivos o reparar el daño producido por las especies de oxígeno reactivo se denomina estrés oxidativo.

15 En seres humanos, el estrés oxidativo es un importante factor en el envejecimiento y las enfermedades degenerativas asociadas con el envejecimiento tales como el cáncer, artritis, diabetes, aterosclerosis, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de Parkinson, insuficiencia cardíaca, enfermedad de Alzheimer, y enfermedad de Huntington. La teoría del envejecimiento por radicales libres define que los organismos envejecen debido a que las células acumulan el daño producido por las especies de oxígeno reactivo en el tiempo.

20 Se conocen en la técnica unas pocas cepas de bacterias acidolácticas con propiedades antioxidantes. Por ejemplo, el documento US 6.884.415 divulga un producto alimenticio antioxidante producido fermentando un producto alimenticio que contiene una cepa de *L. plantarum* que tiene actividad Mn-catalasa, en presencia de un material natural que contiene manganeso. Las propiedades antioxidantes de esta cepa dependen de la presencia de manganeso. El documento WO 03/002131 divulga una cepa de *L. fermentum* (ME-3) y su uso como un probiótico antioxidante. El documento WO 00/20013 divulga el uso de cepas de *Lactobacillus* o *Propionibacterium* que dan lugar a mayores cantidades de ácido propiónico en el intestino para la reducción del nivel de los factores de estrés oxidativo tales como IL-6, especies de oxígeno reactivo y moléculas de adhesión. Una cepa preferida divulgada en este documento es *Lactobacillus plantarum* 299v.

30 Ikeda et al, (2007, AEM 73:6404-6409) compararon la duración de la vida ya la resistencia a *Salmonella* de los gusanos *C. elegans* alimentados con bacterias acidolácticas (lactobacilos y bifidobacterias) con la de los gusanos alimentados con *Escherichia coli* OP50 (el alimento estándar de *C. elegans*). Informan que todos los lactobacilos o bifidobacterias ensayados tienen un efecto similar sobre el aumento de la duración de la vida y la resistencia a la *Salmonella* cuando se comparan con *E. coli* OP50. Sin embargo, no se evaluó el efecto de las bacterias acidolácticas sometidas a estrés oxidativo.

Sumario de la invención

35 Los inventores han ensayado el efecto de las bacterias acidolácticas sobre *C. elegans* sometido a estrés oxidativo, en comparación con los alimentados con *E. coli* del control. Han descubierto que, a diferencia de lo observado por Ikeda et al. en lo que se refiere a la duración de la vida, solo unas pocas cepas muy específicas de *Lactobacillus* evitaban los efectos perjudiciales de este estrés oxidativo impuesto.

40 La presente invención proporciona por tanto cepas de *Lactobacillus* seleccionadas por los inventores sobre la base de su capacidad de aliviar los efectos sobre *C. elegans* del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H₂O₂), para uso como antioxidante cuando se administra *in vivo* a un sujeto, y, por tanto, para tratar, aliviar, o evitar las condiciones o las manifestaciones clínicas relacionadas con el estrés oxidativo.

45 Las cepas de *Lactobacillus* identificadas por los inventores son especialmente adecuadas para preparar composiciones antioxidantes que se van a administrar especialmente en la forma de alimento o suplemento dietético a mamíferos, en particular seres humanos, expuestos a estrés oxidativo, tal como personas mayores, empleados por turnos, estudiantes durante periodos de examen, bomberos, sujetos expuestos a radiaciones o a la contaminación del aire. Especialmente, las personas mayores son un grupo diana adecuado, debido a que el intestino envejecido y la inmunosenescencia es propensa a una resistencia menos eficaz al estrés oxidativo y a la producción de ROS. Las cepas de *Lactobacillus* de la presente invención son por tanto especialmente adecuadas para mejorar la calidad de vida en personas mayores mediante una intervención nutricional.

Descripción detallada de la invenciónCepas de *Lactobacillus*

Se describen a continuación las tres cepas específicas de *Lactobacillus* divulgadas por los inventores:

La primera cepa es la cepa DN 114 001 de *Lactobacillus casei*, que se depositó según el Tratado de Budapest en la CNMC (Collection National de Cultures de Microorganismes, 25 Rue du Docteur Roux, París) el 30 de diciembre de 1994 con el número I-1518. Se divulgan características detalladas de esta cepa en la solicitud PCT WO 96/20607.

5 La segunda cepa es la cepa DN 116 010 de *Lactobacillus rhamnosus*, que se depositó según el Tratado de Budapest en la CNMC el 19 de noviembre de 2006 con el número I-3690. Se divulgan características detalladas de esta cepa en la solicitud PCT WO 2009/122042.

10 Una tercera cepa es la cepa DN 116 063 de *Lactobacillus rhamnosus* que se depositó según el Tratado de Budapest en la CNMC el 16 de diciembre de 2009 con el número I-4271. Se identificó que esta cepa pertenecía a *L. rhamnosus* sobre la base de la tipación de la PCR y la activación bioquímica con el kit API 50 CHL (Biomerieux, Francia). Según los resultados del Api 50 CHL, la cepa I4271 fermenta los siguientes azúcares y alcoholes: ribosa, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-sorbosa, ramnosa, manitol, sorbitol, metil-D glucósido, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celulosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, melezitosa, beta-gentiobiosa, D-turanosa, D-tagatosa, gluconato.

15 Se divulga también el uso de cepas mutantes o de cepas genéticamente transformadas derivadas de la cepa progenitora CNMC I-4271, y que siguen teniendo actividad antioxidante (es decir, que son capaces de aliviar los efectos en *C. elegans* del estrés oxidativo inducido por H₂O₂), para fines antioxidantes. Estas cepas mutantes o genéticamente transformadas pueden ser cepas en donde uno o más gen(es) endógeno(s) de la cepa progenitora se ha(han) mutado, por ejemplo, para modificar alguna de sus propiedades metabólicas (por ejemplo, su capacidad de fermentar azúcares, su supervivencia al transporte en el tracto gastrointestinal, su acidificación posterior o su producción de metabolitos). Pueden ser también cepas resultantes de la transformación genética de la cepa progenitora por uno o más gen(es) de interés, por ejemplo, a fin de proporcionar a dicha cepa características fisiológicas adicionales, o para permitirles expresar proteínas de interés terapéutico o vacunal que se desearía administrar a través de dichas cepas.

Composiciones:

25 La invención abarca también composiciones que comprenden la cepa CNMC I-4271 de *Lactobacillus*; para su uso como antioxidante cuando se administra *in vivo* a un sujeto, así como composiciones que contienen las cepas de *Lactobacillus* CNMC I-4271 e I-3690 de *Lactobacillus* para su uso como antioxidantes cuando se administran *in vivo* a un sujeto.

30 En las composiciones de la invención, dichas cepas de *Lactobacillus* se pueden usar en forma de bacterias completas, que pueden estar vivas o no. De forma alternativa, se pueden usar en forma de un lisado bacteriano o en forma de fracciones bacterianas; las fracciones bacterianas adecuadas para este uso se pueden seleccionar, por ejemplo, a partir del ensayo de sus propiedades para aliviar los efectos en *C. elegans* del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

35 Las composiciones de la invención pueden estar en cualquier forma adecuada para su administración, en particular, la administración oral. Estas incluyen, por ejemplo, sólidos, semisólidos, líquidos y polvos. Se prefieren generalmente composiciones líquidas para una administración más fácil, por ejemplo, bebidas.

40 Cuando las bacterias están en forma de bacterias vivas, la composición puede comprender normalmente 10⁵ a 10¹³ unidades formadoras de colonias (ufc), preferiblemente al menos 10⁶ ufc, más preferiblemente al menos 10⁷ ufc, aún de forma más preferente al menos 10⁸ ufc, y lo más preferente al menos 10⁹ ufc por g de peso seco de la composición. En el caso de una composición líquida, esto corresponde generalmente a 10⁴ a 10¹² unidades formadoras de colonias (ufc), preferiblemente al menos 10⁵ ufc, más preferiblemente al menos 10⁶ ufc, aún de forma más preferente al menos 10⁷ ufc, y lo más preferente al menos 10⁹ ufc/ml.

45 Ejemplos de las composiciones de la invención son composiciones nutritivas, incluyendo productos alimenticios, y, en particular productos lácteos. La administración en la forma de un producto lácteo fermentado tiene la ventaja adicional de proporcionar un producto alimenticio con bajo potencial rédox que no es solo ventajoso para el crecimiento o la supervivencia de las cepas de *Lactobacillus* sino también para el tratamiento y/o prevención adicional del estrés oxidativo en sujetos humanos que consumen el producto.

50 Las composiciones nutritivas de la invención incluyen también suplementos alimenticios, y alimentos funcionales. Un "suplemento alimenticio" designa un producto preparado a partir de compuestos normalmente utilizados en comestibles, pero que está en la forma de comprimidos, polvo, cápsulas, pociones o cualquier otra forma normalmente no asociada con alimentos, y que tiene efectos beneficiosos para la propia salud. Un "alimento funcional" es un alimento que tiene también efectos beneficiosos para la propia salud. En particular, los suplementos alimenticios y los alimentos funcionales pueden tener un efecto fisiológico –protector o curativo– frente a una enfermedad, por ejemplo, frente a una enfermedad crónica.

55 Otros ejemplos de composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas o cosméticas.

Las composiciones de la invención pueden comprender también una o más de diferentes cepas de bacterias acidolácticas, probióticas o no, por ejemplo, una o más cepa(s) bacteriana(s) seleccionada(s) entre los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, y *Bifidobacteria*. En particular, esta(s) otra(s) cepa(s) puede(n) incluir una o más cepa(s) de *Streptococcus thermophilus*, y/o una o más cepa(s) de *Lactobacillus bulgaricus*.

5 Aplicación

Las cepas de *Lactobacillus* y las composiciones de la presente invención son útiles para proteger frente al estrés oxidativo y/o para evitar el daño ejercido por el estrés oxidativo. Pueden por tanto utilizarse como antioxidantes para su administración para tratar o evitar enfermedades que implican el estrés oxidativo.

10 Se administran preferiblemente a seres humanos, en particular seres humanos que padecen estrés oxidativo, más preferiblemente personas mayores, empleados a turnos, estudiantes durante periodos de examen, bomberos, sujetos expuestos a radiaciones y/o a la contaminación del aire.

La presente invención proporciona de esta manera un método para tratar, aliviar, o evitar una dolencia relacionada con el estrés oxidativo en un sujeto que lo necesita, en donde dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cepa de *Lactobacillus* o una composición de la invención.

15 Especialmente, las personas mayores son un grupo diana adecuado, debido a que el intestino envejecido y la inmunosenescencia son propensos a una resistencia menos eficaz al estrés oxidativo y a la producción de ROS. El estrés oxidativo es también un factor importante en el envejecimiento: la teoría de los radicales libres del envejecimiento indica que los organismos envejecen debido a que las células acumulan los daños producidos por especies de oxígeno reactivo en el tiempo. Las cepas de *Lactobacillus* de la presente invención son por tanto
20 especialmente adecuadas para mejorar la calidad de vida en personas mayores mediante intervención nutricional. Una persona mayor es una persona que tiene una edad de 55 años o más, en particular, de la edad de 65 o más.

25 En seres humanos, el estrés oxidativo es también un importante factor etiológico en las enfermedades degenerativas tales como cáncer, artritis, diabetes arterioesclerosis, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de Parkinson, insuficiencia cardíaca, enfermedad de Alzheimer, y enfermedad de Huntington. Por tanto, las cepas y composiciones de la presente invención se administran ventajosamente a sujetos humanos que padecen y/o tienen riesgo de padecer una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, artritis, diabetes, arteriosclerosis, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de Parkinson, insuficiencia cardíaca, enfermedad de Alzheimer, y enfermedad de Huntington.

30 **Ejemplo 1: Efecto de las bacterias acidolácticas sobre la supervivencia de *C. elegans* con o sin estrés oxidativo en medio líquido**

Se han llevado a cabo experimentos con una cepa mutante de *C. elegans* (BA17 fem-1(hc17) que no es fértil a 25 °C, pero que retiene las características de duración de vida del tipo silvestre. Se sincronizaron gusanos BA17 aislando huevos de adultos grávidos a 20 °C, eclosionando los huevos durante la noche en medio M9 (10 % en volumen de MRS, fluorodexouridina 110 ug/ml) más 5 ug/ml de colesterol y aislando los gusanos de la etapa L₁ en
35 los pocillos de una placa de microvaloración. Los gusanos se hicieron crecer sin agitación durante tres días a 25 °C y 80-85 % de humedad relativa. Estas larvas se transfirieron a una placa que comprendía medio M9 más colesterol y se incubaron durante 3 días a 25 °C 80-85 % de humedad sometándose a alimentación control o experimental. Estaban presentes al menos 50 gusanos por pocillo.

40 Después de 3 días, cuando los gusanos habían alcanzado la etapa adulta, se aplicó el estrés oxidativo mediante la adición de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una concentración de 5 mM. Como control, no se utilizó H₂O₂. La resistencia antioxidante se leyó como viabilidad, se evaluó después de 5 h mediante microscopio. Los gusanos se incubaron en estas condiciones durante 5 horas. Para puntuar la capacidad antioxidante, se consideró que estaban muertos (debido al estrés) si estaban paralizados.

45 Se alimentó a los gusanos con 4*10⁶ ufc/ml del alimento estándar de *E. coli* OP50, o de diferentes cepas de bacterias acidolácticas que pertenecen a los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* o *Streptococcus*. Se añadió kanamicina, 30 µg/ml para evitar crecimiento de *E. coli* OP50 o de las bacterias acidolácticas ensayadas durante la prueba.

Supervivencia en ausencia de estrés oxidativo

50 En ausencia de estrés oxidativo durante el tiempo de incubación, la viabilidad de gusanos alimentados con *E. coli* varió entre 100 a aproximadamente 90 %. Las bacterias acidolácticas proporcionaron índices de supervivencia similares o mejores, lo que es indicativo de una duración de vida similar o aumentada, como se muestra en la Tabla 1 para alguna de las cepas ensayadas.

Tabla 1: Efecto de las bacterias acidolácticas alimentadas sobre la duración de vida de *C. elegans*.

Cepa - Especie	% de viabilidad
S2A – <i>S. thermophilus</i>	95,7
S1B – <i>S. thermophilus</i>	98,0
S2B – <i>S. thermophilus</i>	94,1
S1C – <i>S. thermophilus</i>	94,5
S1D – <i>S. thermophilus</i>	98,2
S1E – <i>S. thermophilus</i>	100,0
S1F – <i>S. thermophilus</i>	95,
S1G – <i>S. thermophilus</i>	98,2
S1H – <i>S. thermophilus</i>	97,1
L2A – <i>L. acidophilus</i>	91,9
L5A – <i>L. casei</i>	100
L6A – <i>L. delbrueckii</i>	94,1
L8A – <i>L. johnsoni</i>	96,0
L9A – <i>L. plantarum</i>	91,75
OP50	89,5

Esto está según el hallazgo de Ikeda et al. (2007, citado anteriormente).

Supervivencia bajo estrés oxidativo

- 5 Se ensayó el efecto de 99 cepas de bacterias acidolácticas sobre la supervivencia en estrés oxidativo con H₂O₂ 2, 3 y 5 mM. En la presencia de H₂O₂ 5 mM, la viabilidad en la presencia de *E. coli* OP50 fue de aproximadamente el 93 % en comparación con la ausencia de estrés. Esto es indicativo de un 93 % de protección frente al estrés oxidativo. La siguiente Tabla 2 muestra el efecto de las bacterias acidolácticas seleccionadas sobre la protección frente al estrés oxidativo, mostrándose el efecto protector ejercido por la *E. coli* OP50 del control al 100 % como nivel de referencia.
- 10

Tabla 2: nivel de protección frente a un estrés oxidativo producido por H₂O₂ 5 mM, conferido por bacterias acidolácticas en comparación con *E. coli* OP50

Cepa - Especie	% de nivel de protección
<i>E. coli</i> OP50	100
Lactobacilos	
L8F <i>L. plantarum</i> (299v)	14,6
L9F <i>L. rhamnosus</i> (LGG)	21,6
L10F <i>L. rhamnosus</i>	9,7
L1G <i>L. acidophilus</i>	102,5
L3G <i>L. casei</i>	7
L4G – <i>L. casei</i>	30
L6G – <i>L. fermentum</i>	23

ES 2 587 136 T3

Cepa - Especie	% de nivel de protección
L7G – <i>L. helveticus</i>	95
L8G – <i>L. plantarum</i>	18
L9G – <i>L. rhamnosus</i> (HN001)	81
L10G – <i>L. rhamnosus</i>	77
L1H – <i>L. amylovorus</i>	70
L4H – <i>L. casei</i>	87
L5H – <i>L. delbrueckii</i>	6
L7H – <i>L. johnsoni</i>	3
L8H – <i>L. plantarum</i>	9
L10H – <i>L. rhamnosus</i>	8
L8B – <i>L. johnsoni</i>	76,8
L9A – <i>L. plantarum</i>	18,7
L9B – <i>L. plantarum</i>	13,3
L10B – <i>L. rhamnosus</i>	5,2
L11B – <i>L. rhamnosus</i>	70,9
L2C – <i>L. delbrueckii</i>	15,7
L4C – <i>L. brevis</i>	12,8
L6C – <i>L. delbrueckii</i>	0,0
L8C – <i>L. johnsoni</i>	59,3
L10C – <i>L. rhamnosus</i>	105
L11C – <i>L. rhamnosus</i>	96,3
L4D – <i>L. casei</i>	7,5
L6B – <i>L. delbrueckii</i>	21,2
L8B – <i>L. johnsoni</i>	82,2
L5C – <i>L. casei</i>	4,1
L7C- <i>Lactobacillus</i> sp.	5,7
L2D – <i>L. bulgaricus</i>	0,0
L5D – <i>L. casei</i>	0,0
L2E – <i>L. bulgaricus</i>	0,0
L3F – <i>L. casei</i>	0,0
L4F – <i>L. casei</i>	85,1
L6F – <i>L. fermentum</i>	0,0
L7F – <i>L. helveticus</i>	11,0
L11A – <i>L. rhamnosus</i>	102

ES 2 587 136 T3

Cepa - Especie	% de nivel de protección
L4B – <i>L. casei</i>	109
L3B – <i>L. bulgaricus</i>	80,1
L6A – <i>L. delbrueckii</i>	26,3
L2A – <i>L. acidophilus</i>	100
L2B – <i>L. brevis</i>	16,0
L5A – <i>L. casei</i>	9,8
L7B – <i>L. fermentum</i>	0,0
L5B – <i>L. casei</i>	89,6
L8A – <i>L. johnsoni</i>	111
L8D – <i>L. johnsoni</i>	87,1
L9D – <i>L. reuteri</i>	91,6
L10D – <i>L. rhamnosus</i>	94,1
L11D – <i>L. rhamnosus</i>	100
L3E – <i>L. casei</i>	104
L4E – <i>L. casei</i>	59,4
L5E – <i>L. delbrueckii</i>	34,2
L6E – <i>L. fermentum</i>	56,7
L8E – <i>L. pentosus</i>	54,2
L9E – <i>L. gasseri</i>	58,1
L10E – <i>L. rhamnosus</i>	88,6
L1F – <i>Lactobacillus</i> sp.	87,5
L2F – <i>L. bulgaricus</i>	52,2
L3A – <i>Lactobacillus</i> sp.	3
L1B – <i>L. acidophilus</i>	1
Bifidobacterias	
B1B – <i>B. animalis</i>	35,8
B1C – <i>B. animalis</i>	26,2
B1D – <i>B. animalis</i>	7,4
B1E – <i>B. animalis</i>	0,0
B1G – <i>B. bifidum</i>	9,0
B2G – <i>B. longum</i>	5,9
Estreptococos	

Cepa - Especie	% de nivel de protección
S2A – <i>S. thermophilus</i>	84,3
S1B – <i>S. thermophilus</i>	61,5
S2B – <i>S. thermophilus</i>	85,0
S1C – <i>S. thermophilus</i>	45,8
S1D – <i>S. thermophilus</i>	93,8
S1E – <i>S. thermophilus</i>	89,7
S1F – <i>S. thermophilus</i>	8,2
S1G – <i>S. thermophilus</i>	11,7
S1H – <i>S. thermophilus</i>	42,3

De la tabla 2 anterior se puede concluir que las cepas de *Bifidobacterium* no confieren resistencia al estrés oxidativo y que sorprendentemente, muy pocas cepas de *Streptococcus* y *Lactobacillus* fueron capaces de conferir resistencia al estrés oxidativo a un nivel mayor que el de la cepa del control. Las cepas que mejoran la viabilidad en ausencia de estrés oxidativo no fueron necesariamente las cepas que proporcionan también la mejor protección frente al estrés oxidativo. Esto indica que el efecto mejorado de las bacterias acidolácticas sobre la viabilidad no parece estar correlacionado con un efecto sobre el estrés oxidativo. Estos resultados muestran también que el efecto antioxidativo es fuertemente específico de la cepa y que, de hecho, solo muy pocas cepas de *Streptococcus* y *Lactobacillus* tienen la capacidad de reducir los efectos del estrés oxidativo in vivo.

5

10 **Ejemplo 2: Efecto de las cepas seleccionadas de bacterias acidolácticas sobre la resistencia frente al estrés oxidativo del crecimiento de *C. elegans* de tipo silvestre sobre placas de agar**

Se hicieron crecer *C. elegans* de tipo silvestre (N2) sobre placas de agar NG durante 5 días con carriles de *E. coli* OP50 o con carriles de cepas seleccionadas de bacterias acidolácticas procedentes del ejemplo 1 e incubadas con H₂O₂ 3 mM durante 5 h. Se evaluó la viabilidad exactamente antes y después de la incubación de 5 h y se determinó el tiempo de supervivencia con el estrés oxidativo determinando el % de gusanos que murieron durante el tiempo de incubación. En la Tabla 3 se muestran los resultados. También, en un ensayo con placas de agar en vez de pocillos, se demostró que cepas específicas de bacterias acidolácticas ejercían un efecto protector frente al estrés oxidativo, pero no todas las cepas ensayadas en el ejemplo 3 resultaron ser eficaces. De las 99 cepas, 3 cepas de *Lactobacillus*, 10C, 11D y 3E fueron eficaces. La cepa 10C es *Lactobacillus rhamnosus* DN 116 063 (CNMC I-4271), la cepa 11D es *Lactobacillus rhamnosus* DN 116 010 (CNMC I3690) y la cepa 3E es *Lactobacillus casei* DN 114 001 (CNMC I-1518).

Ninguna de las cepas de *Streptococcus* ensayada (S2B, S1E y S1D) fue capaz de proteger frente al estrés oxidativo a un nivel superior a *E. coli* OP50.

Tabla 3: nivel de protección frente al estrés oxidativo con H₂O₂ 5 mM conferido por bacterias acidolácticas con respecto a la protección conferida por *E. coli* OP50 sobre placas de agar.

Capa – especie	Protección frente al estrés oxidativo, % en relación con <i>E. coli</i> OP50
L10C – <i>L. rhamnosus</i>	162
L11D – <i>L. rhamnosus</i>	162
L3E – <i>L. casei</i>	106
L11C – <i>L. rhamnosus</i>	57
L4B – <i>L. casei</i>	69
L8A – <i>L. johnsoni</i>	0
S1D – <i>S. termophilus</i>	38
S1E – <i>S. termophilus</i>	49

Ejemplo 3: Producto lácteo fermentado

- 5 Una preparación criodesecada fermentada de *Lactobacillus rhamnosus* CNMC I-4271 se preparó como es conocido en la técnica. Se preparó un yogur líquido como es conocido en la técnica fermentando leche. Al final de la producción de yogur líquido, se añadió *L. rhamnosus* CNMC I-4271 a una concentración final de aproximadamente 5.10⁸ ufc/ml. El producto se almacenó a aproximadamente 7 °C.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Lactobacillus rhamnosus* depositada en la CNMC con el número CNMC I-4271.
2. Una composición que comprende la cepa de la reivindicación 1.
3. La composición de la reivindicación 2 que comprende además la cepa I-3690 de *Lactobacillus rhamnosus*.
- 5 4. La composición de la reivindicación 2 o 3 que es una composición nutritiva.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde la composición es un producto lácteo.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde la composición es un producto fermentado.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde la composición es un suplemento alimenticio.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde la composición comprende 10^5 a 10^{13} ufc por
10 g de peso en seco.
9. La cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de la reivindicación 1 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 2-8 para su uso como medicamento.