

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 185**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

A61K 35/64 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2007 PCT/SE2007/050156**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2007 WO07108764**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2007 E 07716125 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 1996696**

54 Título: **Cepas de Lactobacillus termoestables**

30 Prioridad:

17.03.2006 SE 0600606

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

23.06.2017

73 Titular/es:

**PROBI AKTIEBOLAG (100.0%)
Ideon Research Park, Sölvegatan 41
223 70 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**GRAHN HÅKANSSON, EVA y
EKBECK, JENNIE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 619 185 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

Cepas de *Lactobacillus* termoestables

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al género *Lactobacillus* que tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes de alta temperatura. Estos microorganismos termoestables tienen la capacidad de producir agentes antibacterianos viables en diferentes productos alimentarios después del tratamiento con calor. Los microorganismos termoestables del género *Lactobacillus* pueden estar incluidos en productos alimentarios que demandan alta temperatura. Un objeto adicional de la presente invención es la capacidad de un producto alimentario que comprende los microorganismos termoestables del género *Lactobacillus* de promover la inmunotolerancia y la homeostasis. Además, se revelan dos cepas novedosas del género *Lactobacillus*.

Antecedentes de la invención

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos administrados en cantidades adecuadas que confieren un efecto beneficioso en la salud del hospedador”. La mayoría de los probióticos son bacterias, las cuales son organismos unicelulares pequeños de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* o *Bifidobacterium*.

15 Como mínimo, los productos probióticos deberían ser seguros, eficaces y deberían conservar su eficacia y potencia hasta que se consuman. Esto requiere un planteamiento responsable de tanto el productor como el consumidor.

Al nacer las cepas de *Lactobacillus* junto con *Bifidobacteria* y *Lactococcus* son las primeras en colonizar los intestinos estériles. En adultos las cepas de *Lactobacillus* son también la flora normal dominante en el intestino. Se ha sabido que es beneficioso incluir bacterias productoras de ácido láctico tales como *Lactobacillus* en la dieta. Hoy en día muchos de los productos que han incluido bacterias de ácido láctico se administran en productos lácteos o se administran en forma de concentrados de los microorganismos, en forma de preparaciones adecuadamente formuladas que incluyen polvos, comprimidos granulados o cápsulas que contienen un número alto de una o más especies de los microorganismos beneficiosos. Muchas de estas aplicaciones incluyen proteína o azúcar de la leche, frente a las cuales mucha gente es intolerante o alérgica. Es ventajoso administrar los microorganismos beneficiosos como parte de la dieta normal. Por lo tanto, es deseable incorporar los microorganismos beneficiosos en tipos de productos alimentarios que se consumen mundialmente y regularmente en cantidades considerables por una mayoría de consumidores tales como pan u otros productos de cereal. Sin embargo, diversos productos alimentarios se someten a temperaturas que con frecuencia matan los microorganismos en el producto alimentario antes de que llegue al consumidor.

30 Las personas que padecen de enfermedad celiaca (EC) no son capaces de comer una dieta que contenga proteína gluten que con frecuencia está presente en el pan y los productos de cereal. Además, los productos alimentarios libres de gluten comercialmente disponibles tales como la pasta son de una baja calidad sensorial y de cocina y normalmente muchos más cara que la pasta normal. Por tanto, hay una necesidad de proporcionar productos alimentarios nuevos y menos caros tales como pasta, pan y productos de cereal que se puedan consumir por personas que padecen de enfermedad celiaca.

El documento WO 94/00019 se refiere a productos horneados que contienen microorganismos viables deseables. Se concluye que los microorganismos tales como las bacterias de ácido láctico se matan durante la etapa de horneado como resultado de la inactivación por calor. Por consiguiente, un producto horneado fresco no contiene en absoluto ningún microorganismo viable. Por lo tanto, se revela un procedimiento en el que una suspensión de los microorganismos viables se inyecta en el producto horneado. Es una característica esencial que el producto de panadería se enfríe hasta una temperatura por debajo de + 70 °C antes de que se inyecten los microorganismos viables. Hay varios problemas cuando se inyecta una suspensión de microorganismos viables con una alta concentración en un producto horneado. Los microorganismos inyectados no muestran ningún crecimiento significativo en el pan. Es difícil conseguir una distribución igual en el pan horneado y se podría afectar el sabor. Además, se necesita un equipo caro para inyectar la suspensión de los microorganismos viables y no es probable que tal procedimiento pudiera ser usado fuera de un proceso de fabricación a gran escala. El costoso equipo y la alta concentración de la suspensión con microorganismos, dará con frecuencia como resultado un producto costoso.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención resolver estos problemas.

Compendio de la invención

50 Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han descubierto que los microorganismos termoestables del género *Lactobacillus* que son capaces de sobrevivir a temperaturas desde +85 °C durante más de 25 minutos y tienen la capacidad de producir agentes antibacterianos viables en diferentes productos alimentarios después de tal tratamiento con calor.

55 Particularmente, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus* tienen la capacidad de sobrevivir a alta temperatura y en ambiente radiado con microondas y aún producen un agente antibacteriano que también inhibe el

crecimiento de moho en los productos alimentarios. Además, se revelan dos ejemplos específicos de cepas de *Lactobacillus* conocidas, *Lactobacillus plantarum* LB931 y *Lactobacillus rhamnosus*, LB21. Además, se revelan dos cepas novedosas de *Lactobacillus*, referidas como *Lactobacillus plantarum* LB7c y *Lactobacillus plantarum* LB3e.

5 Los inventores también han demostrado que los productos alimentarios que comprenden las cepas de *Lactobacillus* viables termoestables elegidas entre las especies *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus* y particularmente *Lactobacillus plantarum* LB931, *Lactobacillus rhamnosus*, LB21, *Lactobacillus plantarum* LB7c y *Lactobacillus plantarum* LB3e pueden reducir la respuesta inmunológica en el intestino debido al gluten. Un producto alimentario que contiene tales cepas de *Lactobacillus* viables termoestables que promueven la inmunotolerancia en enfermedades autoinmunes tales como la enfermedad celiaca.

10 **Definiciones**

Tal como se describe en el presente documento, el término "LB" se refiere a bacterias del género *Lactobacillus*.

Tal como se describe en el presente documento, el término "termoestable" se refiere a bacterias que sobreviven en temperaturas mayores que +80 °C durante más de 25 minutos.

15 Tal como se describe en el presente documento, el término "bacterias de ácido láctico" se refiere a bacterias que producen ácido láctico, tales como las bacterias que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*.

Tal como se describe en el presente documento, el término "UFC" se refiere a unidades formadoras de colonia.

20 Tal como se describe en el presente documento, el término "productos alimentarios" se refiere a productos alimentarios tales como pan, masa, productos de cereal tales como papilla de avena, gachas, muesli, granola, producto basado en cereal en polvo, pasta, semiproductos tales como sopas, productos precocidos, pan corriente (*plain bread*) y compota.

Tal como se describe en el presente documento, el término "fuente de calor" se refiere a fuentes de calor que calientan el producto alimentario tal como una placa de cocina, horno, ambiente radiado con microondas, horno de microondas o un baño maría.

25 Una masa tal como se usa en el presente documento normalmente contiene un fluido tal como leche o agua, harina y levadura.

Tal como se describe en el presente documento, el término "una rebanada de pan" se refiere a una rebanada típica de pan que pesa aproximadamente 15 a 40 g.

Tal como se describe en el presente documento, el término "productos precocidos" se refiere a productos semielaborados para los cuales se completará el horneado después de suministrarse al consumidor.

30 Tal como se describe en el presente documento, el término "sustancias solubles" se refiere a ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos, tales como ácido láctico, ácido succínico, ácido acético y ácido propiónico.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 revela la capacidad de supervivencia de LB21 liofilizado sobre granos almacenados a temperatura ambiente.

35 La Figura 2 revela la capacidad de supervivencia de LB21 liofilizado sobre granos almacenados a +4 °C.

La Figura 3 revela la capacidad de supervivencia de LB931 y LB21 liofilizados en barritas energéticas almacenadas a +4 °C.

La Figura 4 revela la capacidad de supervivencia de LB931 y LB21 en ambiente radiado con microondas.

La Figura 5 revela la capacidad de supervivencia de LB931, LB7c, LB3e y L1A a +80 °C.

40 La Figura 6 revela la capacidad de supervivencia de LB931 a +90 °C.

La Figura 7 revela la capacidad de *Lactobacillus* de sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal en pan de masa fermentada.

La Figura 8 revela la expresión de ácidos orgánicos en un Cromatograma Auto Escalado de sobrenadantes de las cepas de *Lactobacillus* LB931, LB3e, LB7c y LB21 (análisis completado por Steins Laboratorium).

45 La Figura 9 revela la expresión de ácidos lácticos en un Cromatograma de Auto Escalado de sobrenadantes de las cepas de *Lactobacillus* LB931, LB3e, LB7c y LB21 (análisis completado por Steins Laboratorium).

La Figura 10 revela la producción de citoquinas por los linfocitos T activados policlonados en presencia de las cepas de bacterias probióticas LB931, LB3, LB7 y LB21.

La Figura 11 revela que tanto LB931 vivo como LB21 vivo dan las mismas respuestas de citoquina sobre linfocitos T activados.

- 5 La Figura 12 revela que el *Lactobacillus* no incrementó los niveles de IFN- γ o niveles de IL-4 de los linfocitos T en reposo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a microorganismos termoestables del género *Lactobacillus* que son capaces de sobrevivir a temperaturas desde +80 °C durante más de 25 minutos.

- 10 Se revela que las especies seleccionadas de microorganismos del género *Lactobacillus* elegidas entre las especies *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus* tienen la capacidad de producir agentes antibacterianos viables en diferentes productos alimentarios después del tratamiento con calor.

Además, se revelan dos nuevas cepas de *Lactobacillus*, la cepa de *Lactobacillus* elegida entre las especies *Lactobacillus plantarum* LB7c y *Lactobacillus plantarum* LB3e.

- 15 Una realización está dirigida a microorganismos de la cepa de *Lactobacillus* elegida entre las especies *Lactobacillus plantarum* LB3e y *Lactobacillus plantarum* LB7c que han sido depositadas en la *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, y se les ha asignado el número de acceso 17852 y 17853 respectivamente que son capaces de sobrevivir a temperaturas desde +80 °C durante más de 25 minutos.

- 20 Cualquiera de las dos cepas de *Lactobacillus* anteriormente mencionadas se podrían usar en productos alimentarios tales como pan, masa, productos de cereal, papilla de avena, gachas, muesli, granola, producto basado en cereal en polvo, pasta, semiproductos, sopas, productos precocidos, pan corriente, compota.

- 25 Además, un producto alimenticio tal como pan, masa, productos de cereal, papilla de avena, gachas, muesli, granola, producto basado en cereal en polvo, pasta, semiproducto, sopas, productos precocidos, pan corriente, compota caracterizado porque dicho producto alimenticio también contiene una cepa de *Lactobacillus* viable elegida entre las especies *Lactobacillus plantarum* LB3e y *Lactobacillus plantarum* LB7c que han sido depositadas en la *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, y se les ha asignado el número de acceso 17852 y 17853 respectivamente.

- 30 Un producto de pan o masa en el que dicho producto de pan o masa también contiene una cepa de *Lactobacillus* viable elegida entre las especies *Lactobacillus plantarum* LB931 que ha sido depositada en la *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* y se le ha asignado el número de acceso DSM 11918, *Lactobacillus rhamnosus* LB21 que ha sido depositada en la NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibston Estate y se le ha asignado el número de acceso NCIMB 40564, *Lactobacillus plantarum* LB3e (DSM 17852) y *Lactobacillus plantarum* LB7c (DSM 17853), en donde dichas cepas depositadas son capaces de sobrevivir a temperaturas desde +85 °C durante más de 25 minutos y dichos lactobacilos de al menos una de dichas cepas están incorporados en dicho producto de pan y masa antes de un tratamiento con calor.

- 35 Un producto alimentario preparado por tratamiento con calor de un material de partida del producto alimentario usando una fuente de calor que expone dicho producto alimentario a una temperatura por encima de +85 °C en donde dicho producto alimentario también contiene una cepa de *Lactobacillus* viable preferentemente elegida entre *Lactobacillus plantarum* LB931 (DSM11918), *Lactobacillus rhamnosus* LB21 (NCIMB 40564), *Lactobacillus plantarum* LB7c (DSM 17853) y *Lactobacillus plantarum* LB3e (DSM 17852) respectivamente.

- 40 En realizaciones adicionales el uso de las cepas de *Lactobacillus* viables conocidas elegidas entre las especies de *Lactobacillus plantarum* (DSM 11918), *Lactobacillus rhamnosus* LB21 (NCIMB 4056) para la fabricación de un producto alimentario tal como pan, masa, productos de cereal, papilla de avena, gachas, muesli, granola, producto basado en cereal en polvo, pasta, semiproducto, sopas, productos precocidos, pan corriente, compota en donde el producto alimentario se prepara por tratamiento con calor de un material de partida de producto alimentario usando una fuente de calor que expone dicho producto alimentario a una temperatura por encima de +85 °C, y en donde los lactobacilos de al menos una de dichas cepas están incorporados en dicho producto alimentario antes de un tratamiento con calor.

- 45 Un producto alimentario anteriormente mencionado en el que la cepa de *Lactobacillus* viable está presente en una cantidad por encima de $1,0 \times 10^3$ UFC/g, preferentemente por encima de $1,0 \times 10^4$ UFC/g y lo más preferentemente por encima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g, bacterias vivas por gramo del producto alimentario después del tratamiento con calor.

Un objeto adicional de la presente invención es la capacidad de un producto alimentario anteriormente mencionado en el que la cepa de *Lactobacillus* viable termoestable elegida entre las especies *Lactobacillus plantarum* y

Lactobacillus rhamnosus reduce la respuesta inmunológica en el intestino debido al gluten y, particularmente, *Lactobacillus plantarum* LB931 (DSM11918), *Lactobacillus rhamnosus*, LB21 (NCIMB 40564), *Lactobacillus plantarum* LB7c (DSM 17853) y *Lactobacillus plantarum* LB3e (DSM 17852).

5 Un producto alimentario preparado por tratamiento con calor de un material de partida del producto alimentario usando una fuente de calor que expone dicho producto alimentario a una temperatura por encima de +85 °C caracterizado porque dicho producto alimentario también contiene una cepa de *Lactobacillus* termoestable viable elegida entre las especies *Lactobacillus plantarum* LB931 (DSM11918), *Lactobacillus rhamnosus*, LB21 (NCIMB 40564), *Lactobacillus plantarum* LB7c (DSM 17853) y *Lactobacillus plantarum* LB3e (DSM 17852), en donde dicho producto alimentario es para promover la inmunotolerancia en enfermedades autoinmunes tales como la enfermedad celíaca.

10 La identidad y los números de depósito de las cepas de la presente invención se enumeran en el presente documento.

La LB931 ha sido depositada el 9 de enero de 1998 en la *DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig. Se la ha asignado el número de acceso DSM11918.

15 La LB21 ha sido depositada el 11 de junio de 1993 en la NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, UK. Se la ha asignado el número de acceso NCIMB 40564.

La LB3e ha sido depositada el 6 de enero de 2006 en la *DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig. Se la ha asignado el número de acceso DSM 17852.

20 La LB7c ha sido depositada el 6 de enero de 2006 en la *DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig. Se la ha asignado el número de acceso DSM 17853.

Las cepas de *Lactobacillus* anteriormente mencionadas podrían ser referidas como LB931 (DSM11918), LB21 (NCIMB 40564), LB3e (DSM 17852) y LB7c (DSM 17853).

25 Los productos alimentarios según la presente invención pueden comprender una o más cepas seleccionadas entre las cepas de LB anteriormente definidas. Dentro del ámbito de la presente invención podrían usarse, de manera ventajosa, otras mezclas o cepas de LB termoestables únicas.

30 Las cuatro cepas de *Lactobacillus* termoestables anteriormente mencionadas tienen la capacidad de sobrevivir en un ambiente de alta temperatura, es decir, por encima de +80 °C durante más de 25 minutos y producir aún sustancias (las cuales podrían ser solubles, tales como ácido láctico, ácido succínico, ácido acético y ácido propiónico) que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, tales como enterobacterias, estreptococos del grupo B, estafilococos y levaduras. La Figura 8 revela la expresión de ácidos orgánicos y la Figura 9 revela la expresión de ácidos lácticos en un Cromatograma Auto-Escalado de sobrenadantes de las cepas de *Lactobacillus* LB931, LB3e, LB7c y LB21.

35 Estas cepas son soportables y sobreviven fácilmente a largos periodos de almacenamiento a temperatura ambiente. Por consiguiente, LB931, LB21, LB3e y LB7c tienen una larga vida en almacenamiento. Las cepas se pueden fácilmente incluir en diferentes productos alimentarios.

Se determinó la capacidad del *Lactobacillus* para sobrevivir en diferentes aplicaciones, véase el Ejemplo 2. No se detectó mayor reducción de UFC/g en la preparación en polvo de gachas integrales con LB931 y LB21 liofilizados que se almacenaron a +37 °C durante 31 días.

40 Se determinó la capacidad de *Lactobacillus* para sobrevivir en barritas energéticas cuando se ponen en granos de avena, véase el Ejemplo 3. Es posible poner cepas de *Lactobacillus* sobre los granos y sobrevivirán durante 8 meses a temperatura ambiente y más de 8 meses a +4 °C.

Tanto LB931 como LB21 tienen la capacidad de sobrevivir en barritas energéticas durante 25 días. Las barritas energéticas que contienen LB931 tenían $7,6 \times 10^6$ UFC/ml el día 46.

45 Por tanto, las cepas de LB termoestables pueden soportar el almacenamiento durante un largo periodo de tiempo, y si es posible producir la cepa en tipos diferentes de preparaciones. Se podría usar en productos precocidos.

50 También se evaluó la capacidad de supervivencia en un ambiente radiado por microondas, véase el Ejemplo 4. Se prepararon bebidas de cereales con leche junto con las cepas de *Lactobacillus* en una concentración de inicio de 10^7 UFC/ml. LB931 mostró una mayor UFC/ml que LB21 hasta 80 segundos. La UFC/ml de LB21 se mantuvo igual desde 30 segundos a 90 segundos. El *Lactobacillus* tiene la capacidad de sobrevivir en productos de cereal en ambiente radiado con microondas. Los resultados están representados en la Figura 4.

Se investigó la muerte de las cuatro cepas diferentes de bacterias de ácido láctico con luz UV y se usó un ensayo de interferencia para analizar la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos de las cuatro cepas de ácido láctico y, por tanto, también su capacidad de funcionar como probióticos, los resultados se muestran en el Ejemplo 5.

Se ha investigado la resistencia a alta temperatura de las cepas de *Lactobacillus*, véase el Ejemplo 6. LB931, LB3e y LB7c tienen la capacidad de sobrevivir a +80 °C durante más de 25 minutos y LB931 sobrevive durante más de 5 minutos a +90 °C. La cepa control, L1A, incluso no sobrevive durante 5 minutos a +80 °C. Los resultados están representados en la Figura 5 y 6.

5 Se ha investigado las capacidades de crecimiento del *Lactobacillus* en masas madre fermentadas (*sourdough starter*), véase el Ejemplo 7. Dos tipos diferentes de harinas, trigo y centeno, se usaron para determinar el mejor ambiente para el *Lactobacillus*. El tipo de harina no afectó al resultado del experimento. Las masas madre incrementaron un log y terminaron en la misma UFC/g independiente del tipo de harina. Como control, se usó el *Lactococcus lactis* L1A. El L1A no creció en la masa madre (*starter*). La UFC/g había descendido desde el día 0 al día 3.

10 En el Ejemplo 8 se muestra la supervivencia del *Lactobacillus* en el pan. Se establecieron las temperaturas en diferentes panes, véase la tabla 13. La supervivencia de las bacterias en el pan se determinó a diferentes tiempos, véase las tablas 14 a 16. El *Lactobacillus lactis* L1A se usó como control. Todas las cepas de *Lactobacillus* que se ensayaron sobrevivieron a todas las diferentes temperaturas y tiempos. El control, L1A, no sobrevivió. No hubo crecimiento visual de las bacterias desde el día 0.

15 Dependiendo del producto alimentario y del fin, es deseable que comprenda la cepa de *Lactobacillus* viable en una cantidad suficiente que es preferentemente tan alta como sea posible, para proporcionar los efectos deseados. Los resultados experimentales muestran que se pueden alcanzar cantidades por encima de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/g. En un producto alimentario la cepa de *Lactobacillus* viable debería estar presente en una cantidad por encima de $1,0 \times 10^3$ UFC/g, preferentemente por encima de $1,0 \times 10^4$ UFC/g y lo más preferentemente por encima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g, bacterias vivas por gramo del producto alimentario.

Un ejemplo es una rebanada de pan que pesa al menos 15 gramos en la que la cepa de *Lactobacillus* viable está presente en una cantidad por encima de $1,0 \times 10^3$ UFC/g, preferentemente por encima de $1,0 \times 10^4$ UFC/g y lo más preferentemente por encima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g, de bacterias vivas por gramo de una rebanada de pan.

20 Por ejemplo, una cepa de *Lactobacillus* viable en la que la concentración de inicio es aproximadamente 1×10^6 tiene una UFC por encima de 1×10^3 después de estar expuesta a temperaturas desde +80 °C durante más de 25 minutos o alternativamente durante más de 10 s en un ambiente radiado por microondas.

25 Se ha investigado la capacidad de *Lactobacillus* de promover la inmunotolerancia en enfermedades autoinmunes tales como enfermedad celiaca en estudios *in vivo*. Las cepas de *Lactobacillus* son capaces de reducir la lesión inflamatoria en la mucosa intestinal superior y reducir los niveles de anticuerpos asociados con enfermedades autoinmunes. El Ejemplo 9a, 9b y 9c también indican que *Lactobacillus* tiene la capacidad de influir el sistema inmune de un modo positivo. Los niños a los que se les dio *Lactobacillus* no experimentaron ningún síntoma relacionado con la enfermedad celiaca. Todos los niños a los que se les dio placebo llegaron a estar enfermos después de 1 a 3,5 meses de exposición a gluten. La biopsia mostró tejido normal en el grupo al que se le dio *Lactobacillus* y el tejido mostró la indicación de inflamación en el grupo al que se le dio placebo. Los productos según la invención pueden comprender una o más cepas seleccionadas entre el grupo anteriormente definido. Otras mezclas o cepas de LB únicas se podrían usar ventajosamente dentro del ámbito de la presente invención.

La presente invención se describirá ahora en referencia a los siguientes ejemplos, lo cual no se debería considerar como limitante para el ámbito de la invención.

40 Ejemplos

Ejemplo 1

Aislamiento e identificación de las cepas de *Lactobacillus*.

45 Se aisló LB931 de una mujer sana. La cepa se clasificó como *Lactobacillus plantarum* según el kit de ensayo API 50 CH (API systems, BioMerieux, FR), y se denominó LB931. Además, la cepa se tipificó por análisis de ADN con SDS-page en BCCM/LMG (Belgium) como *Lactobacillus plantarum-pentosusparaplantarum*.

Se aisló LB21 de un bebé sano. La cepa se clasificó como *Lactobacillus rhamnosus* según el kit de ensayo API 50 (API systems, BioMerieux, FR) y se denominó LB21. Además, la cepa se tipificó por análisis de ADN con SDS-PAGE en la NCIMB (UK) como *Lactobacillus rhamnosus*.

50 Se aisló LB3e de un ser humano. La cepa se clasificó como *Lactobacillus plantarum* según el kit API 50 (API systems, BioMerieux, FR), y se denominó LB3e. Además, la cepa se tipificó por secuencia de gen de ADNr 16S en la DSMZ (Alemania) como *Lactobacillus plantarum*.

Se aisló LB7c de un ser humano. La cepa se clasificó como *Lactobacillus plantarum* según el kit API 50 (API systems, BioMerieux, FR), y se denominó LB7c. Además, la cepa se tipificó por secuencia del gen de ADNr 16S en la DSMZ (Alemania) como *Lactobacillus plantarum*.

Ejemplo 2

Las capacidades de supervivencia de *Lactobacillus* en diferentes preparaciones.

- 5 a) Se liofilizaron preparaciones de leche desnatada de LB931 según los procedimientos estándar. Para determinar la durabilidad de las preparaciones se almacenó el polvo obtenido en polvo de gachas integrales a 37 °C durante 31 días para simbolizar el almacenamiento a temperatura ambiente durante 6 meses. Se determinó el número de bacterias después de 31 días y los resultados se revelan en la tabla 1 de a continuación.

TABLA 1

Días	Nº de bacterias UFC/g
Día 0	$7,0 \times 10^{11}$
Día 31	$1,0 \times 10^{11}$

- 10 b) Se disolvió LB931 en una suspensión de partes iguales de leche desnatada y NaCl al 0,9 %. A continuación, las bacterias disueltas se incubaron a diferentes temperaturas. Se hizo un seguimiento continuo de la cantidad de bacterias mediante recuento celular. Los resultados se revelan en la tabla 2 de a continuación.

TABLA 2

Temperatura, °C	Nº de bacterias UFC/ml			
	Día 0	Día 2	Día 5	Día 32
4	$7,8 \times 10^{10}$			$2,2 \times 10^{10}$
20	$1,8 \times 10^{10}$		$2,2 \times 10^{10}$	
27	$1,8 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^9$	

- 15 Los resultados muestran que LB931 es estable en una mezcla de leche desnatada y NaCl durante un periodo de un mes a +4 °C.

c) Se liofilizó una preparación de leche desnatada de LB931 según los procedimientos estándar. El polvo obtenido se almacenó en placas Petri a temperatura ambiente y a +6 °C. Se determinó el número de bacterias después de 7 días y 25 días, respectivamente. Los resultados se revelan en la tabla 3 de a continuación.

TABLA 3

Temperatura, °C	Nº de UFC de bacterias/g		
	Día 0	Día 7	Día 25
6	$4,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
22	$4,2 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$

- 20 También se hizo un seguimiento del número de bacterias en el polvo liofilizado cada cuarta semana hasta 68 semanas. Después de un año, se pudo encontrar, a +6 °C, más de 10^5 UFC/g de LB931.

- 25 d) Se liofilizó una preparación de leche desnatada de LB21 según los procedimientos estándar. Se almacenó el polvo obtenido en una botella de cristal a +4 °C. El número de bacterias se determinó después de 0, 10, 40 y 365 días, respectivamente. Los resultados se revelan en la tabla 4 de a continuación.

Tabla 4

LB21	Día 0	Día 10	Día 40	Día 365
		$2,3 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^{10}$

Ejemplo 3

Las capacidades de supervivencia de *Lactobacillus* en diferentes productos de avena.

- 30 a) Se puso una preparación liofilizada de LB21 sobre copos de avena. Se usaron seis procedimientos diferentes para poner las bacterias sobre los granos. Los LB21 liofilizados se mezclaron con maltodextrina/glucosa para que se pegaran a los granos. Las bacterias se pusieron sobre los granos a diferentes temperaturas y también se secaron a diferente temperatura para encontrar el mejor procedimiento. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

	Temperatura de preparación		Seco
	Aire	Aceite	Aire
LB21 25°C	+25°C	-	+30°C
LB21 30°C	+30°C	-	+38°C
LB21 33°C	+33°C	-	+38°C
LB21 5 %	+29°C	+38°C	+38°C
LB21 25 % caliente	+28°C	+38°C	+38°C
LB21 25 % frío	+28°C	+27°C	+25°C

Los granos con bacterias se almacenaron tanto a +25 °C como a +4 °C durante 244 días. La capacidad de supervivencia se determinó una vez al mes. Los resultados se revelan en las tablas 6 a 7 de a continuación.

5

TABLA 6. Almacenados a +25 °C

Tiempo (días)	N° de bacterias UFC/g					
	LB21 25°C	LB21 30°C	LB21 33°C	LB21 5%	LB21 25 % caliente	LB21 25 % frío
6	4 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸
31	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸
59	3 x 10 ⁸	5 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸	4 x 10 ⁸
90	2 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸
122	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	7 x 10 ⁷	7 x 10 ⁷	1 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸
144	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸	8 x 10 ⁷	8 x 10 ⁷	8 x 10 ⁷
180	2 x 10 ⁷	2 x 10 ⁷	3 x 10 ⁷	2 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶	5 x 10 ⁶
219	1 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶	3 x 10 ⁵	8 x 10 ⁴	9 x 10 ⁵	9 x 10 ⁵
244	4 x 10 ³	1 x 10 ³	1 x 10 ³	2 x 10 ³	5 x 10 ³	6 x 10 ³

TABLA 7. Almacenados a +4 °C

Tiempo (días)	N° de bacterias UFC/g					
	LB21 25°C	LB21 30°C	LB21 33°C	LB21 5%	LB21 25 % caliente	LB21 25 % frío
6	4 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸
31	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸
59	4 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸	4 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸
90	4 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸	4 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸
122	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	6 x 10 ⁷	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸
144	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	8 x 10 ⁷	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸
180	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	6 x 10 ⁷	1 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸
219	2 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸	4 x 10 ⁷	1 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸
244	4 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁷	2 x 10 ⁸	4 x 10 ⁸	3 x 10 ⁷

b) Se hicieron barritas energéticas con LB931 y LB21. Cada barrita pesaba 25 g antes de se dividieran en 4 trozos. Cada trozo se puso en una bolsa estéril a +4 °C. El número de bacterias se determinó después de 0, 10, 21 y 46 días. Los resultados se revelan en la tabla 8 de a continuación.

10

TABLA 8

Tiempo (días)	Nº de bacterias UFC/g	
	LB931	LB21
0	8×10^8	$1,2 \times 10^7$
10	$2,7 \times 10^8$	$1,3 \times 10^7$
21	$3,8 \times 10^8$	$3,0 \times 10^5$
46	$7,6 \times 10^6$	0

Las cepas de LB termoestables pueden sobrevivir en alta temperatura en diferentes preparaciones de cereal.

Ejemplo 4

5 Las capacidades de supervivencia de *Lactobacillus* en ambiente radiado con microondas.

Se incluyó una preparación liofilizada de LB931 en el polvo de bebida de cereal con leche convencional y en copos de avena. La bebida de cereal con leche y los copos de avena se prepararon según las instrucciones del paquete dando como resultado un volumen de aproximadamente 200 ml. Se usó un horno microondas (850 W) con la medida interna de 30x29x20 cm como fuente de calor. Por tanto, el volumen interno del horno microondas era de aproximadamente de 17 dm³. Se determinó el número de bacterias después de 30 segundos, 60 segundos, 70 segundos, 80 segundos y 90 segundos, respectivamente. La temperatura de la bebida de cereal con leche después de 90 segundos en el horno microondas era de aproximadamente +60 °C. El procedimiento se repitió con cultivo durante la noche de LB21. Las cepas de LB termoestables son capaces de sobrevivir en el ambiente radiado con microondas. Los resultados se revelan en la tabla 9 de a continuación.

15

TABLA 9

Tiempo (s)	Nº de bacterias UFC/ml	
	LB931	LB21
0	$3,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$
30	$2,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^5$
60	$2,6 \times 10^7$	$1,0 \times 10^5$
70	$1,3 \times 10^7$	$1,0 \times 10^5$
80	$3,9 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$
90	$1,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^5$

Ejemplo 5

Se investigó la muerte de las cuatro cepas diferentes de bacterias de ácido láctico con luz UV. Las cuatro cepas diferentes de bacterias de ácido láctico de *Lactobacillus plantarum*; LB931 (aislada del tracto urinario de ser humano), LB3e (aislada de saliva de niño), LB7c (aislada de la superficie de diente de niño) y LB21 (aislada de heces de niños recién nacidos) usadas en este ejemplo se extendieron sobre placas de agar MRS y se incubaron durante 20 h a 37 °C, CO₂ al 5 %. A continuación, se inocularon en 3 ml de caldo MRS a 37 °C, CO₂ al 5 % durante la noche lo que genera aproximadamente 10⁹ UFC/ml. Los cultivos de toda la noche de las cepas se añadieron a un volumen final de 1 % en caldo MRS y se incubaron durante 20 h a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las bacterias se centrifugaron (3.800 rpm, 20 min, +4 °C) y, a continuación, se lavaron 2 veces en 10 ml de NaCl al 0,9 %. Las bacterias se disolvieron en NaCl al 0,9 %. La concentración de las bacterias se determinó por recuento de unidad formadora de colonia (UFC). Las bacterias se irradiaron durante diferentes tiempos a una distancia de 5 cm de una lámpara de UVC (Kendro laboratory products, 2x15W, 254 nm). Las bacterias de ácido láctico LB7c y LB21 se irradiaron durante 9 h mientras que las bacterias de ácido láctico LB3e y LB931 se irradiaron durante 10 h. La muerte de las bacterias se controló sobre placas de agar MRS, incubadas durante 48 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Ensayo de interferencia de recubrimiento de agar

Se usó un ensayo de interferencia para ensayar las cuatro cepas de ácido láctico (véase la tabla 10 para su capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos). Se inocularon las cuatro cepas de *Lactobacillus* en la tabla 10 en 3 ml de caldo MRS y, a continuación, se incubaron en 37 °C, CO₂ al 5% durante 20 h. Se mezcló 1 ml de los cultivos con 23 ml de agar MRS junto con 2 ml de NaAc 7,5 M, después las placas se incubaron durante 20 h a 37 °C, CO₂ al 5%. Nueve cepas de ensayo de interferencia (CEI) diferentes (NUS, Umea, Suecia), aisladas de personas con infecciones urinarias, se inocularon en caldo M17 y se incubaron en 37 °C toda la noche. Se encontró una segunda capa de agar de 25 ml de M17 con 750 µl de KH₂PO₄ 6,5 M sobre la primera. Las cepas de ensayo, en fase estacionaria, se replicaron con ayuda de un alfiler de acero de Steers (Steers y col., 1959) sobre la superficie del

35

agar M17 y también sobre una placa control y, a continuación, se incubaron en 37 °C, CO₂ al 5% durante la noche.

Inhibición de patógenos por bacterias de ácido láctico

5 Se hizo un ensayo de interferencia para analizar la capacidad de inhibir patógenos de las bacterias de ácido láctico y, por tanto, también su capacidad de funcionar como probióticos. El resultado de este ensayo se muestra en la tabla 10. LB931 inhibió totalmente todos los 8 patógenos ensayados. LB3, LB7 y LB21 mostraron inhibición total de todos los patógenos excepto para *Candida albicans*, la cual se inhibió parcialmente. Se usó *Lactobacillus acidophilus* como control.

TABLA 10. Inhibición de patógenos por bacterias de ácido láctico

Cepa ensayada	LB931	LB3e	LB7c	LB21	<i>L. acidophilus</i> 2060V
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	+
Especie de <i>Klebsiella</i>	-	±	±		+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	-	-	-	-	?
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	+
Especie de <i>Enterobacteriaceae</i>	-	-	-	-	?
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	?
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+

+, no inhibición; ±, inhibición parcialmente; -, inhibición total; ?, no hecho

10 **Ejemplo 6**

Las capacidades de supervivencia de *Lactobacillus* a diferentes temperaturas.

15 a) Se hicieron diferentes suspensiones de *Lactobacillus* de LB931 liofilizado en NaCl al 0,9 % y cultivo durante la noche de LB931, LB7c, LB3e y L1A. Las suspensiones eran a 10⁹-10¹¹ UFC/ml. Se calentó 5 ml de NaCl al 0,9 % hasta +80 °C en un baño maría. Tan pronto como el NaCl estaba a +80 °C se añadió 100 µl de la suspensión de bacterias. El número de bacterias se determinó después de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos y 25 minutos, respectivamente. Los resultados se revelan en la tabla 11 de a continuación (CNV=crecimiento no visible).

TABLA 11

Tiempo (min)	Nº de bacterias UFC/ml			
	LB931	LB7c	LB3e	L1A
0	2,30 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁸	9,7 x 10 ⁷	2,5 x 10 ⁷
5	4,33 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴	CNV
10	1,77 x 10 ⁶	3,3 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴	CNV
15	2,00 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁴	1,8 x 10 ²	CNV
20	8,20 x 10 ⁴	1,2 x 10 ³	1,9 x 10 ⁵	CNV
25	2,24 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁴	7,8 x 10 ⁴	CNV

b) +80 °C en más de 20, 30, 40, 50, 60 minutos

20 Se calentaron 5 ml de MRS a +85 °C en un baño maría. Se añadió 500 µl de un cultivo durante la noche a la suspensión. La capacidad de supervivencia se determinó después de 20, 30, 40, 50 y 60 minutos respectivamente. Los resultados se muestran en la tabla 12 de a continuación.

TABLA 12

Tiempo (min)	Nº de bacterias UFC/ml			
	LB3e	LB7c	LB931	LB21
20	CV	CV	CV	CV
30	CV	CV	CV	CV
40	CV	CV	CV	CV
50	CV	CV	CV	CV
60	CV	CV	CV	CV

CV = crecimiento visible

5 c) Se preparó una suspensión de LB931 poniendo en suspensión LB931 liofilizado en NaCl al 0,9 % y también un cultivo durante la noche de LB931. El NaCl se calentó hasta +90 °C en un baño maría. Tan pronto como el NaCl estaba a +80 °C, se añadieron 100 µl de la suspensión de bacterias. Se determinó el número de bacterias después de 0,5 minutos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos y 5 minutos, respectivamente. Los resultados se revelan en la tabla 13 de a continuación.

TABLA 13

Tiempo (min)	Nº de bacterias UFC/ml
	LB931
0	1,76 x 10 ⁸
0,5	5,00 x 10 ⁵
1	3,54 x 10 ⁴
2	4,43 x 10 ⁴
3	1,25 x 10 ⁴
4	1,14 x 10 ⁴
5	3,00 x 10 ⁴

10 d) Se incluyó una preparación liofilizada de LB931 y LB21 en el polvo de bebida de cereal con leche convencional y en copos de avena. La bebida de cereal con leche se preparó según las instrucciones del paquete. Se usó como fuente de calor la cocina. El número de bacterias se determinó después de que se calentara la bebida de cereal con leche hasta + 37 °C. Los resultados se revelan en la tabla 14 de a continuación.

TABLA 14

Temperatura (°C)	Nº de bacterias UFC/ml	
	LB931	LB21
10	2,9 x 10 ⁷	3,0 x 10 ⁷
37	2,4 x 10 ⁷	2,8 x 10 ⁷

Ejemplo 7

15 Las capacidades de supervivencia de *Lactobacillus* en masa madre fermentada.
 Se hicieron diferentes masas madre fermentadas de harina de trigo que contenían diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Se mezcló harina y agua a un volumen de 3 dl. Se incluyó 10 ml de suspensión de bacterias descongeladas en la masa madre. Las masas madre fermentadas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 3 días. Todos los días a la masa madre fermentada se le daba más miel, harina y agua. El número de bacterias se
 20 determinó después de 3 días. Después de los 3 días a temperatura ambiente las masas madre se pusieron a 4 °C durante 6 días. El número de bacterias se determinó después de 3 días, y 6 días, respectivamente. Los resultados se revelan en las tablas 15 a 16 de a continuación.

TABLA 15

Tiempo (días)	Nº de bacterias UFC/g		
	LB931 +25 °C	LB7c +25 °C	LB3e +25 °C
0	5 x 10 ⁸	2 x 10 ⁷	6 x 10 ⁷
3	3 x 10 ⁹	9 x 10 ⁸	2 x 10 ⁹

TABLA 16

Tiempo (días)	Nº de bacterias UFC/g		
	LB931 +4 °C	LB7c +4 °C	LB3e +4 °C
0	3 x 10 ⁹	6 x 10 ⁸	3 x 10 ⁹
3	2 x 10 ⁹	3 x 10 ⁸	9 x 10 ⁸
6	2 x 10 ⁹	2 x 10 ⁷	8 x 10 ⁸

b) Se hicieron diferentes masas madre fermentadas de harina de arroz que contenían diferentes cepas de *Lactobacillus*. Se mezcló harina y agua a un volumen de 3 dl. Se incluyó 10 ml de suspensión de bacterias descongeladas en las masas madre. Las masas madre fermentadas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 3 días. Todos los días a las masas madre fermentadas se les dio más miel, harina y agua. El número de bacterias se determinó después de 3 días. A continuación, las masas madre se conservaron a 4 °C durante 6 días. El número de bacterias se determinó después de 3 días y 6 días, respectivamente. Los resultados se revelan en las tablas 17 a 18 de a continuación.

TABLA 17

Tiempo (días)	Nº de bacterias UFC/g almacenadas a +25 °C			
	LB931	LB7c	LB3e	L1A
0	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁷	6 x 10 ⁷	1 x 10 ⁷
3	7 x 10 ⁹	9 x 10 ⁸	2 x 10 ⁹	8 x 10 ⁵

TABLA 18

Tiempo (días)	Nº de bacterias UFC/g almacenadas a +4 °C		
	LB931	LB7c	LB3e
0	3 x 10 ⁹	6 x 10 ⁸	3 x 10 ⁹
3	2 x 10 ⁹	3 x 10 ⁸	9 x 10 ⁸
6	2 x 10 ⁹	2 x 10 ⁷	8 x 10 ⁸

Ejemplo 8

Las capacidades de supervivencia de *Lactobacillus* en pan, detección visual de moho en el pan y aislamiento de *Lactobacillus* en muestras de heces.

a) Se preparó una masa fermentada con 1 dl de masa madre fermentada de trigo que contenía LB931, agua, harina de trigo y arroz a un volumen total de 6 dl. La masa estuvo creciendo 2x45 minutos y se horneó a la temperatura entre 230 a 240 °C durante 25 a 30 minutos. La temperatura en el pan se midió después de que el pan se sacara del horno, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos y 20 minutos, respectivamente. Los resultados se revelan en la tabla 19 de a continuación.

TABLA 19

Tiempo (minutos)	Horneado a 230 °C durante 25 minutos	Horneado a 230 °C durante 35 minutos	Horneado a 240 °C durante 30 minutos
0	97,6 °C	99,4 °C	97,6 °C
5	No hecho	No hecho	86,3 °C
10	No hecho	No hecho	78,0 °C
15	No hecho	No hecho	68,1 °C
20	No hecho	No hecho	62,7 °C

b) El pan de masa fermentada se horneó con *Lactobacillus* termoestable. La supervivencia de las bacterias en el pan se determinó después de 2 días, 3 días, 4 días, 6 días y 7 días, respectivamente. Los resultados se revelan en las tablas 20 a 25 de a continuación.

TABLA 20

Horneado a +230 °C durante 20 minutos (masa madre fermentada)

Tiempo (días)	Nº de bacterias UFC/g	
	LB3e (arroz)	LB7c (trigo)
0	1,1 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁴
5	1,1 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁵

TABLA 21

Horneado a +230°C durante 25 minutos (masa madre fermentada de arroz)

Tiempo (días)	Nº de bacterias UFC/g			
	LB931	LB3e	LB7c	LB21
0	9 x 10 ³	3 x 10 ³	7 x 10 ²	7 x 10 ³
3	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	3 x 10 ⁴
7	9 x 10 ⁴	6 x 10 ⁴	9 x 10 ⁴	No hecho

5

TABLA 22

Horneado a +230 °C durante 35 minutos (masa madre fermentada de arroz)

Tiempo (días)	Nº de bacterias UFC/g		
	LB931	LB3e	LB7c
0	9 x 10 ²	2 x 10 ²	1 x 10 ²
3	8 x 10 ³	3 x 10 ³	7 x 10 ³
7	9 x 10 ³	7 x 10 ³	6 x 10 ³

TABLA 23

Horneado a +240 °C durante 30 minutos de crecimiento

Tiempo (días)	Nº de bacterias UFC/g		
	Masa madre fermentada de trigo		Masa madre fermentada de arroz
	LB931	L1A	LB931
0	4 x 10 ³	Crecimiento No Visible (CNV)	3 x 10 ⁴
2	6 x 10 ⁴	CNV	7 x 10 ⁴
4	2 x 10 ⁵	CNV	9 x 10 ⁵
6	1 x 10 ⁵	CNV	6 x 10 ⁵
8	7 x 10 ⁴	CNV	8 x 10 ⁴

- 10 c) Se hizo pan de harina de trigo que contenía la cepa LB21. Se combinaron agua templada, miel, levadura, sal, trigo y 5 ml de LB21 a UCF 1x10⁹ en un bol mezclador grande a un volumen total de 1 litro. La UFC/ml de la masa era de 1x10⁶. La masa se amasó durante 10 minutos hasta que se separó de las paredes del bol y estaba suave, flexible y lisa. La masa se cubrió y se dejó crecer durante 1 hora. La gran remesa se dividió en partes más pequeñas. La masa se cubrió de nuevo y se dejó crecer durante 45 minutos. El pan se horneó a 220 °C durante 20 minutos y se enfrió en un estante. La supervivencia de las bacterias en el pan se determinó después de 0 días y 3 días respectivamente. Los resultados se revelan en la tabla 24 de a continuación.
- 15

TABLA 24

Tiempo (días)	Nº de bacterias UFC/g
	LB21
0	2 x 10 ³
3	6 x 10 ³

Posiblemente la UFC/g podría ser mayor si el pan se pudiera enfriar más rápido después del horneado.

d) Detección visual de moho en el pan, no crecimiento visual (CNV).

Se mantuvieron rebanadas de pan que contenían *Lactobacillus* en bolsas de plástico herméticas. Las bolsas se revisaron cada día y se determinaron los crecimientos de moho. Los resultados se revelan en la tabla 25 de a continuación.

5

TABLA 25

	Pan	Nº de bacterias UFC/g día 15	Detección de moho
LB931	Pan de masa fermentada	5 x 10 ⁴	CNV día 15
	Pan de masa fermentada	5 x 10 ⁴	CNV día 15
LB21	Pan de masa fermentada	7,6 x 10 ⁴	CNV día 15
	Pan con 5 ml de solución bacteriana	1,2 x 10 ³	CNV día 15
LB3e	Pan de masa fermentada	4 x 10 ⁴	CNV día 15
LB7c	Pan de masa fermentada	6 x 10 ⁴	CNV día 15

e) 3 individuos sanos consumieron pan que contenía LB931, LB21, LB3e y LB7c durante diez días consecutivos, las cepas se pudieron recuperar a partir de muestras de heces en los 3 voluntarios ensayados. Los resultados se revelan en la tabla 26 de a continuación.

10

TABLA 26

	Día 0	Día 5	Día 10
Estudio persona 1	0	7 x 10 ³	6 x 10 ³
Estudio persona 2	0	2 x 10 ²	4 x 10 ³
Estudio persona 3	0	5 x 10 ⁷	6 x 10 ³

Ejemplo 9

15

a) Se hizo el estudio del caso de una niña de nueve años de edad que fue diagnosticada con enfermedad celiaca (EC). Se le dio *Lactobacillus* (LB21) diariamente en una concentración alta (10¹⁰ UFC/día) durante 3 meses antes de ser expuesta a gluten. Se midieron sus niveles de anticuerpo del endomisio, las transglutaminas y la IgA total antes y cada mes durante el primer año y una vez al año durante 6 años. Puesto que había estado a una dieta restringida durante muchos años antes del estudio no se detectaron anticuerpos antes de comenzar el estudio. Al principio se le dio una concentración baja de gluten (0,1 g de gluten/día/kg peso corporal) pero después de 4 meses estuvo comiendo una dieta normal. Los niveles de endomisio y transglutaminas fueron normales durante este tiempo y no experimentó ningún síntoma celiaco. Se realizó una biopsia del intestino delgado cuando la chica tenía 13 años. Los resultados no mostraron tejido mucoso inflamado y sus niveles de anticuerpo fueron normales.

20

25

b) Se realizó un estudio piloto con 4 niños que padecían de EC. Los niños se dividieron en dos grupos. Al grupo 1 se le dio *Lactobacillus* (LB21) con 10¹⁰ UFC/día y al grupo 2 se le dio placebo. Ambos grupos se expusieron a gluten siguiendo una escala estandarizada. A los niños se les dio 0,1 g de gluten/día/kg peso corporal durante 4 semanas y 0,2 g de gluten/día/kg peso corporal después. Los niveles de anticuerpo del endomisio, transglutaminas e IgA total se midieron durante el estudio. Si los niveles de anticuerpo de los niños incrementaban o si los síntomas de EC aumentaban, se realizaba una biopsia del intestino delgado. Los dos niños en el grupo placebo llegaron a enfermar después de 1 a 3,5 meses de estar expuestos a dieta con gluten. La biopsia mostró daño a la membrana mucosa del intestino delgado. Los niños también habían incrementado los niveles de endomisio, transglutaminas e IgA total. Los dos niños en el grupo activo no experimentaron ningún síntoma y los niveles de endomisio, transglutaminas e IgA total eran normales. Después de 7 meses de tratamiento activo se realizó una biopsia del intestino delgado. La biopsia mostró tejido intestinal normal.

30

35

c) Se realizó un estudio con 10 niños que padecían de EC. A los niños se les dio *Lactobacillus* (LB21) de 10¹⁰ UFC/día. Los niños se expusieron a gluten siguiendo una escala estandarizada. A los niños se les dio 0,025 g de gluten/día/kg peso corporal durante 2 meses y 0,05 g gluten/día/kg peso corporal después. Se midieron los niveles de anticuerpo de endomisio, transglutaminas y IgA total durante el estudio. Si los síntomas de EC aumentaban, se realizaba una biopsia del intestino delgado para confirmar las lesiones de EC típicas. Los niños no experimentaron ningún síntoma durante el estudio y después de 12 meses de exposición a gluten bajo intervención de LB21 los niños aún estaban sanos y libres de síntomas, y tenían crecimiento normal.

40

Ejemplo 10**Procedimiento**

Se hizo un ensayo *in vitro* para evaluar las características inmunomoduladoras potenciales de las cuatro cepas diferentes de *Lactobacillus*. Se recogió la sangre venosa de mujeres sanas y las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se aislaron usando el gradiente Ficoll-Paque. Los linfocitos T se activaron de forma policlonal usando mAb anti-CD3 y mAb anti-CD 28. A continuación las CMSP y las bacterias probióticas se mezclaron en la relación 1:1. Se usaron sobrenadantes vivos, muertos y aislados para investigar si es la propia bacteria o alguna sustancia que produce la que influye el sistema inmune. El montaje de muestra se hizo dos veces; un montaje se incubó durante 6 h y el otro montaje se incubó durante 18 h. Después de 6 h de incubación, se aisló el ARN total y se usó para la cuantificación de citoquinas a niveles de ARNm usando la reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa cuantitativa a tiempo real. Los sobrenadantes de las muestras incubadas durante 18 h se aislaron y se usaron para la cuantificación de los niveles de proteína con matriz citométrica de microesferas (*bead array citometric*).

Resultados

La Figura 10 muestra la producción de citoquinas por linfocitos T activados policlonales en presencia de las cepas de bacterias probióticas LB931, LB3, LB7 y LB21. Los datos eran de tres donantes de sangre y las líneas verticales muestran los linfocitos T activados sin ninguna estimulación con probióticos y actúan como control negativo. Todas las cuatro cepas muestran las mismas respuestas para las cuatro citoquinas medidas a nivel de ARNm. El mismo patrón también se ve a niveles de proteína, donde se midieron dos de las cuatro cepas. Tal como se ve en la Figura 11 tanto LB931 vivo como LB21 vivo dan las mismas respuestas de citoquina sobre los linfocitos T activados. LB931 muerto y LB21 muerto también se siguen uno a otro cuando se viene a incrementar los niveles de citoquina. A partir de la Figura 10 y 3 se puede ver que es el *Lactobacillus* vivo y el *Lactobacillus* muerto el que incrementa o desciende las respuestas de citoquinas de linfocitos T activados. Los sobrenadantes aislados de las cinco diferentes cepas de *Lactobacillus* no influenciaron en absoluto las respuestas de citoquina de los linfocitos T humanos.

El *Lactobacillus* no incrementó los niveles de IFN- γ o los niveles de IL-4 de linfocitos T en reposo notablemente como se ve en la Figura 12. Eso muestra que ninguna de las cuatro cepas de bacterias de ácido láctico tiene la capacidad de influir los linfocitos T en reposo.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro cepas de *Lactobacillus* usando el ensayo de Comparación Múltiple de Tukey. Este ensayo, junto con los resultados de las respuestas de citoquina, indica que las cepas LB931, LB3, LB7, LB21 son similares.

REIVINDICACIONES

1. Microorganismos de la cepa de *Lactobacillus* elegida entre las especies *Lactobacillus plantarum* LB3e y *Lactobacillus plantarum* LB7c, que se han depositado en la *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* y a las que se les ha asignado los números de acceso 17852 y 17853 respectivamente.
- 5 2. Microorganismos de la cepa de *Lactobacillus* elegida entre las especies *Lactobacillus plantarum* LB3e y *Lactobacillus plantarum* LB7c según la reivindicación 1, **caracterizados porque** son capaces de sobrevivir a temperaturas desde +85 °C durante más de 25 minutos.
3. El uso de una cepa de *Lactobacillus* según la reivindicación 1 en productos alimentarios tales como pan, masa, productos de cereal, papilla de avena, gachas, muesli, granola, producto basado en cereal en polvo, pasta,
10 semiproductos, sopas, productos precocidos, pan corriente, compota.
4. Un procedimiento para prevenir el moho en productos alimentarios, en el que al menos una cepa de *Lactobacillus* según la reivindicación 1 está incorporada en dichos productos alimentarios.
5. Un procedimiento para prevenir el moho en productos alimentarios según la reivindicación 4, en el que el producto
15 alimentario se selecciona entre pan, masa, productos de cereal, papilla de avena, gachas, muesli, granola, producto basado en cereal en polvo, pasta, semiproductos, sopas, productos precocidos, pan corriente, compota.
6. Producto alimentario tal como como pan, masa, productos de cereal, papilla de avena, gachas, muesli, granola, producto basado en cereal en polvo, pasta, semiproducto, sopas, productos precocidos, pan corriente, compota, caracterizado porque dicho producto alimentario también contiene una cepa de *Lactobacillus* viable según la reivindicación 1.
- 20 7. Productos de pan y masa, conteniendo también dichos productos de pan y masa una cepa de *Lactobacillus* viable elegida entre las especies *Lactobacillus plantarum* LB931, que se ha depositado en la *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* y a la que se la ha asignado el número de acceso DSM 11918, *Lactobacillus rhamnosus* LB21, que se ha depositado en la NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate y a la que se la ha asignado el número de acceso NCIMB 40564, *Lactobacillus plantarum* LB3e y *Lactobacillus plantarum* LB7c, que se
25 han depositado en la *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, y a las que se las ha asignado el número de acceso 17852 y 17853 respectivamente, siendo dichas cepas depositadas capaces de sobrevivir a temperaturas desde +85 °C durante más de 25 minutos y estando dichos lactobacilos de al menos una de dichas cepas incorporados en dichos productos de pan y masa antes de un tratamiento con calor.
8. Un procedimiento para prevenir el moho en los productos de pan y masa en el que una cepa de *Lactobacillus* según la reivindicación 7 está incorporada en dichos productos de pan y masa.
30
9. El uso de una cepa de *Lactobacillus* elegida entre las especies *Lactobacillus plantarum* LB931, que se ha depositado en la *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* y a la que se la ha asignado el número de acceso DSM 11918, *Lactobacillus rhamnosus* LB21, que se ha depositado en la NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate y a la que se la ha asignado el número de acceso NCIMB 40564, *Lactobacillus plantarum* LB3e y
35 *Lactobacillus plantarum* LB7c, que se han depositado en la *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, y a las que se las ha asignado el número de acceso 17852 y 17853, respectivamente, para producir un producto alimentario, en el que el producto alimentario se prepara por tratamiento con calor de un material de partida del producto alimentario usando una fuente de calor que expone dicho producto alimentario, tal como pan, masa, productos de cereal, papilla de avena, gachas, muesli, granola, producto basado en cereal en polvo, pasta,
40 semiproducto, sopas, productos precocidos, pan corriente, compota, a una temperatura por encima de +85 °C, en el que los lactobacilos de al menos una de dichas cepas están incorporados en dicho producto alimentario antes del tratamiento con calor.
10. Un procedimiento para prevenir el moho en los productos alimentarios, en el que al menos una cepa de *Lactobacillus* según la reivindicación 9 está incorporada en dichos productos alimentarios.
- 45 11. El producto alimentario preparado por tratamiento con calor de un material de partida del producto alimentario usando una fuente de calor que expone dicho producto alimentario a una temperatura por encima de +85 °C **caracterizado porque** dicho producto alimentario también contiene una cepa de *Lactobacillus* viable elegida entre las especies de *Lactobacillus plantarum* LB931 (DSM11918), *Lactobacillus rhamnosus* LB21 (NCIMB 40564), *Lactobacillus plantarum* LB3e (DSM 17852) y *Lactobacillus plantarum* LB7c (DSM 17853) respectivamente.
- 50 12. El producto alimentario según la reivindicación 11, en el que la cepa de *Lactobacillus* viable está presente en una cantidad por encima de $1,0 \times 10^3$ UFC/g, preferentemente por encima de $1,0 \times 10^4$ UFC/g y lo más preferentemente por encima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g de bacterias vivas por gramo de producto alimentario después de tratamiento con calor.
- 55 13. Un producto alimentario según las reivindicaciones 7, 11 o 12 que comprende la cepa *Lactobacillus* viable termoestable elegida entre las especies *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus* para promover la

inmunotolerancia en enfermedades autoinmunes tales como la enfermedad celiaca.

Figura 1

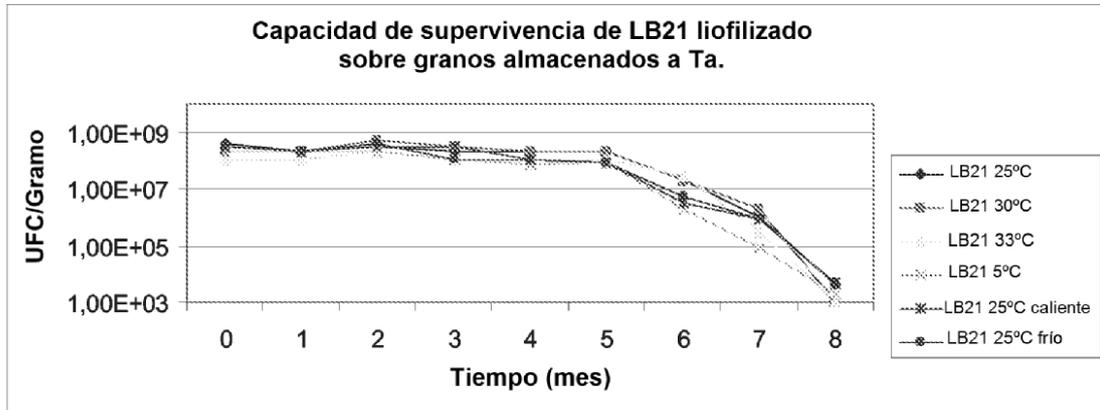


Figura 2

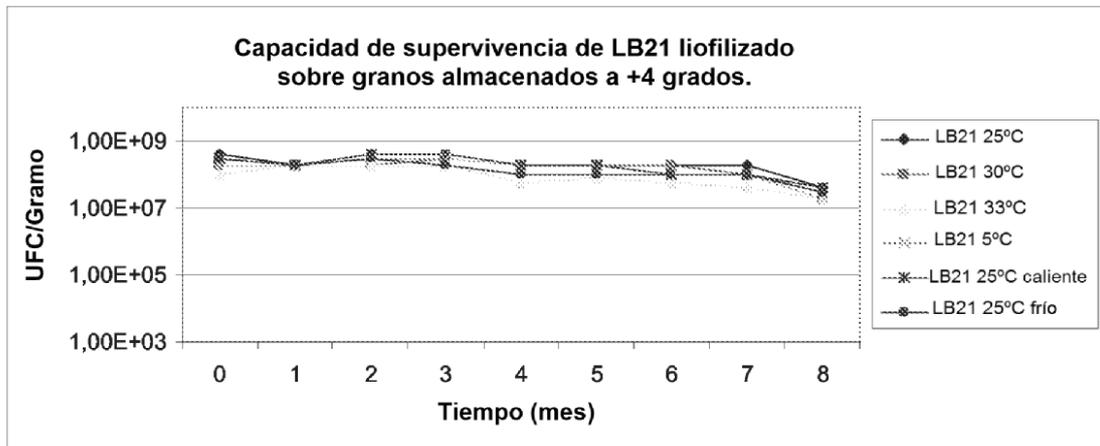


Figura 3

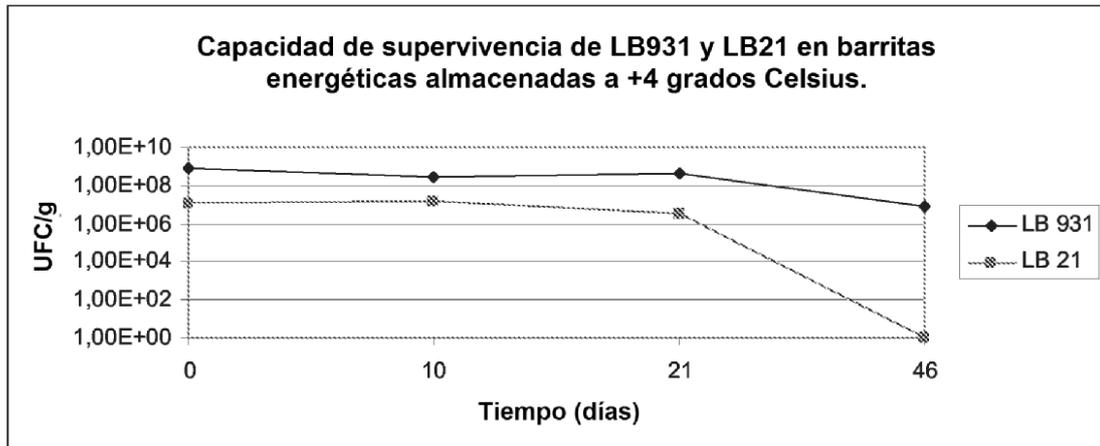


Figura 4

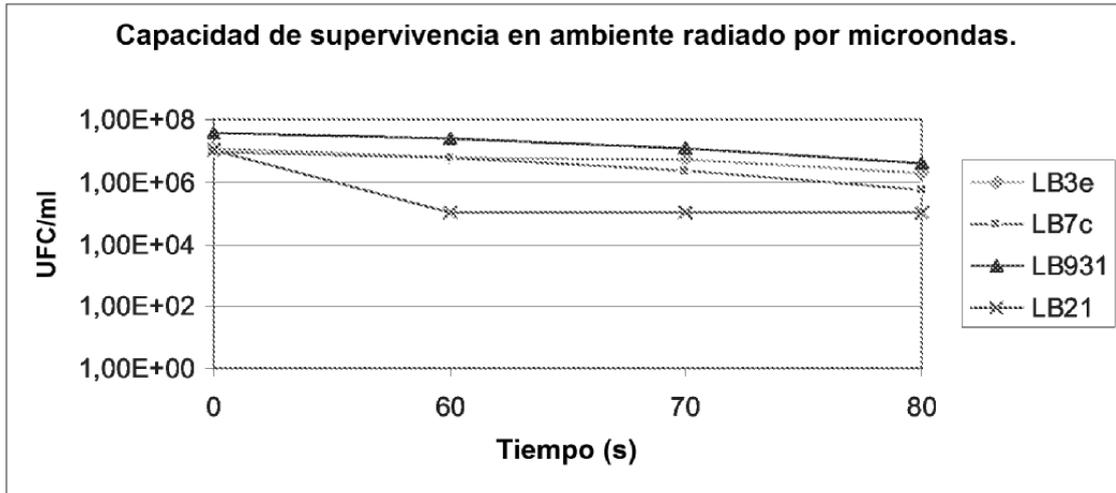


Figura 5

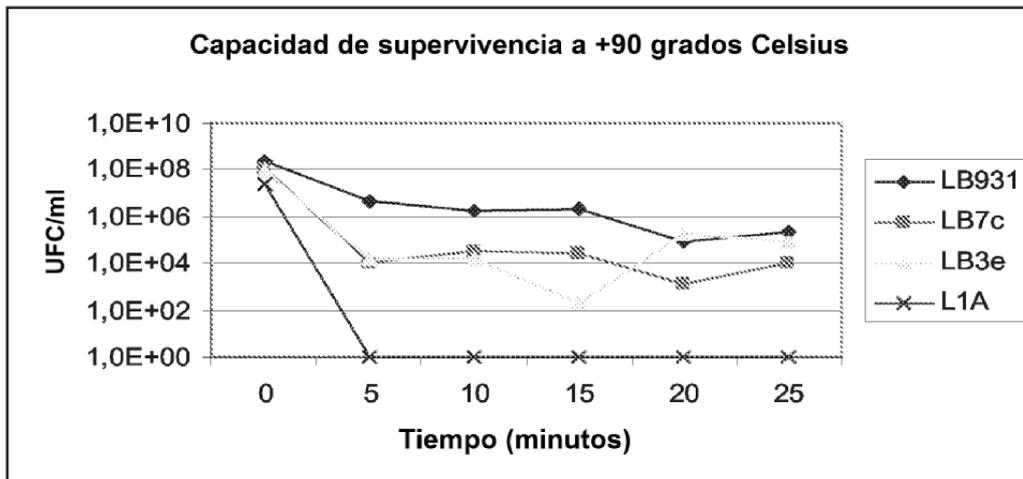


Figura 6

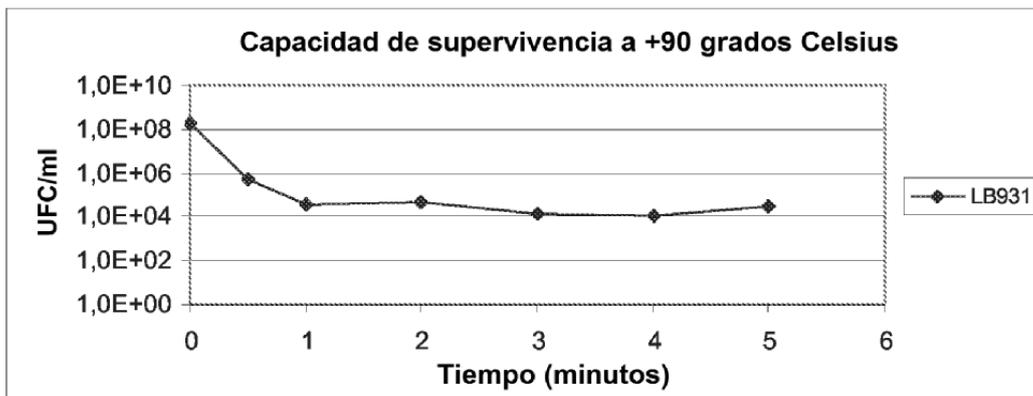


Figura 7

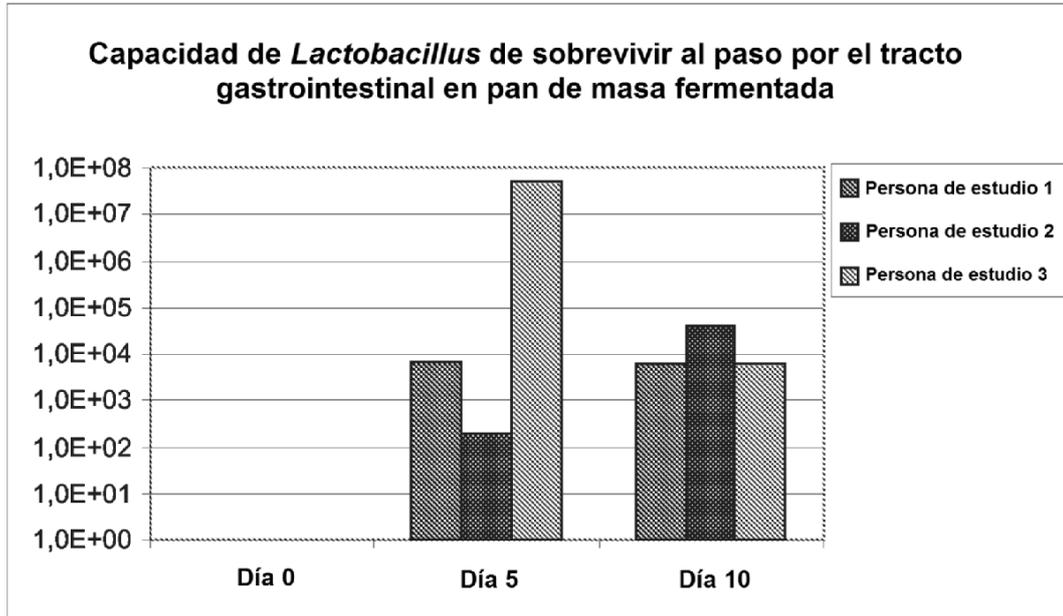


Figura 8

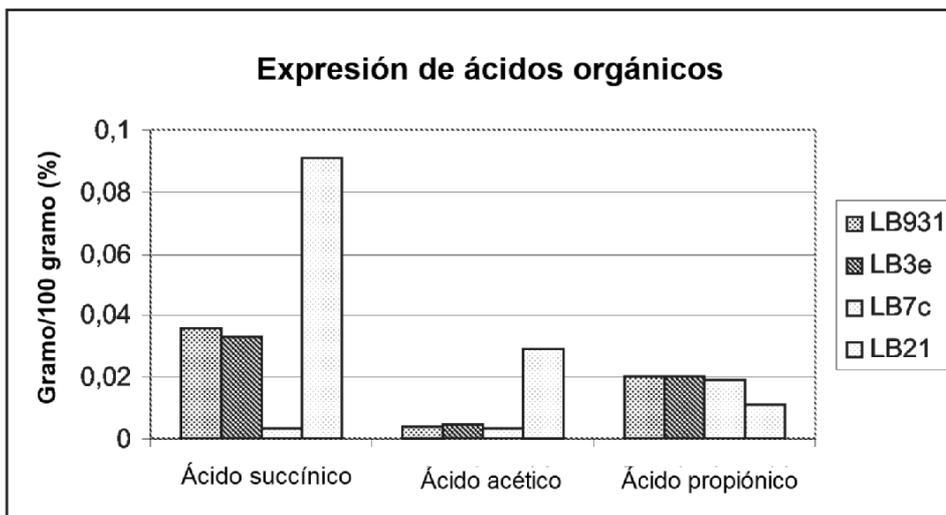


Figura 9

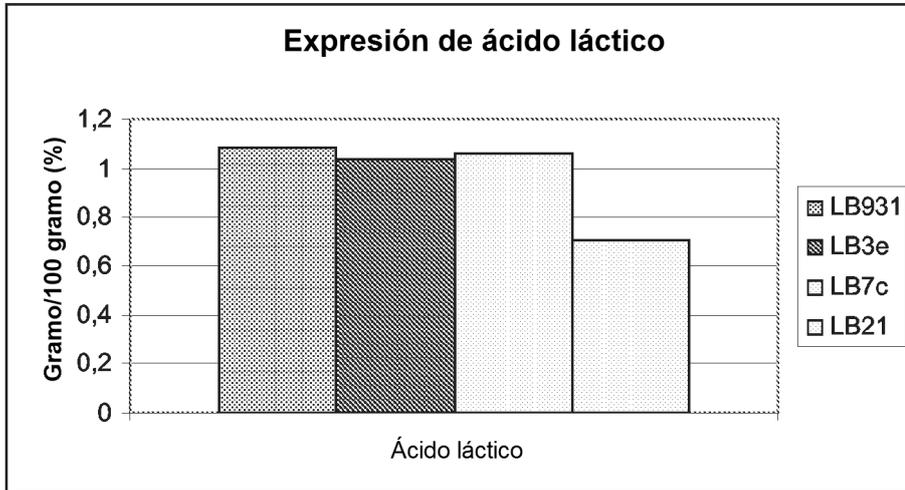


Figura 10

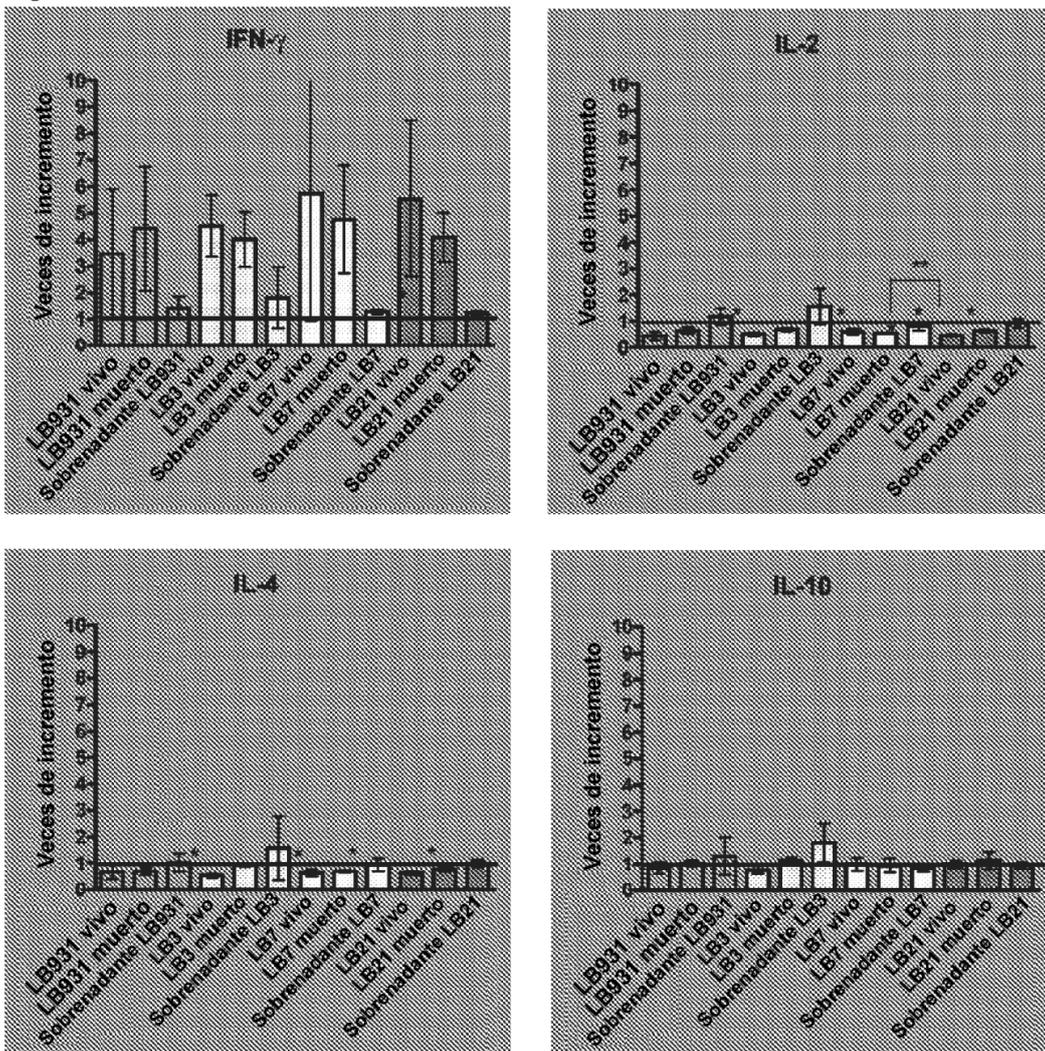


Figura 11

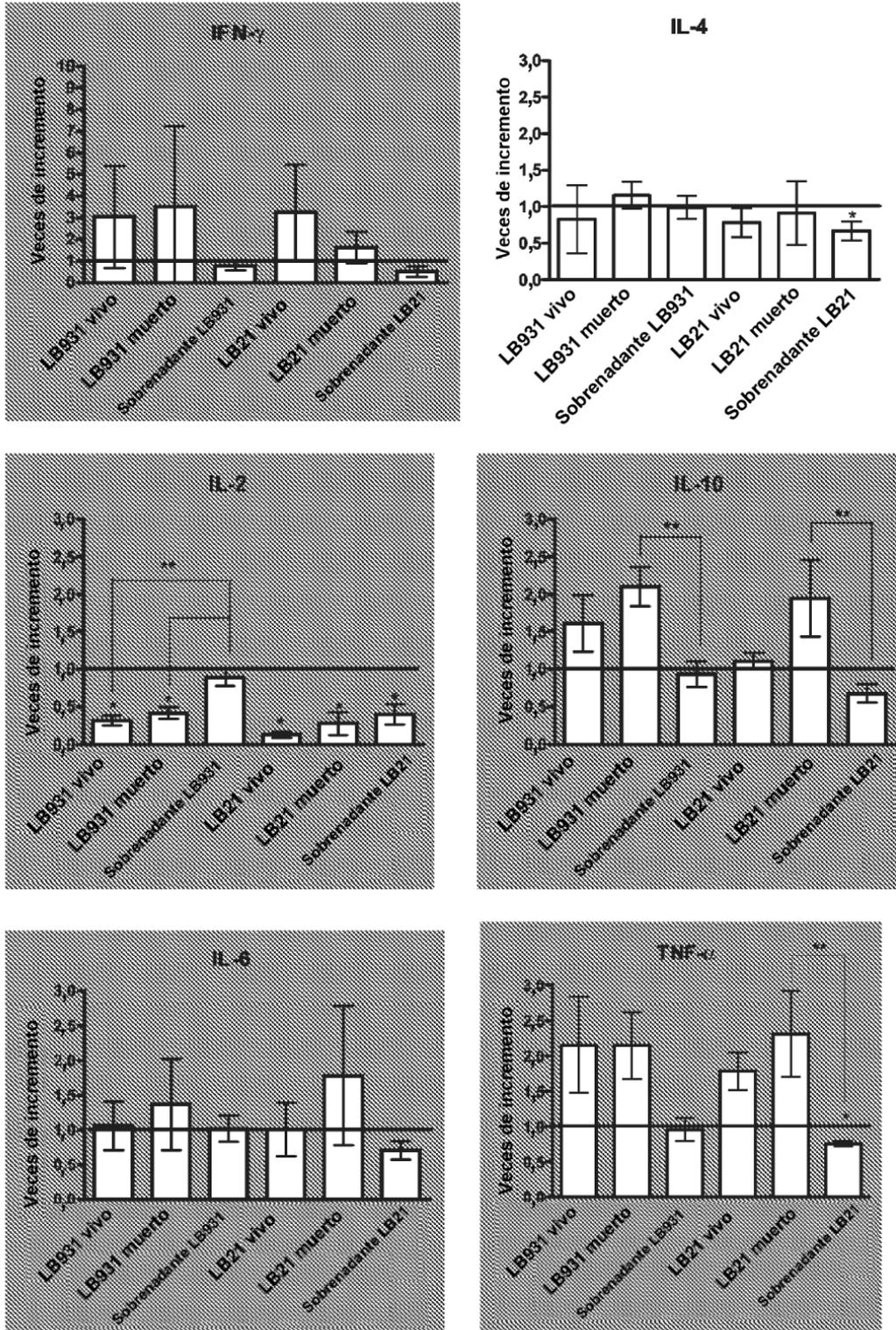


Figura 12

