

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 912**

51 Int. Cl.:

C12R 1/225 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2013 PCT/EP2013/073272**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072408**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2013 E 13814436 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2917375**

54 Título: **Microorganismos Lactobacillus sanfranciscensis a partir de una masa madre**

30 Prioridad:

08.11.2012 EP 12191813

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

11.05.2017

73 Titular/es:

**LUDWIG STOCKER HOPPFISTEREI GMBH
(100.0%)
Kreittmayrstrasse 5
80335 München, DE**

72 Inventor/es:

MAYER, JÜRGEN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 611 912 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

Microorganismos *Lactobacillus sanfranciscensis* a partir de una masa madre

5 El invento se refiere a nuevas cepas de *Lactobacillus* aisladas a partir de una masa madre. También se abarca una composición que comprende por lo menos una de dichas cepas de *Lactobacillus* junto con opcionalmente otros microorganismos adicionales, tales como bacterias y/o levaduras. El invento se refiere además al uso de dichas cepas o composiciones de *Lactobacillus* para la producción de productos alimenticios humanos y productos de suplementos alimenticios o productos de pienso para animales. Otro aspecto del invento es el uso de las cepas de *Lactobacillus* o de la composición de cepas de *Lactobacillus* en la medicina humana o veterinaria, o en cosméticos.

10 La expresión "bacteria de ácido láctico" o "*Lactobacillus*" designa a un organismo de un conjunto de bacterias gram-positivas, negativas para catalasa, no móviles, microaerófilas o anaerobias, que fermentan a los azúcares, produciendo de esta manera unos ácidos que incluyen ácido láctico como un producto principal así como ácido acético, ácido fórmico y/o ácido propiónico. Las bacterias de ácido láctico más útiles industrialmente son especies de *Lactobacillus*, especies de *Lactococcus*, especies de *Oenococcus*, especies de *Streptococcus*, especies de *Weissella*, especies de *Enterococcus*, especies de *Leuconostoc*, y especies de *Pediococcus*.

15 Las bacterias de ácido láctico son unos microbios que producen ácido láctico, que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y perjudiciales por fermentación de ácido láctico. Ellas están implicadas también en la regulación de la microflora intestinal por la producción de ácido láctico y de específicas sustancias antide bacterias. Por lo demás, ellas están implicadas en procesos de modulación de la respuesta inmune que conciernen a aspectos inflamatorios que están asociados con unas enfermedades relacionadas con la edad tales como enfermedades
20 neuronales, p.ej. la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer o la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y ciertas enfermedades vasculares, p.ej. aterosclerosis o ictus y otras.

25 Las bacterias de ácido láctico se usan extensamente para procesos de fermentación industriales, tanto en la producción de productos alimenticios, de piensos y farmacéuticos, que incluyen la producción de productos lácteos tales como queso, yogur y mantequilla. Ellas son también esenciales para la producción de ciertos productos alimenticios, tal como en la producción de legumbres, cereales, pan y carne fermentada(s)/o(s). Adicionalmente, ellas se usan crecientemente como productos probióticos para seres humanos y animales, en donde ellas se pueden entregar como cultivos puros o se pueden añadir o incorporar en el alimento o pienso o incluso se pueden añadir a dulces.

30 Los cultivos de bacterias de ácido láctico se usan p.ej. en la producción de un pan de masa madre, por un proceso que implica inocular una mezcla de harina y agua, seguida por una fermentación, algunas veces durante varios días, refrescar con harina y agua y finalmente mezclar dentro de la masa de pan, que es amasada y dejada subir lentamente antes de hornear. En comparación con unos tipos de pan producidos con levaduras cultivadas, ella usualmente tiene un sabor suavemente ácido a causa del ácido láctico producido por los *Lactobacilli*. El valor del pH en la masa es disminuido escalonadamente a 4,0 – 4,3 por la acidificación. Los procesos subyacentes son
35 responsables por lo tanto de la formación de unas sustancias olorosas y sustancias aromatizantes que son características del pan.

40 Especialmente en un proceso de etapas múltiples para leudar una masa madre se implican *Lactobacilli* y especies de levaduras, que son responsables del sabor y aroma característicos del pan de masa madre. Otra ventaja llamativa del proceso de leudar una masa madre es la larga vida en almacenamiento, el efecto antimohos y antibacteriano, así como unas propiedades organolépticas del pan de masa madre aumentadas en comparación con las de un pan que no es de masa madre.

45 En particular, se sabe que *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir*, y unas cepas de *Lactobacillus sanfranciscensis* metabolizan a los azúcares hexosas a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para producir ácido láctico, ácido acético y CO₂. Los azúcares pentosas son metabolizados a través de la ruta de fosfogluconato para formar los ácidos láctico y acético.

50 El *Lactobacillus sanfranciscensis* fue denominado por su descubrimiento en iniciadores de masa madre en San Francisco, aunque no es endémico en San Francisco. La masa madre de San Francisco es una masa madre del tipo I, dichas masas madres del tipo I tienen un intervalo de valores del pH de 3,8 - 4,8 y son fermentadas en un intervalo de la temperatura ambiente de 20 - 30°C (Golden, D. y colaboradores, Modern Food Microbiology, 2005, Springer Verlag, página 179). Ellas son caracterizadas adicionalmente por refrescamientos diarios continuos con harina del cultivo iniciador para mantener a los microorganismos en un estado activo. Las denominadas masas madres del tipo II contienen adicionalmente *Saccharomyces cerevisiae* para leudar a la masa. Estas masas madres tienen un pH de menos que 3,5 y son fermentadas dentro de un intervalo de temperaturas de 30-50°C durante varios días sin
55 alimentaciones, lo cual reduce la actividad de la flora (Sadeghi, A., Biotechnology, 2008, 7, 413 y Ercolini, D. y Cocolin, L., Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods [Técnicas moleculares en la ecología

microbiana de alimentos fermentados], 2008, Springer Verlag, página 119). Las masas madres del tipo II se usan con frecuencia para acidificar a la masa y son preparaciones ensiladas semifluidas. Las masas madres del tipo III son unas preparaciones secadas que contienen *Lactobacilli* resistentes a la liofilización. Ellas requieren, al igual que las masas madres del tipo II, la adición de *Saccharomyces cerevisiae* como agente de leudado. Durante la fermentación, el ácido láctico es producido por un proceso biológico mediante el que unos azúcares, tales como glucosa, fructosa y sacarosa, son convertidos en energía celular y en lactato metabólico en condiciones anaerobias (Fermented Fruits y Vegetables - A Global Perspective [Frutos y legumbres fermentados – Una perspectiva global] 1998, United Nations [Naciones Unidas]).

Diversas cepas de *Lactobacillus* pueden diferir entre sí en términos de sus propiedades, tales como la velocidad de fermentación o la producción de metabolitos.

Especialmente para la aplicación industrial, el rendimiento de diversas cepas de *Lactobacillus* para la producción de productos fermentados es una característica significativa que ha de ser optimizada con el fin de obtener mejores resultados de fermentación y/o mejoras en el buqué de las sustancias aromatizantes y olorosas.

El problema subyacente en el presente invento es proporcionar nuevas bacterias de ácido láctico que sean particularmente apropiadas para la producción de alimentos para seres humanos, piensos para animales y para finalidades terapéuticas en medicina humana y veterinaria así como la aplicación en cosméticos.

Durante un análisis de diferentes muestras de masa madre, se han identificado nueve nuevas cepas de *Lactobacillus*. Estas cepas han sido depositadas en el Leibnitz-Institut DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Alemania), de acuerdo con el tratado de Budapest. Las nuevas cepas de *Lactobacillus* tienen los siguientes números de acceso y las siguientes fechas de depósito DSM 23090 (2012-06-21), DSM 23091 (2012-06-21), DSM 23200 (2012-06-21), DSM 23092 (2012-06-21), DSM 23093 (2012-06-21), DSM 23201 (2012-06-21), DSM 26024 (2012-06-04), DSM 23174 (2012-06-21), DSM 23121 (2012-06-21). Las nuevas cepas de bacterias han sido identificadas como *Lactobacillus sanfranciscensis* y *Lactobacillus rossiae*, respectivamente. Las cepas de *Lactobacillus sanfranciscensis* tienen una identidad de 97,5 – 99,2 % en el ARNr de 16S comparada con la de la cepa prototipo de *Lactobacillus sanfranciscensis* (Tabla 3). Las cepas depositadas son muy bien idóneas para la producción de productos fermentados para uso en seres humanos o animales. Las cepas depositadas son particularmente idóneas para usarse en la producción de una masa madre, más particularmente para el uso en procedimientos de etapas múltiples para el leudado de una masa madre. Ventajosamente, las cepas depositadas contribuyen a proporcionar excelentes aromas en combinación con una relación bien equilibrada de metabolitos, que es beneficiosa para la salud de seres humanos y animales (Tabla 4 y Figuras 1-3).

El presente invento proporciona una cepa de *Lactobacillus* seleccionada entre una cualquiera de las cepas DSM 23090, DSM 23091, DSM 23200, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23201, DSM 26024, DSM 23174 y DSM 23121 o una cepa cultivada a partir de ellas. Preferiblemente, se proporciona una cepa de *Lactobacillus* seleccionada entre una cualquiera de las cepas DSM 23090, DSM 23091, DSM 23200, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23201, DSM 26024, DSM 23174 y DSM 23121.

El término "una cepa cultivada a partir de ellas" tal como se usa en el presente contexto, significa unas cepas de descendencia que se han derivado por cultivación de la cepa original.

En algunas formas de realización, el invento se refiere a unas combinaciones de por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 cepas.

Las cepas pueden ser repartidas en porciones en forma de una preparación líquida o sólida, p.ej. como una suspensión líquida de células o como una preparación congelada, secada por atomización o liofilizada.

Las cepas del invento son capaces de producir unos metabolitos seleccionados entre manita, lactato, acetato y sus combinaciones. Los metabolitos se pueden producir en unas concentraciones de aproximadamente 5-70 mmol de manita/kg de medio de cultivo, aproximadamente 10-110 mmol de lactato/kg de medio de cultivo y aproximadamente 5-50 mmol de acetato/kg de medio de cultivo.

En una forma de realización preferida, una combinación de varias cepas de *Lactobacillus* del invento o de cepas cultivadas a partir de ellas está caracterizada por el hecho de que ella produce los metabolitos manita, lactato y acetato, en particular en unas concentraciones de aproximadamente 5-70 mmol de manita/kg de medio de cultivo, aproximadamente 10-110 mmol de lactato/kg de medio de cultivo y aproximadamente 5-50 mmol de acetato/kg de medio de cultivo. En una forma de realización más preferida, los metabolitos producidos por las bacterias pueden presentarse en unas concentraciones de aproximadamente 40-60 mmol de manita/kg de medio de cultivo, aproximadamente 50-100 mmol de lactato/kg de medio de cultivo y aproximadamente 20-42 mmol de acetato/kg de

medio de cultivo. El medio de cultivo puede ser cualquier apropiado medio de cultivo, particularmente una masa, más particularmente una masa madre.

5 Las cepas del invento muestran un perfil de metabolitos significativamente diferente, especialmente en lo que se refiere a las concentraciones de aminoácidos producidos, comparadas con la cepa tipo de *Lactobacillus sanfranciscensis* (DSM 20451). Una baja cantidad de aminoácidos, en particular leucina, isoleucina y valina, es preferida para hornear una masa con el fin de reducir la cantidad de compuestos amargos que se producen durante el proceso de horneado. Esto conduce a una cantidad reducida de sal común (NaCl), que se ha de añadir a la masa con el fin de reducir el sabor amargo.

10 Las cepas del invento son capaces de producir unos aminoácidos seleccionados entre arginina, fenilalanina, valina, leucina, isoleucina, histidina y combinaciones de los mismos. Estos aminoácidos pueden ser producidos en unas concentraciones de por lo menos 2,0 mM de arginina, de manera preferible aproximadamente 2,0-3,0 mM de arginina, por lo menos 2,0 mM de fenilalanina, de manera preferible aproximadamente 2,0-2,6 mM de fenilalanina, por lo menos 5 mM de valina, de manera preferible aproximadamente 5-12 mM de valina, por lo menos 10 mM de leucina, de manera preferible aproximadamente 10-24 mM de leucina, por lo menos 3 mM de isoleucina, de manera preferible aproximadamente 3-7 mM de isoleucina, y por lo menos 1 mM de histidina, de manera preferible aproximadamente 1-1,5 mM de histidina.

15 En una forma de realización preferida, las cepas de *Lactobacillus* del invento están caracterizadas por que ellas producen por lo menos 5 mM de valina, de manera preferible aproximadamente 5-12 mM de valina, por lo menos 10 mM de leucina, de manera preferible aproximadamente 10-24 mM de leucina y por lo menos 3 mM de isoleucina, de manera preferible aproximadamente 3-7 mM de isoleucina,.

20 Las cepas del invento son también capaces de producir acetilcolina (ACH) en unas concentraciones de por lo menos 0,02 mM de ACH, de manera preferible aproximadamente 0,02-0,25 mM de ACH.

25 La presencia de acetilcolina conduce a unas propiedades farmacéuticas mejoradas (compárese la solicitud de patente europea en tramitación EP 13 153 996.7 y ayuda a la digestión de alimentos estimulando la movilidad estomacal e intestinal así como la secreción intestinal.

30 En un forma de realización preferida, una combinación de varias cepas de *Lactobacillus* del invento está caracterizada por que ella produce los aminoácidos arginina, fenilalanina, valina, leucina, isoleucina e histidina, en particular en unas concentraciones de por lo menos aproximadamente 2,0-3,0 mM arginina, aproximadamente 2,0-2,6 mM de fenilalanina, aproximadamente 5-12 mM de valina, aproximadamente 10-24 mM de leucina, aproximadamente 3-7 mM de isoleucina y aproximadamente 0,1-1,5 mM de histidina. Más preferiblemente, la combinación está caracterizada por que ella produce por lo menos 5 mM de valina, de manera preferible aproximadamente 5-12 mM de valina, por lo menos 10 mM de leucina, de manera preferible aproximadamente 10-24 mM de leucina, y por lo menos 3 mM de isoleucina, de manera preferible aproximadamente 3-7 mM de isoleucina. La combinación está caracterizada además por que ella produce acetilcolina, en particular en unas concentraciones de aproximadamente 0,1-0,25 mM de acetilcolina. El medio de cultivo puede ser cualquier medio de cultivo apropiado, particularmente una masa, más particularmente una masa madre.

35 Otra forma de realización del invento es una composición que comprende por lo menos una cepa de lactobacilos seleccionada entre el conjunto de DSM 23090, DSM 23091, DSM 23200, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23201, DSM 26024, DSM 23174 y DSM 23121 o una cepa cultivada a partir de ellas y un vehículo aceptable nutricional o farmacéuticamente. En una forma de realización preferida, la composición puede contener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y/o 9 cepas de los *Lactobacilli* del invento. En la forma de realización más preferida, la composición contiene por lo menos 5 cepas del invento.

40 La composición del invento puede comprender además por lo menos otro microorganismo. El otro microorganismo puede ser una bacteria y/o una levadura. Dicha bacteria o levadura es preferiblemente una cepa compatible nutricional o farmacéuticamente que no tiene propiedades patológicas que se conozcan por ser perjudiciales para seres humanos o animales. En una forma de realización preferida, la otra bacteria y/o levadura es apropiada para la producción de alimentos y/o bebidas para animales y/o seres humanos. En otra forma de realización preferida, la otra bacteria y/o levadura es apropiada para fermentar un substrato y de esta manera proporcionar metabolitos beneficiosos para la salud de seres humanos o animales. La otra bacteria se puede seleccionar entre un conjunto que se compone de cepas de *Lactobacillus sanfranciscensis*, cepas de *Lactobacillus rossiae*, cepas de *Lactobacillus plantarum*, cepas de *Lactobacillus brevis*, cepas de, *Lactobacillus amyolyficus* cepas de, *Lactobacillus amylovarus* cepas de, *Lactobacillus delbrückii*, cepas de *Lactobacillus pontis*, cepas de *Lactobacillus acidophilus*, cepas de *Lactobacillus lactis* y/o cepas de *Gluconobacter oxydans*. La otra cepa de levadura se selecciona entre un conjunto que se compone de cepas de *Candida humilis*, cepas de *Candida milleri*, cepas de *Candida krusei*, cepas de *Saccharomyces exiguus*, cepas de *Saccharomyces barnetti*, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y/o cepas de *Saccharomyces minor*. En una forma de realización más preferida, la levadura es una cepa de *Saccharomyces barnetti*.

La composición puede contener el microorganismo del invento en una proporción de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 99 % en peso, de manera preferible de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 % en peso, de manera incluso más preferible de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 % en peso, basada en el peso total de la composición. Además, la composición puede contener los microorganismos del invento en una cantidad de de aproximadamente 10^3 a 10^{12} cfu/g (unidades formadoras de colonias/gramo), de manera preferible de aproximadamente 10^4 a $0,5 \times 10^{12}$ cfu/g, de manera más preferible de aproximadamente 10^7 a 10^{11} cfu/g, basada en el peso total de la composición.

La composición puede ser una composición líquida o sólida (p.ej. liofilizada, pulverizada o pulverulenta).

La composición puede comprender además un medio de cultivo apropiado para la cultivación de bacterias y/o levaduras, en particular un caldo de cultivo, un concentrado del caldo de cultivo y/o una materia seca del caldo de cultivo. El medio de cultivo puede ser cualquier medio conocido en la especialidad para la cultivación de microorganismos, en particular *Lactobacilli*. El medio de cultivo puede ser un medio de cultivo sólido, tal como un medio de crecimiento basado en agar, una masa, en particular una masa madre o cualesquiera otros medios sólidos apropiados para la cultivación de microorganismos, en particular *Lactobacilli*. El medio de cultivo puede ser también un medio de cultivo líquido en el que las bacterias están suspendidas en un caldo de cultivo o en un medio nutriente líquido.

El medio de cultivo puede comprender unos ingredientes apropiados para la cultivación de cepas de *Lactobacilli*, tales como fuentes de carbono, p.ej. glucosa o maltosa, fuentes de nitrógeno, p.ej. peptona o un extracto de carne, fuentes de fósforo, p.ej. dihidrógenofosfato de potasio, sales metálicas esenciales para el crecimiento de bacterias y opcionalmente unas sustancias promotoras del crecimiento tales como aminoácidos y/o vitaminas. El medio de cultivo tiene preferiblemente un pH situado en la región ácida, en particular por debajo de un pH de 6. En algunas formas de realización, el medio de cultivo comprende el aminoácido D-alanina, puesto que el potencial antiinflamatorio de los *Lactobacilli* puede ser aumentado por medio de una inducción de una alta relación de IL-10/IL12 dependiendo del porcentaje de D-alanina (D-Ala) dentro del ácido teicoico de sus paredes celulares. Un contenido de D-Ala de 1 % en un mutante de *Lactobacillus plantarum* en comparación con 41 % en el tipo salvaje reduce la relación de IL-12/IL-10 inducida de la inducción de interleucina en monocitos expuestos desde 122 hasta 3 (Gragnette y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005), 10321; Foligne y colaboradores, J. Gastroenterol. 13 (2007), 236).

En una forma de realización preferida, el medio de cultivo comprende por lo menos agua, una levadura y una harina y/o malta de un cereal y/o de un pseudocereal tal como trigo, tritical, centeno, cebada, espelta, trigo escaña, avena, alforfón, trigo kamut, trigo candeal o emmer, mijo, arroz, maíz, sorgo, amaranto, quinoa, cáñamo, lupino o combinaciones de los mismos. Opcionalmente, se pueden añadir sal común o una especia o unas mezclas de especias al medio de cultivo antes o después de la fermentación del medio.

Una composición para uso médico o nutricional puede estar en formas de dosificación sólidas o líquidas, tales como por ejemplo tabletas, tabletas revestidas, cápsulas, soluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos, jarabes etcétera, y se prepara de la manera usual mezclando el ingrediente activo con unos excipientes y/o vehículos tales como p.ej. polvos finos minerales naturales (caolín) o polvos finos minerales sintéticos (p.ej. silicatos), añadiendo opcionalmente agentes adyuvantes (p.ej. un glicol) y/o dispersantes (p.ej. una metilcelulosa).

Opcionalmente, la composición puede contener también un prebiótico. Como se usa en el presente contexto, una "composición prebiótica" es por lo menos un ingrediente de alimento no digestible que afecta beneficiosamente al anfitrión estimulando selectivamente el crecimiento, la actividad o ambas propiedades de una especie de un número limitado de especies de microorganismos que ya están residentes en el colon. El prebiótico es preferiblemente un oligosacárido no digestible tal como fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, lactulose, xilo-oligosacáridos, isomalto-oligosacáridos, oligosacáridos de soja, gentio-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, fructanos, lactosacarosa, fructo-oligosacáridos de cadena corta y mezclas de los mismos.

Otra forma preferida de realización del invento es una composición, en donde la composición es un cultivo iniciador y/o un iniciador de la fermentación para la producción de productos fermentados tales como bebidas, queso, yogur o pan.

En otra forma preferida de realización, los microorganismos pueden ser aplicados a un material comestible, preferiblemente un producto alimenticio o de pienso, en particular copos de avena o yogur.

Otro aspecto del presente invento se refiere al uso de cepas de *Lactobacillus* o una cepa cultivada a partir de ellas, o de la composición más arriba descrita para la producción de productos alimenticios para seres humanos y/o productos de suplementos alimenticios o productos de pienso para animales.

Como se usa en el presente contexto, el término "fermentado" se refiere a un producto que se ha producido añadiendo por lo menos un microorganismo, tal como bacterias de ácido láctico o levaduras para realizar una fermentación por los microorganismos. Específicamente, el término se refiere a alimentos y piensos producidos añadiendo un iniciador de la fermentación a unas bases de alimentos o piensos que luego son incubadas. Un iniciador de la fermentación comprende, como un ingrediente activo, por lo menos una cepa seleccionada entre el conjunto de DSM 23090, DSM 23091, DSM 23200, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23201, DSM 26024, DSM 23174 y DSM 23121 o una cepa cultivada a partir de ellas, un caldo de cultivo de la cepa y/o un concentrado del caldo de cultivo, y/o una materia seca del caldo de cultivo. En otra forma de realización, el iniciador de la fermentación comprende una cepa microbiana del invento aplicada a un soporte aceptable en la tecnología alimentaria o las ciencias farmacéuticas, tal como dióxido de silicio o una tierra de diatomeas.

Tal como se usa en el presente contexto, el término "producto alimenticio" significa unos alimentos de origen vegetal o animal que proporcionan los nutrientes requeridos al organismo. El producto alimenticio puede ser un producto basado en leche, un producto vegetal, un producto cárnico, un zumo de frutas, un vino y un producto de panadería u otros alimentos fermentados en depósito abierto no pasterizados, preferiblemente tales como bebidas alcohólicas y no alcohólicas, panes, quinchés, alimentos marinos fermentados y salados, pasta de soja, queso, yogur, mosto y similares. Más preferiblemente, el producto alimenticio es una masa madre o una bebida, en particular un pan de masa madre.

Un producto de suplemento alimenticio, como se usa en el presente contexto, es una preparación destinada a suplementar la dieta y proporciona nutrientes, tales como vitaminas, minerales, fibras, ácidos grasos, aminoácidos y/o enzimas, que pueden estar ausentes o pueden no ser consumidos en cantidades suficientes en la dieta de una persona. Otro suplemento puede contener importantes componentes reguladores para la salud humana, tales como β -glucanos procedentes de levadura o polifenoles múltiples procedentes de unas fuentes tales como té verde, té fermentado, extractos de vino tinto, extractos de semillas de uva, extractos o zumo de arándano o aronia. Otros productos de suplementos alimenticios típicos son unos concentrados fermentados.

El término "producto de pienso", tal como se usa en el presente contexto significa sustancias o productos alimenticios así como aditivos que, dependiendo de su nivel de elaboración, están destinados a la alimentación por vía oral de animales, p.ej. reses bovinas, cerdos o ciervos.

Unos útiles materiales iniciadores de productos de pienso incluyen cualquier material que es sometido convencionalmente a una fermentación por bacterias de ácido láctico tal como material ensilado, p.ej. hierba, materiales cereales, guisantes, hojas de alfalfa o de remolacha azucarera en donde el cultivo bacteriano es inoculado en una planta forrajera que ha de ser ensilada con el fin de obtener la conservación de la misma o en unos productos de desechos de animales ricos en proteínas tales como menudencias de matadero o menudencias de pescados, también con el objetivo de conservar estas menudencias para finalidades de alimentación de animales.

El invento, sin embargo, se refiere también al uso de cepas o composiciones de *Lactobacillus* como antes se han descrito en la medicina humana o veterinaria o en cosméticos.

Un uso médico preferido, en este respecto, es proporcionar unas cepas de bacterias de ácido láctico que son capaces de modular la respuesta inmune y por lo tanto son capaces de regular un síndrome inflamatorio. Aunque no se desea estar vinculado a ninguna teoría, los autores del invento suponen que las cepas de bacterias de ácido láctico aquí divulgadas son capaces de equilibrar la respuesta inmune de TH1 y/o TH2 frente a la intervención de células T reguladoras (TH 17) para obtener un equilibrio neutralizador que minimiza los síntomas nocivos y desfavorables, en donde unas células T colaboradoras son moduladas en sus actividades de manera tal que se suprimen las reacciones alérgicas (TH2) o las reacciones inflamatorias (TH1) enfatizando la liberación de IL-10.

Las propiedades moduladoras de la respuesta inmune de las cepas de bacterias de ácido láctico del presente invento son mostradas también en el Ejemplo 5. Una masa madre que contiene las cepas de bacterias reivindicadas reduce la actividad de las células de defensa, debido a un efecto antioxidante causado por la propiedad de ciertos metabolitos bacterianos para neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS). En ciertas condiciones, la masa madre es también capaz de estimular el sistema inmunitario intensificando la actividad de las células de defensa.

Un pan de masa madre, hecho de una masa madre que contiene las cepas de bacterias de acuerdo con el invento, exhibe propiedades moduladoras de la respuesta inmune. La actividad moduladora de la respuesta inmune en la miga no se pierde durante el proceso de horneado y es debida a las paredes de las células de bacterias, que estimulan al sistema inmunitario. La actividad antioxidante está localizada principalmente en la corteza del pan.

Un uso cosmético preferido a este respecto consiste en proporcionar bacterias de ácido láctico que son capaces de modular el proceso de envejecimiento de la piel y aliviar las consecuencias del envejecimiento. Aunque no se desea estar vinculado a ninguna teoría, los metabolitos producidos por las cepas de bacterias de ácido láctico de acuerdo con el invento activan a las proteínas sirtuinas y de esta manera alivian la degradación de la piel causada por un

estrés oxidativo. Especialmente, la combinación de aminoácidos, polifenoles antioxidantes y el medio de ácido láctico proporcionado por las cepas de bacterias de acuerdo con el invento impide la degradación oxidativa de elementos sustentadores del tejido conjuntivo, p.ej. la despolimerización del ácido hialurónico. En particular, los aminoácidos actúan como depuradores para especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el ácido hipocloroso mediando formación de las correspondientes cloraminas, lo cual da como resultado una desintoxicación de las ROS. Además, dicha combinación conduce a una mejoría de la tensión hidrostática de la piel y a una reducción moduladora de la respuesta inmune de disposiciones alérgicas. Como un resultado de esos efectos se puede conseguir una suavización de la piel.

En otra forma de realización preferida, la composición es incorporada en productos para el cuidado de la piel o cosméticos.

Otro aspecto es el uso de una cepa de *Lactobacillus* seleccionada entre el conjunto de DSM 23090, DSM 23091, DSM 23200, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23201, DSM 26024, DSM 23174 y DSM 23121 para la cultivación de otra cepa de *Lactobacillus* a partir de ellos.

Breve descripción de los dibujos:

Figura 1: Un mapa de calor de las concentraciones relativas de metabolitos en un caldo MRS después de una inoculación durante 24 horas con *Lactobacillus rossiae* DSM 26024 (LR), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23090 (90 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23091 (91 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23092 (92 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23093 (93 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23174 (174 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23200 (200 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23201 (201 LS) y la cepa tipo de *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451 (LST).

Figura 2: Concentraciones de aminoácidos en medios MRS después de una inoculación durante 24 horas con $0,25 \times 10^7$ bacterias de ácido láctico/ml de *Lactobacillus rossiae* DSM 26024 (LR), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23090 (90 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23091 (91 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23092 (92 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23093 (93 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23174 (174 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23200 (200 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23201 (201 LS) y la cepa tipo de *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451 (LST). A: concentración de arginina. B: concentración de fenilalanina. C: concentración de valina. D: concentración de leucina. E: concentración de isoleucina. F: concentración de histidina.

Figura 3: Concentración de acetilcolina en unos medios MRS después de una inoculación durante 24 horas con $0,25 \times 10^7$ bacterias de ácido láctico/ml de *Lactobacillus rossiae* DSM 26024 (LR), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23090 (90 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23091 (91 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23092 (92 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23093 (93 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23174 (174 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23200 (200 LS), *Lactobacillus sanfranciscensis* cepa DSM 23201 (201 LS) y la cepa tipo de *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451 (LST).

Figura 4: Efectos de diversas muestras de pan y de masa sobre la desintoxicación de HOCl.

Figura 5: Efecto de diversas muestras de pan y de masa en un sistema de sangre entera con zimosan.

Figura 6: Efecto de diversas muestras de pan y de masa en un sistema de sangre entera sin zimosan.

El invento será explicado con más detalle por los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1

1. Análisis de muestras de una masa madre

Se analizaron 4 muestras de masa madre, cada una de ellas fue congelada y enfriada, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras

Numeración	Masa	Fermentación
1	Masa iniciadora de grano entero	fermentada
2	Masa acabada de grano entero	joven
3	Masa iniciadora	fermentada
4	Masa acabada	joven

Determinación de los valores de pH y cálculos de bacterias y levaduras.

Los valores del pH de las masas se determinaron con un electrodo de vidrio. Con el fin de determinar los cálculos de células, las masas enfriadas y congeladas fueron diluidas en serie en un agua con peptona tamponada y sembradas en placas sobre un agar MRS modificado. El agar MRS modificado para determinar los cálculos de bacterias contenía 100 mg/l de cicloheximida para la inhibición del crecimiento de las levaduras. Estas placas fueron incubadas aerobiamente durante 48 horas a 30°C. Un agar MRS modificado para determinar los cálculos de levadura contenía 100 mg/l de cloranfenicol. Estas placas fueron cultivadas aerobiamente durante 48 horas a 30°C.

Identificación y caracterización de bacterias.

Con el fin de identificar las cepas de bacterias presentes en la muestra, unos materiales aislados que diferían morfológicamente fueron escogidos a partir de las placas con la etapa de dilución más alta (con unos números de gérmenes comprendidos entre 15 y 150) y fueron extendidos. Unas colonias individuales fueron incubadas en un tampón MRS modificado líquido durante 24 horas a 30°C. El ADN se aisló a partir de un total de 77 colonias con el estuche Dneasy Blood & Tissue Kit (Quiagen, Mississauga, Canada) a partir de masas enfriadas y congeladas.

Unos materiales aislados clonales fueron eliminados por medio de una RepPCR con dos pares de cebadores (Box2AR y GTG5). Para una identificación taxonómica de los materiales aislados, el gen del ARNr de 16S fue secuenciado a partir de 25 materiales aislados. Los genes del ARNr de 16S fueron amplificados con una PCR (con los cebadores 616V, 630R). Los productos de la PCR (aproximadamente 1.500 pares de bases) fueron limpiados con el estuche Qiagen PCR Purification Kit y secuenciados por Macrogen (Rockville, MD, EE.UU.). Las secuencias fueron comparadas con las cepas en la base de datos Project 9 (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Análisis de la concentración de metabolitos

Las concentraciones de maltosa, manita, lactato, glicerol, acetato y etanol fueron determinadas por una HPLC. Para la preparación de las muestras, las masas fueron diluidas a 1:1 con 7 % de ácido perclórico e incubadas durante una noche a 4°C. El material sobrenadante fue analizado directamente. La separación se realizó en una columna con Aminex HP87X (de Biorad), la elución se realizó con 5 mM de H₂SO₄ a razón de 0,4 ml min⁻¹ y a 70°C. La cuantificación estaba basada en la detección de los índices de refracción (RI) y en las sustancias patrones externas.

Resultados**Números de gérmenes y valores del pH.**

Unos valores más bajos del pH y unas cantidades más altas de bacterias y levaduras en las masas enfriadas apuntan a una fermentación posterior durante el suministro. Unos números más bajos de levaduras en las masas congeladas eran debidos a una mortificación parcial de las levaduras durante la congelación. El número de bacterias en las masas enfriadas estaba similarmente entre log 8,3 y 8,9 unidades formadoras de gérmenes (GFU) per g (Tabla 2). Una excepción a esto era el iniciador de grano entero congelado con unos números de gérmenes más altos en la masa congelada que en la enfriada.

Tabla 2. Valores del pH y números de gérmenes de las masas suministradas

Número de la masa	Estado de suministro	pH	Log del número de gérmenes de bacterias (GFU/g)	Log del número de gérmenes de levaduras (GFU/g)
1	enfriado	3,83	8,82±0,12	7,14±0,24
2	enfriado	3,81	8,49±0,17	6,82±0,2
3	enfriado	3,67	8,73±0,19	6,64±0,11
4	enfriado	3,73	8,20±0,13	6,83±0,01
1	congelado	4,04	9,41±0,26	5,48±0,36
2	congelado	4,98	8,07±0,25	4,22±0,13
3	congelado	4,05	7,63±0,09	4,23±0,22
4	congelado	5,1	7,33±0,77	3,7

Identificación de cepas aisladas.

25 materiales aislados de 10 cepas distinguibles por la tipificación del ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) fueron seleccionados para secuenciar. 20 materiales aislados fueron identificados como *Lactobacillus*

sanfranciscensis que fueron asignados a diferentes cepas sobre la base del patrón d8 de RAPD (Tabla 3). Varias cepas fueron aisladas en las muestras enfriadas y congeladas de las mismas masas. Varias cepas podrían ser aisladas a partir de la masa de grano entero así como de la masa madre (cepas n^{os} 3, 4, 5 y 6).

Cinco materiales aislados procedentes de las masas congeladas fueron identificados como *Staphylococcus spp.*

- 5 Las cepas de *Lactobacillus sanfranciscensis* aisladas fueron depositadas en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. El número DSM es indicado en la Tabla 3.

Tabla 3. Identificación taxonómica de materiales aislados de las masas madres

Material aislado N°	Masa (número de materiales aislados)	Cepa	Identidad entre secuencias de la secuencia del ARNr de 16S con la de la cepa tipo [%]	Número de DSM
1	1(1)	<i>L. sanfranciscensis</i>	99,1	23090
2	1(1)	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99,1	-
3	1(1), 2(2), 3(1)	<i>L. sanfranciscensis</i>	98,6	23091
4	1(1), 3(1), 4(2)	<i>L. sanfranciscensis</i>	99,2	23200
5	1(1), 3(2), 4(3)	<i>L. sanfranciscensis</i>	98,8	23092
7	2(1)	<i>L. sanfranciscensis</i>	98,9	23093
9	2(1), 3(1)	<i>L. sanfranciscensis</i>	97,5	23201
15	3(2)	<i>L. sanfranciscensis</i>	98,3	23174
17	4	<i>L. sanfranciscensis</i>	98,3	23121
21	4(3)	<i>Staphylococcus warneri</i>	98,3	-

Análisis cuantitativo de las composiciones de metabolitos

- 10 La caracterización taxonómica de la flora de masa madre estaba sustentada por un análisis de metabolitos. La presencia de manita y acetato en las masas madres confirmó la dominancia de la microflora por la bacteria directora heterofermentativa *Lactobacillus sanfranciscensis* (Tabla 4). El glicerol y el etanol podrían ser atribuidos al metabolismo de levaduras. Una fermentación posterior que tuvo lugar durante el suministro podría ser observada también en el análisis de los metabolitos. El lactato, el glicerol y el etanol estaban presentes en unas concentraciones mucho más altas en las masas enfriadas. De acuerdo con ello, unas concentraciones de maltosa y altas de glucosa solamente podrían ser detectadas en masas congeladas. En las masas congeladas, el iniciador de grano entero fermentado exhibía las cantidades más altas de lactato y acetato, probablemente a causa de la más alta capacidad tamponadora de una harina de grano entero en comparación con una harina de trigo.
- 15

Tabla 4. Concentración de metabolitos en mmol por kg de una masa madre

Masa	suministro	maltosa	glucosa	manita	Lactato	glicerol	acetato	etanol
1	enfriado	0	3,6±0,8	47,7±8,2	97,5±11,6	25,9±4,6	40,3±3,2	246,4±23
2	enfriado	0	1,3±1,0	47,3±5,5	87,7±12,5	24,9±2,1	34,3±1,7	240,3±16
3	enfriado	0	3,3±0,6	57,6±7,9	80,0±6,9	28,0±1,2	34,8±3,9	298,2±26
4	enfriado	0	3,3±0,7	47,9±9,3	63,6±19,3	30,5±4,7	30,9±6,6	243,9±60
1	congelado	0	4,5±1,8	35,5±2,8	68,2±6,2	25,0±3,4	29,3±4,6	175,3±20
2	congelado	0	20,2±3,5	10,5±1,9	27,1 ±2,5	10,9±5,0	14,2±1,7	71,1±15
3	congelado	1,7±0,7	14,9±1,8	33,1 ±7,1	50,8±6,7	17,1 ±3,7	20,6±4,2	107,4±23
4	congelado	2,4±0,3	15,0±1,1	6,2±0,4	12,6±0,6	4,2±0,4	5,1±1,0	30,5±8

3. Resumen

- 20 Las dos masas ensayadas (muestras de masas de grano entero 1 y 2 y muestras de masas 3 y 4) exhibieron diferencias significativas con respecto a la composición de la microflora. Se identificaron varias cepas diferentes de *Lactobacillus sanfranciscensis*.

El metabolismo heterofermentativo de *Lactobacillus sanfranciscensis* explicaba la formación de lactato, manita y acetato. El metabolismo de unas levaduras de masa madre conducía a la formación de glicerol y etanol.

Ejemplo 2

Aislamiento de *Lactobacillus rossiae* cepa DSM26024

- 5 En unas condiciones similares a las descritas en el Ejemplo 1, el *Lactobacillus rossiae* cepa DSM26024 se ha aislado sobre placas de MRS (1,5 % de agar, 0,15 % de L-cisteína, pH 5,4) a partir de una masa madre y se ha identificado por morfología de colonias y secuenciación de ADN 16S.

Ejemplo 3

Cultivación de las cepas de *Lactobacillus*

- 10 Las cepas de *Lactobacillus* del invento han sido cultivadas en un medio que se compone de un DSM medium 225 (medio de masa madre) o mMRS5 (Meroth y colaboradores, Appl. Microbiol. Environ. 69:475). La composición contenía por litro, 10 g de triptona, 5 g de un extracto de carne, 5 g de una levadura, 10 g de maltosa, 5 g de fructosa, 5 g de glucosa, 5 g de acetato de Na x 3 H₂O, 3 g de NH₄Cl, 2,6 g de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 4 g de KH₂PO₄, 0,1 g de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,05 g de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,5 g de cisteína-HCl, 1 ml de Tween 80, 1 ml de una mezcla de 15 vitaminas con cobalamina, ácido fólico, amida de ácido nicotínico, fosfato de piridoxal y tiamina (0,2 g/l de cada). los azúcares fueron autoclavados por separado, la mezcla de vitaminas fue esterilizada por filtración y añadida después de haber autoclavado. El medio se ha esterilizado durante veinte minutos a 120°C. El pH después de la esterilización era de manera preferible de 5,8. La atmósfera gaseosa contenía 4 % de O₂, aproximadamente 5 % de CO₂ y el resto nitrógeno. La temperatura de panificación era de 30°C y la duración de la panificación era de 20 24-72 horas. Un cultivo puro se usó para la inoculación.

Ejemplo 4

1. Cultivo de bacterias

- 25 *Lactobacillus sanfranciscensis* cepas (DSM 23090, DSM 23091, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23174, DSM 23200 y DSM 23201) de acuerdo con el invento, *Lactobacillus rossiae* cepa DSM 26024 de acuerdo con el invento y la cepa tipo de *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451 (DSM GmbH, Braunschweig, Alemania), se hicieron crecer a 30°C en un caldo MRS (de pH 5,4) que contenía 0,15 % de L cisteína, en condiciones anaerobias utilizando paquetes de Anaerogen (de Anaerogen, Basingstoke, Oxoid, Reino Unido) durante 24 horas, después de haber inoculado con 0,25 x 10⁷ bacterias/ml.

2. Análisis de metabolitos

- 30 Unos medios de crecimiento MRS de bacterias de ácido láctico se sometieron a análisis por LC-MS/MS para la cuantificación de metabolitos. El medio MRS fue filtrado con unos filtros Vivaspin 500 de 10 kDa (de Sartorius Stedim biotech, Goettingen, Alemania) antes del análisis.

Las muestras se midieron usando:

Cromatografía de Líquido de Rendimiento Ultra Alto de Dionex UltiMate® 3000 (Dionex, Idstein, Alemania)

- 35
- Bomba - HPG-3400SD
 - Desgasificador - SRD-3400
 - Automuestreado - WPS - 3000TSL
 - Horno de columna - TCC-3000SD

40 Espectrómetro de Masas Quadripolo Trampa de Iones Lineales API 4000 QTRAP, (AB Sciex, Darmstadt, Alemania):

- 45
- Tipo de ionización - ionización por pulverización eléctrica (ESI)
 - Control del instrumento - software analítico (AbSciex, Darmstadt, Alemania)
 - Fase estacionaria: TSKgel Amide-80 3 µm (150 x 2 mm, Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania)
 - Fase estacionaria: 40°C
 - Fase móvil: eluyente A: acetonitrilo / 5 mM/l de acetato de amonio en agua (95+5)

eluyente B:	5 mM/l de acetato de amonio en agua (95+5)		
gradiente:	0 min	90 % de A	10 % de B
	5 min	90 % de A	10 % de B
	10 min	80 % de A	20 % de B
	15 min	50 % de A	50 % de B
	18 min	0 % de A	100 % de B
	21 min	0 % de A	100 % de B
	24 min	90 % de A	10 % de B
	30 min	90 % de A	10 % de B
flujo:	200 µl/min		

Los cromatogramas fueron analizados con Multiquant 2,0 (AB Sciex, Darmstadt, Alemania) y las concentraciones de las muestras se calcularon de acuerdo con los espectros de unos patrones.

3. Análisis estadístico

Los datos son expresados como valores medios \pm desviación típica (SD). Todos los cálculos estadísticos se realizaron usando una plataforma de programación estadística R comparando el grupo en tratamiento frente al correspondiente grupo testigo y se analizaron usando ensayos t no emparejados. Unos datos que comparaban varios tratamientos frente a un grupo testigo correspondiente fueron analizados usando un ANOVA de una vía seguido por un apropiado proceso de comparación múltiple. Si los datos no estaban distribuidos normalmente o comprendían datos discontinuos, se usaron unos ensayos no paramétricos (Ensayo de suma de rangos Mann-Whitney, ANOVA en rangos). Las diferencias fueron consideradas significativas si los valores de p eran $< 0,05$ (*) o $< 0,01$ (**). El análisis de los componentes principales (PCA) es descrito en las referencias Pearson, K.; Sobre líneas y planos de acoplamiento más ajustado a sistemas de puntos en el espacio, *Philosophical Magazine* (1901), 2 (11), 559-572 y Theodoridis, G., Gika, H. G., Wilson, I. D.; Metodología basada en LC-MS para el perfilamiento de metabolitos globales en metabonomía/metabolómica, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2008), 27 (3), 251-260.

4. Resultados

4.1 Análisis por LC-MS/MS de metabolitos en medios de crecimiento de bacterias de ácido láctico de masas madres

Unas *Lactobacillus sanfranciscensis* cepas (DSM 23090, DSM 23091, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23174, DSM 23200 y DSM 23210), *Lactobacillus rossiae* cepa (DSM 26024) de acuerdo con el invento y una cepa comparativa, cepa tipo de *Lactobacillus sanfranciscensis* (DSM 20451), se hicieron crecer durante 24 horas en unos medios MRS. Los medios de crecimiento se cosecharon, filtraron y analizaron usando una LC-MS/MS.

El análisis por LC-MS/MS muestra diferencias significativas en los perfiles de metabolitos de las cepas de *Lactobacillus sanfranciscensis* del presente invento en comparación con la cepa tipo de *Lactobacillus sanfranciscensis* (Fig. 1). Los aminoácidos valina, leucina e isoleucina son producidos por las bacterias del ácido láctico del presente invento en unas concentraciones significativamente más bajas que para la cepa tipo de *Lactobacillus sanfranciscensis* (Figs. 2c-e). Las concentraciones de arginina y de fenilalanina son en general ligeramente más bajas, la concentración de histidina es, dependiendo de la cepa, más alta o más baja que la de la cepa tipo de *Lactobacillus sanfranciscensis* (Figs. 2a y b así como 2f). El perfil del concentraciones globales de aminoácidos de las cepas de *Lactobacillus sanfranciscensis* de acuerdo con el invento es significativamente más bajo en comparación con el de la cepa tipo de *Lactobacillus sanfranciscensis*. Dicho perfil de aminoácidos es deseable y beneficioso para la producción de pan. En particular, una baja concentración de los aminoácidos leucina, isoleucina y valina es necesaria para reducir la cantidad de compuestos amargos formados durante el proceso de horneado de pan. Por lo tanto se ha de añadir menos cantidad de sal común (NaCl) a la masa, lo que reduce, entre otras cosas, el sabor amargo de la masa.

4.2 El análisis por LC-MS/MS reveló la presencia de acetilcolina en medios de crecimiento de las bacterias de ácido láctico de una masa madre

La Fig. 3 muestra una diferencia significativa en las concentraciones de la acetilcolina producida por diversas bacterias de ácido láctico. La más alta productora de ACH durante 24 horas es la cepa *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 23092. Todas las cepas de *Lactobacillus sanfranciscensis* del presente invento producen cantidades mucho más altas de acetilcolina en comparación con la cepa tipo de *Lactobacillus sanfranciscensis*.

La presencia de acetilcolina conduce a unas propiedades farmacéuticas mejoradas (compárese la solicitud también pendiente EP 13 153 996.7).

Ejemplo 5

5 1. Análisis de las propiedades moduladoras de la respuesta inmune de diversos tipos de pan y de masa madre que contenían las cepas de bacterias del invento

Se analizaron un pan de masa madre (#1), unos panes de comparación a (#2) y b (#3) así como una masa madre (T). El pan de masa madre (#1) se produjo a partir de una masa madre (T) que contenía las bacterias de ácido láctico del presente invento.

1.1. Preparación de las muestras

10 Las muestras fueron repartidas en porciones, congeladas profundamente (-20 °C) y luego liofilizadas. Las muestras liofilizadas fueron trituradas finamente usando un molino planetario y combinadas para formar cuatro muestras mezcladas (1, 2, 3 y T).

Extracción de ingredientes activos a partir de las muestras

15 Para simular unas condiciones en un estómago humano, los ingredientes activos se han extraído tomando hasta 1 g de polvo de las diversas muestras (varias repeticiones) en 10 ml de HCl (150 mM; pH 2) seguido por una incubación durante 2,5 horas a 37°C usando un rotador superior colocado en una incubadora.

Luego las muestras fueron elaboradas de la siguiente manera:

a) Suspensión

20 Para producir una suspensión (polvo con HCl) las muestras incubadas se combinaron y el valor del pH se ajustó a 7 con 8,25 M de NaOH. Las muestras se repartieron en porciones y liofilizaron a -70°C.

b) Material sobrenadante

25 Para producir un material sobrenadante, la suspensión se centrifugó durante 10 minutos a una velocidad de 4.000 rpm (revoluciones por minuto). El material sobrenadante resultante se retiró por encima del residuo (sedimento). Luego las muestras se combinaron y el valor del pH se ajustó a 7, tal como se describe dentro de a). Después de esto, las muestras se repartieron en porciones y liofilizaron.

c) Sedimento

30 Para producir un sedimento, el residuo procedente de (b) se lavó dos veces usando 10 ml de una solución al 0,9 % de NaCl, de manera que se retirase completamente el agente de extracción a partir de la muestra. Luego el sedimento se revistió con 10 ml de una solución al 0,9 % de NaCl y se congeló en una condición "húmeda".

1.2 Sistema de sangre entera

35 El análisis de las propiedades moduladoras de la respuesta inmune o desintoxicadoras de HOCl se realizó usando un sistema de ensayo con sangre entera. Se utilizó una sangre entera procedente de tres donantes humanos sanos. Durante la reacción de células inmunes activadas se liberan especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otras HOCl = ácido hipocloroso. Esto conduce a que los patógenos sean aniquilados. Usando un indicador selectivo (ACC; ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) para la producción de HOCl (ácido hipocloroso), este efecto se midió por medio de una cromatografía gaseosa. El sedimento, la suspensión así como el material sobrenadante de las muestras 1, 2, 3 y T se analizaron en un sistema de sangre entera usando la sangre procedente de tres donantes.

1.2.1 Desintoxicación de la disociación de ACC usando ácido hipocloroso (HOCl)

40 Este método permite comprender si las sustancias de ensayo usadas son capaces de reaccionar con HOCl. Si es así, el efecto antioxidante identificado en un sistema de sangre entera podría ser asignado por lo menos parcialmente a una reacción con HOCl. Por lo tanto el HOCl se hizo inocuo para otras reacciones ("se *desintoxicó*").

45 La Fig.4 muestra que la masa madre inhibía la disociación de ACC significativamente mejor que las muestras de pan. La suspensión y el material sobrenadante presentaban la misma reactividad con HOCl. Unos componentes activos solubles en agua fueron encontrados en el material sobrenadante. Todos los tipos de panes mostraron solamente un limitado efecto de desintoxicación en lo concerniente al HOCl. No hubo diferencias manifiestas entre

las diversas fracciones. Parece ser que el proceso de panificación conduce a que se pierda la actividad de los componentes solubles en agua.

1.2.2 Un sistema de sangre entera con zimosan como activador

5 En este caso, las células inmunes en la sangre entera fueron estimuladas usando zimosan (que es un componente de paredes celulares de una levadura) de manera tal que se produjeron unas especies reactivas de oxígeno. Esto condujo, entre otras cosas, a que liberase HOCl, el cual reaccionó con ACC para producir etileno. La cantidad producida de etileno era una medida de la actividad de las células inmunes. Cuanta menos cantidad de etileno estaba contenida en las muestras, menos actividad de células inmunes se observaba.

10 La Fig. 5 muestra que la masa madre presenta los mejores efectos antioxidantes así como el más alto potencial antioxidante y la reacción era inhibida en todos los donantes. El pan # 2 redujo la actividad de células inmunes solamente en el donante A mientras que el pan # 2 no tenía ningún impacto sobre el donante B. Para el donante C, la reacción era estimulada a lo largo de todos los tipos de pan. Los panes # 1 y # 3 no tenían ningún impacto sobre la reacción en la sangre del donante A, y el pan # 3 inducía una estimulación en el donante B al comienzo, pero no tenía influencia sobre la reacción en unas concentraciones más altas. Esto puede ser explicado por el proceso de horneado en donde se perdían las sustancias que actuaban como antioxidantes.

1.2.3 Un sistema de sangre entera sin zimosan como activador

20 En este caso no se añadió zimosan a la muestra de reacción. Si las sustancias de ensayo usadas mostraron no obstante un efecto en el sistema, si se producía etileno, las células inmunes eran estimuladas por la sustancia de ensayo. De esta manera, se podría detectar un efecto modulador de la respuesta inmune o un efecto estimulador de la respuesta inmune.

25 La Fig. 6 muestra que las células inmunes de todos los donantes podrían ser estimuladas por las diversas muestras. El efecto era el más fuerte para el donante C y para la muestra de masa madre en el donante B. Excepto para el donante B, no se podrían observar diferencias manifiestas entre una masa madre y un pan, lo que significa que no se pierden las propiedades estimulantes de la respuesta inmune durante el proceso de panificación. El efecto estimulante del pan de masa madre # 1 tendía a ser mayor que el de los panes comparativos y la diferencia era la más fuerte en el donante A.

Generalmente, se puede afirmar que el efecto de la suspensión era siempre el más fuerte y que el efecto del sedimento y el del material sobrenadante estaban en un nivel comparable. De esta manera hay un efecto sinérgico de componentes solubles en agua en el material sobrenadante en combinación con los ingredientes del sedimento.

30 El sedimento era más estimulante en bajas concentraciones y el potencial de activación disminuía cuando aumentaba la concentración. Esto sugiere que la estimulación depende del receptor y que los componentes de muestras intervienen en el proceso de transducción de señales respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Lactobacillus* seleccionada entre cualquiera de las cepas DSM 23090, DSM 23091, DSM 23200, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23201, DSM 23174, DSM 23121 y DSM 26024.
- 5 2. Una composición que comprende por lo menos una cepa de *Lactobacillus* de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el vehículo es un medio de cultivo apropiado para la cultivación de una cepa de *Lactobacillus*.
4. La composición de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, que comprende por lo menos otro microorganismo.
- 10 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el por lo menos otro microorganismo es una bacteria y/o una levadura, en particular seleccionada entre una cepa de *Lactobacillus sanfranciscensis*, una cepa de *Lactobacillus rossiae*, una cepa de *Lactobacillus plantarum*, una cepa de *Lactobacillus brevis*, una cepa de *Lactobacillus amyolyticus*, una cepa de *Lactobacillus amylovarus*, una cepa de *Lactobacillus delbrückii*, una cepa de *Lactobacillus pontis*, una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, una cepa de *Lactobacillus lactis*, una cepa de *Gluconobacter oxydans*, una cepa de *Candida humilis*, una cepa de *Candida milleri*, una cepa de *Candida krusei*,
15 una cepa de *Saccharomyces exiguus*, una cepa de *Saccharomyces barnetti*, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y/o una cepa de *Saccharomyces minor*.
6. Un uso de por lo menos una cepa de *Lactobacillus* de acuerdo con la reivindicación 1 o de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 hasta 5 para la producción de productos alimenticios para seres humanos y de productos de suplemento alimenticio o productos de pienso para animales.
- 20 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el producto alimenticio, el producto de suplemento de alimentos o el producto de pienso es un producto fermentado.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en el que el producto alimenticio es una masa madre o una bebida, en particular un pan de masa madre.
- 25 9. Una cepa de *Lactobacillus* de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 hasta 5 para su uso en medicina humana o veterinaria, o en productos cosméticos.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9 para una modulación de la respuesta inmunitaria o para el cuidado de la piel.
11. Un uso de una cepa de *Lactobacillus* de acuerdo con la reivindicación 1, para la cultivación de otra cepa de *Lactobacillus* a partir de ella.

Figura 1

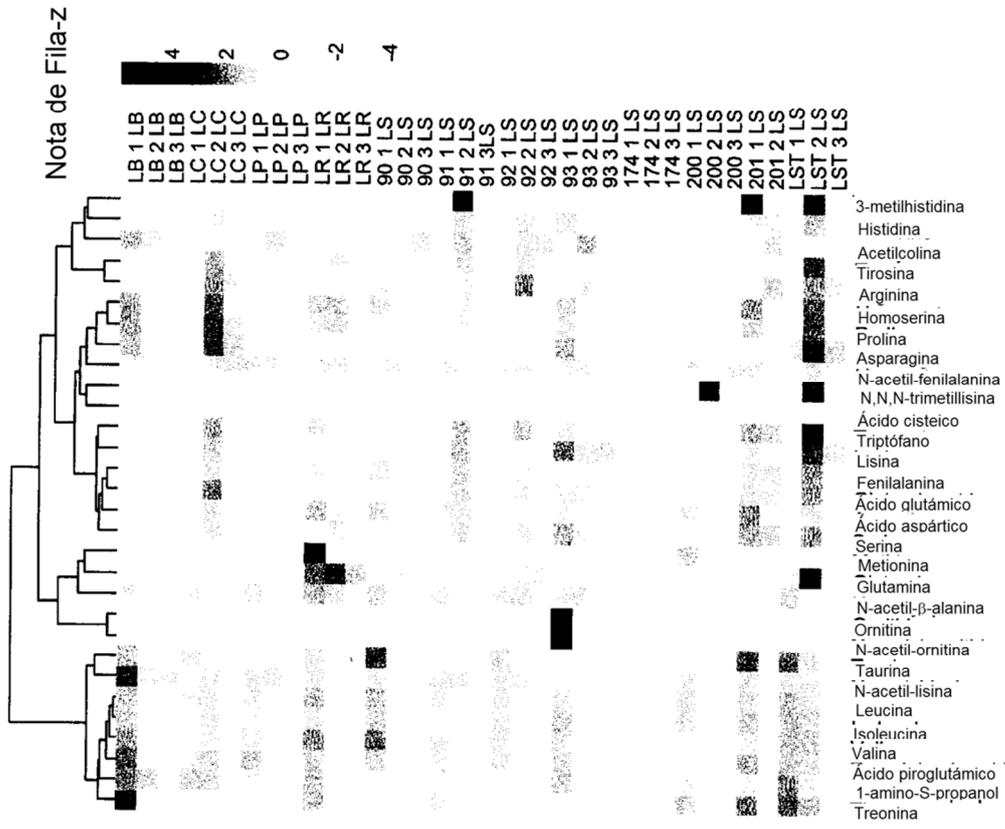


Figura 2

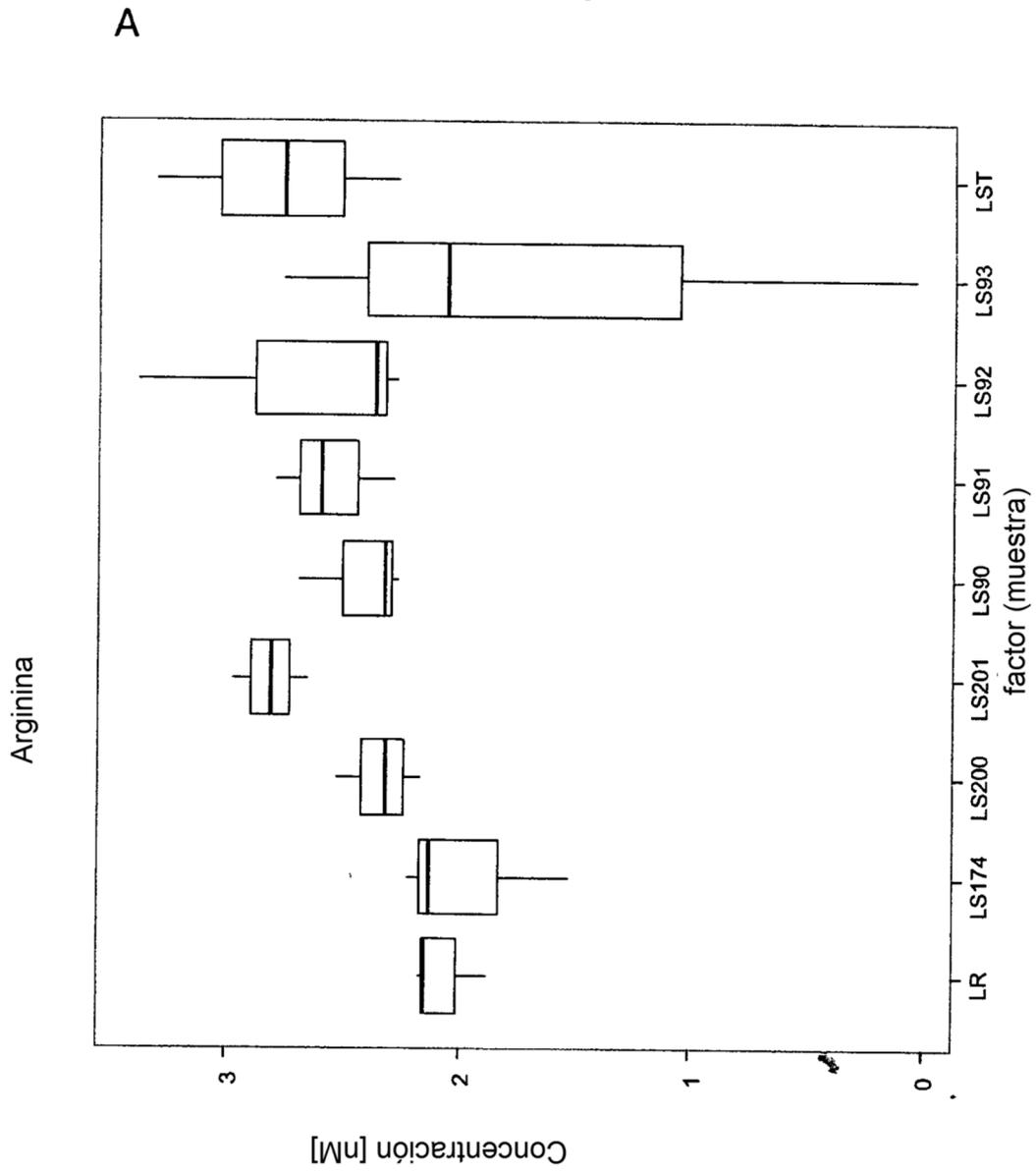


Figura 2 (continúa)

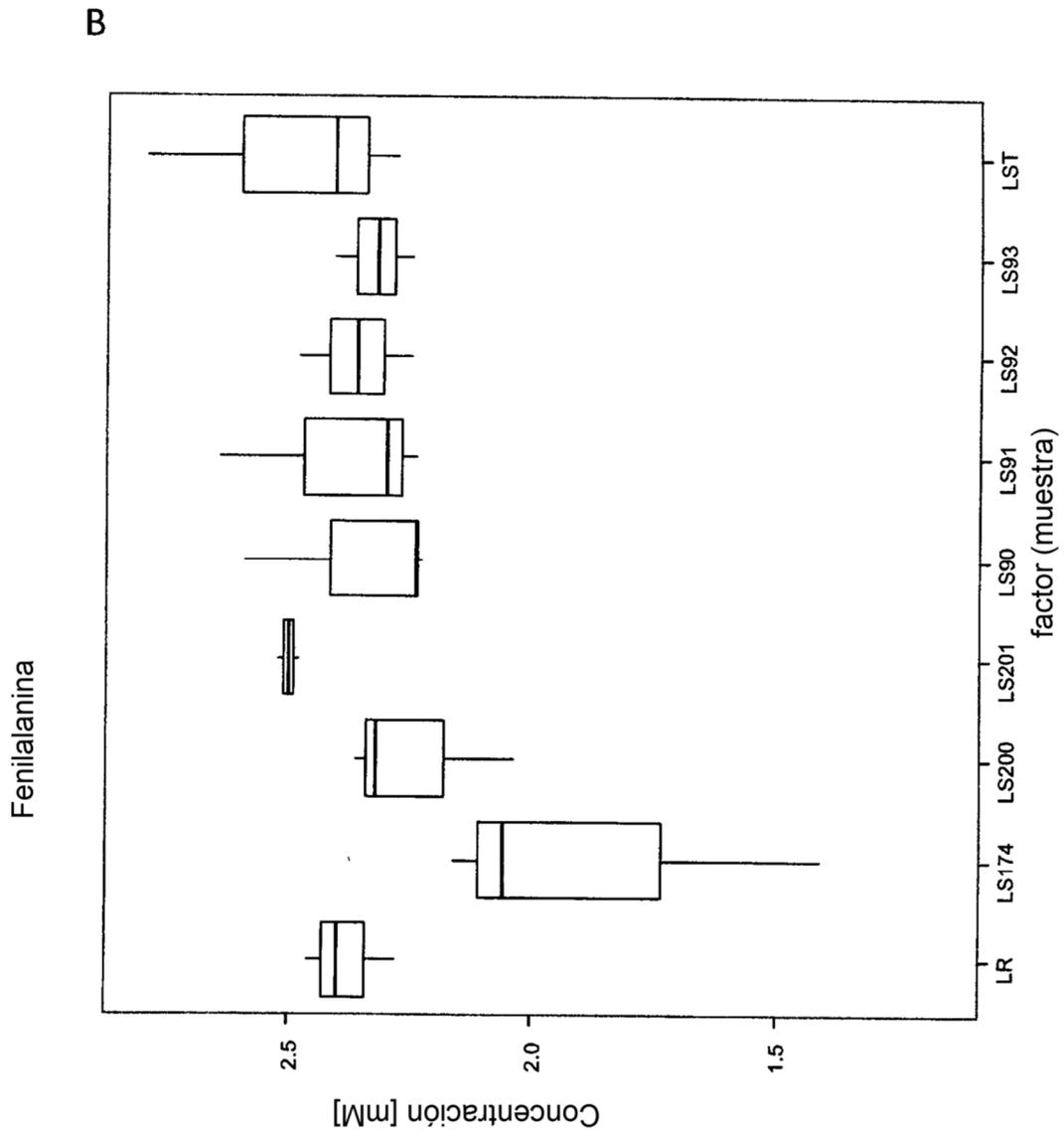


Figura 2 (continúa)

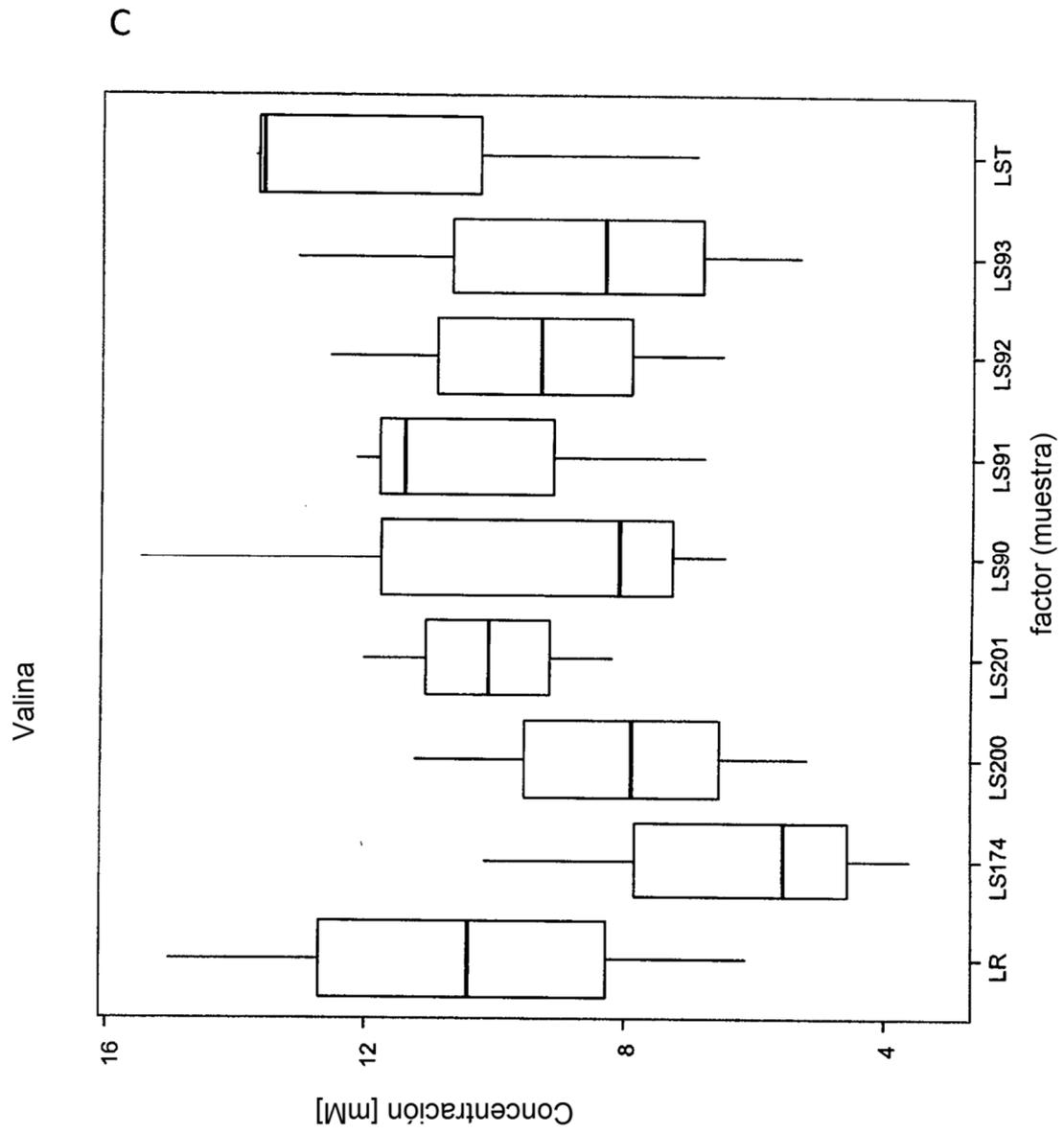


Figura 2 (continúa)

D

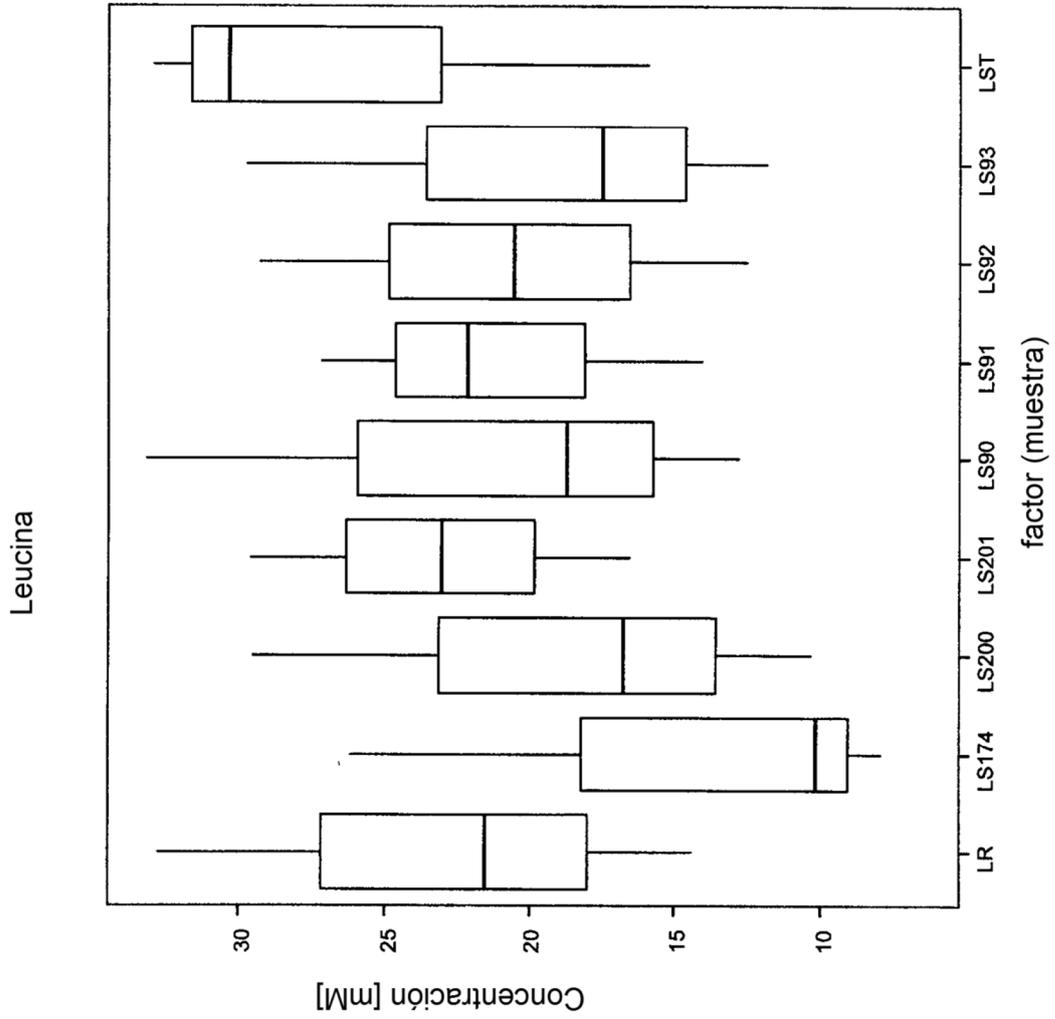


Figura 2 (continúa)

E

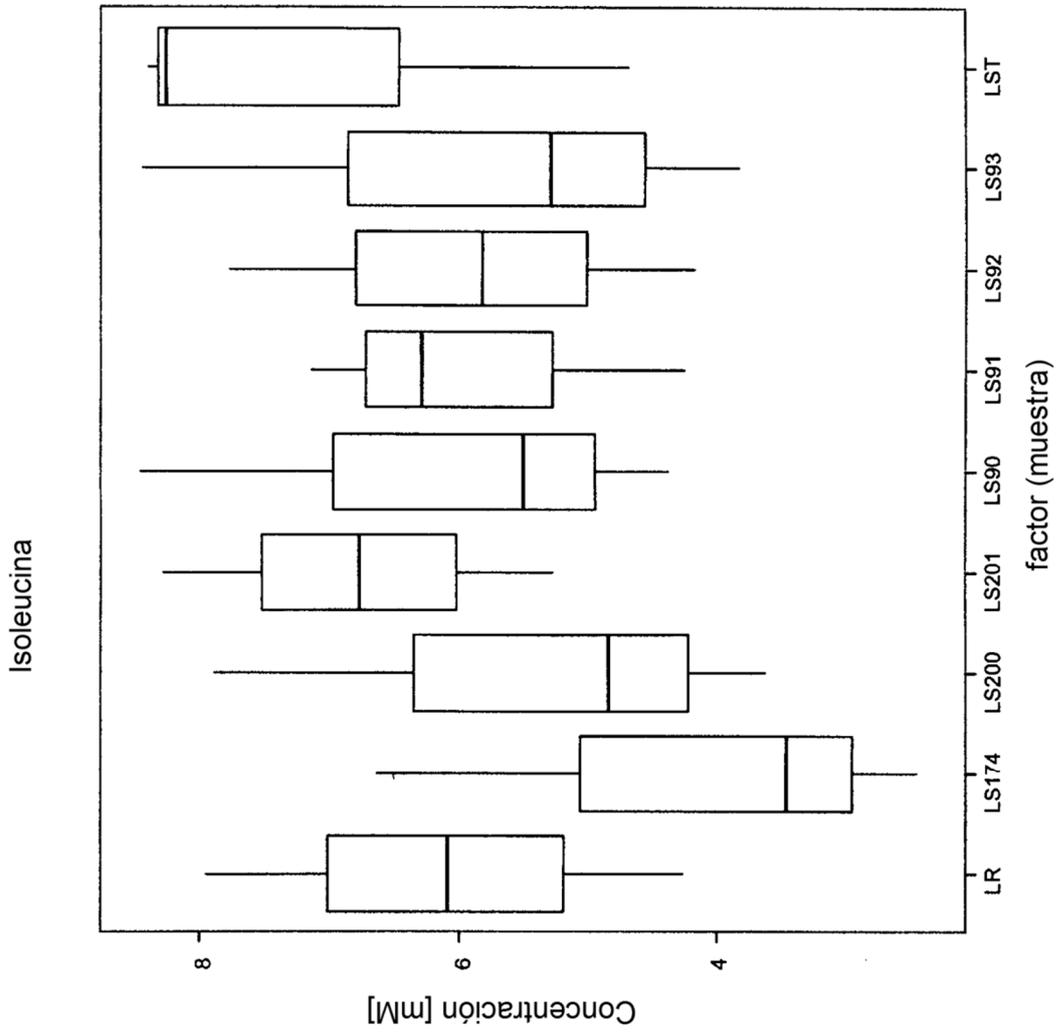


Figura 2 (continúa)

F

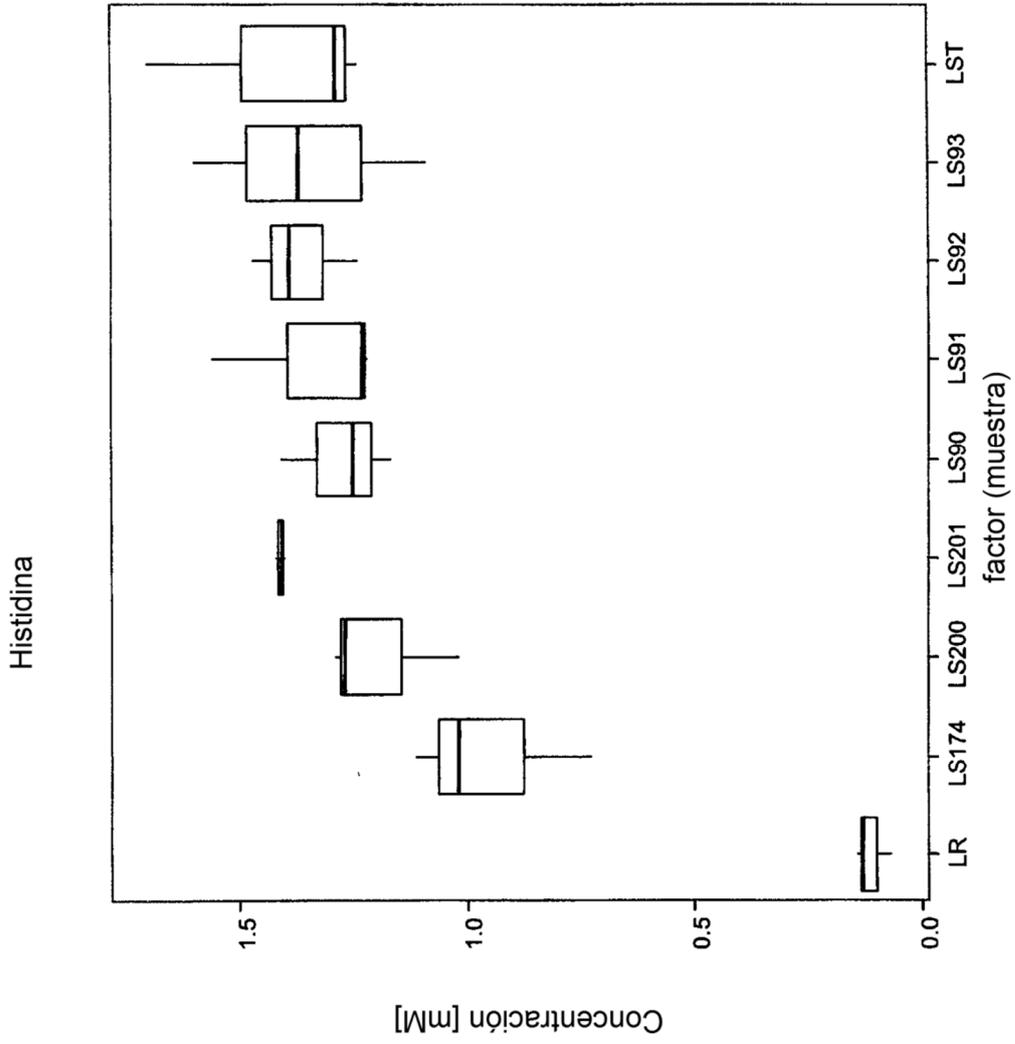


Figura 3

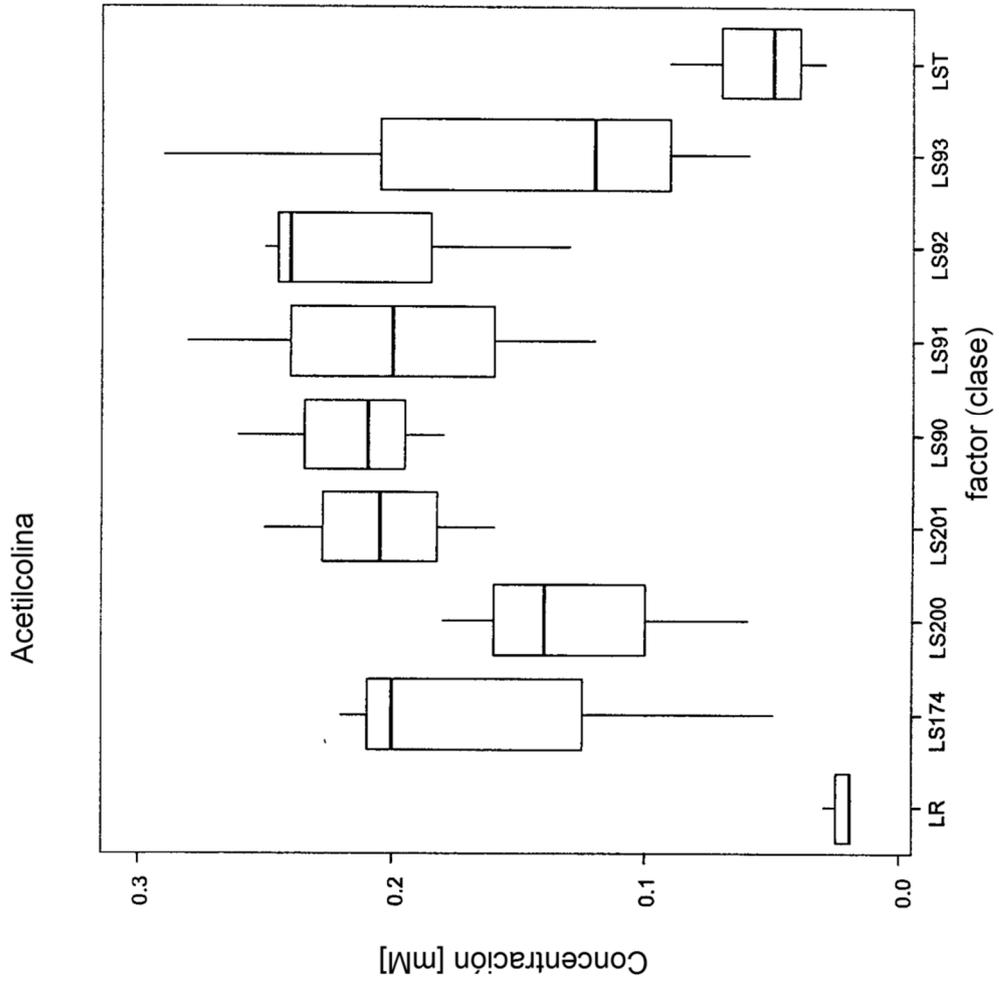


Figura 4

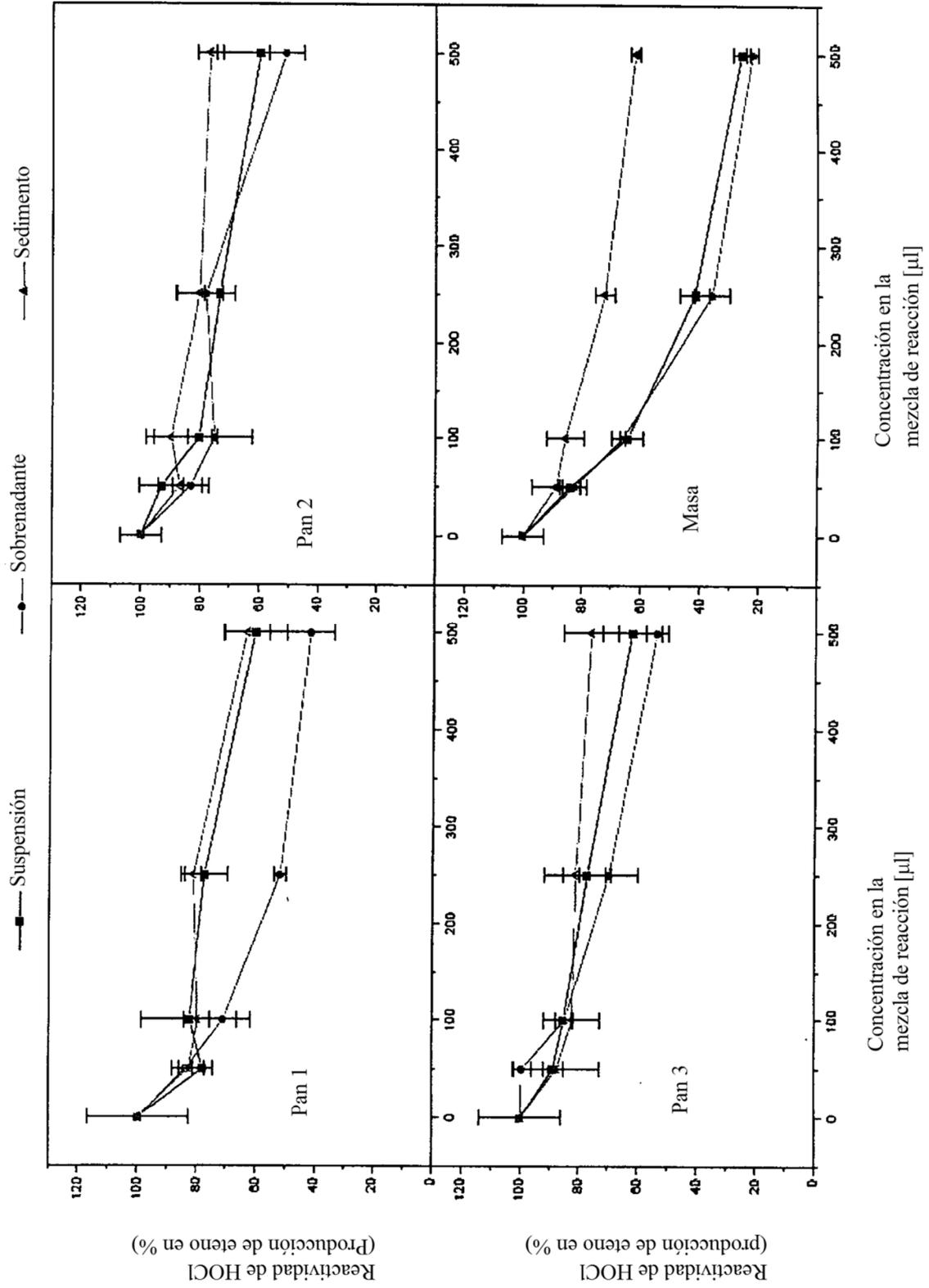


Figura 5

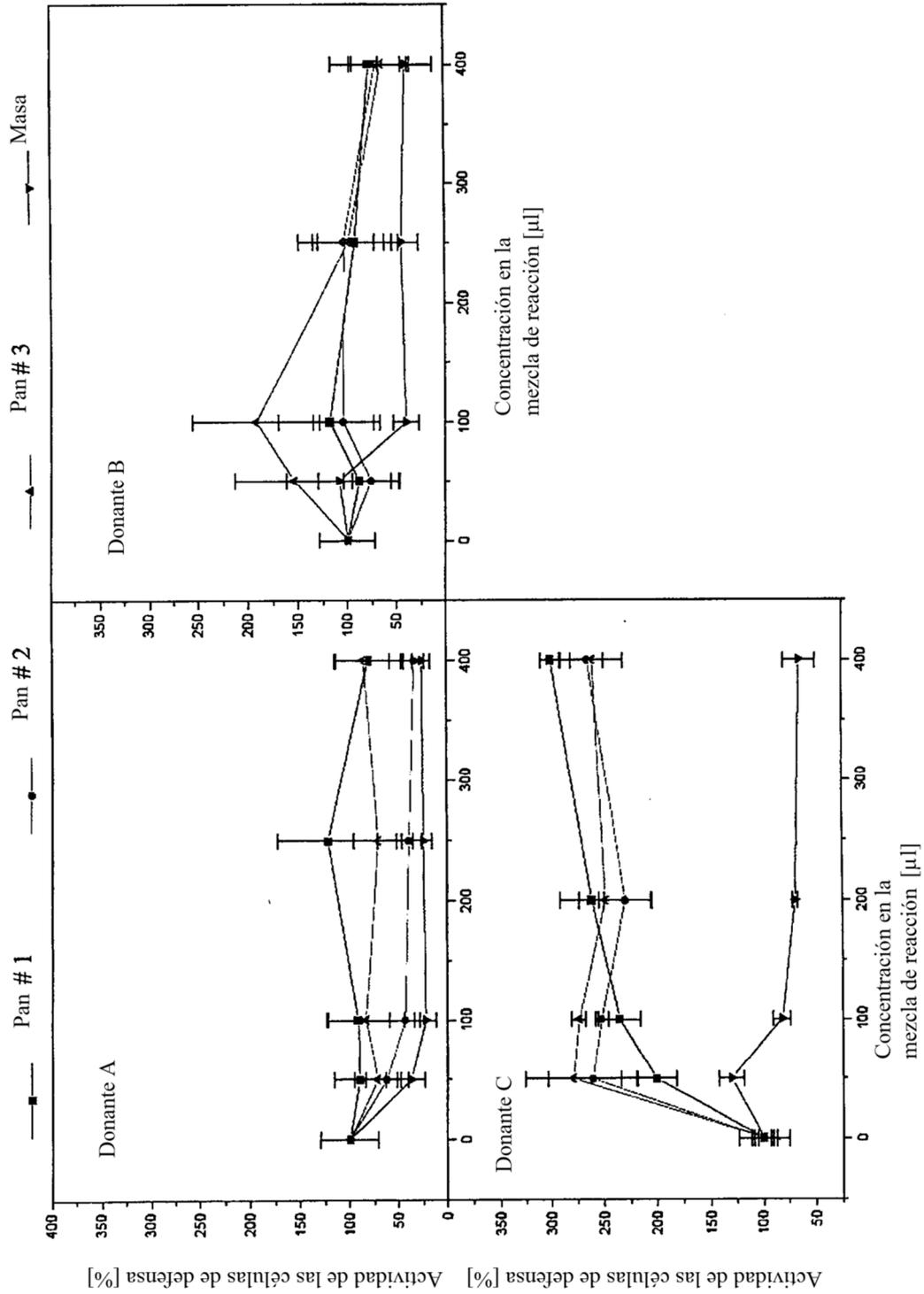


Figura 6

