



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 064**

51 Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06810046 .0**
96 Fecha de presentación : **07.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1923065**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2008**

54 Título: **Inhibidor de la absorción de colesterol.**

30 Prioridad: **08.09.2005 JP 2005-260401**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.03.2011

73 Titular/es: **KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA
1-19, Higashishinbashi 1-chome
Minato-ku, Tokyo 105-8660, JP**

72 Inventor/es: **Hayakawa, Hiroko;
Iino, Tohru y
Ishikawa, Fumiyasu**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 355 064 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

Inhibidor de la absorción de colesterol.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* que tienen un excelente efecto de inhibición de la absorción de colesterol y un inhibidor de absorción del colesterol que contiene estas bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* como un principio activo.

10 **Antecedentes de la técnica**

Los colesterolos existen en muchas células y principalmente juegan papeles fisiológicos de mantenimiento de funciones celulares como componentes de lipoproteínas o membranas biológicas, sirviendo como materia prima para el ácido biliar y diversas hormonas y similares. Sin embargo, se sabe que un aumento de los niveles del colesterol en suero resultante de una toma excesiva de alimentos con un alto contenido de colesterolos conduce a arterioesclerosis. En la vida dietética moderna con muchas oportunidades de tomar colesterolos, se requiere suprimir la concentración de colesterolos en el cuerpo.

Además, se ha indicado que las células bacterianas de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium longum* tienen efectos paliativos de lípido en sangre (Documento de Patente 1). En particular, se ha estudiado bien *Bifidobacterium longum* y algunos informes han mostrado que *Bifidobacterium longum* SBT 2933R (FERM P-8743) tiene efectos excelentes (Documento no de Patente 1) y se ha propuesto el uso de células de esta bacteria o un cultivo de las mismas como un inhibidor de la elevación de colesterol en suero (Documento de Patente 2). En general, sin embargo, las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* son débiles frente a oxígeno así como ácido gástrico y ácido biliar en el cuerpo. Por lo tanto, existe un problema que, cuando las células de esta bacteria o un cultivo de las mismas se toman por vía oral, las células tienen una escasa capacidad de supervivencia en el tracto gastrointestinal y muestran efectos inadecuados en muchos casos.

En consecuencia, se han deseado bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* que tienen una excelente capacidad de supervivencia y un efecto de inhibición de elevación del colesterol en suero.

Sin embargo, sólo se sabe con respecto a dichas bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* que tienen una capacidad de supervivencia excelente que *Bifidobacterium longum* SBT 10254 (FERM P-14820) (Documento de Patente 3) y *Bifidobacterium longum* (FERM BP-7787) (Documento de Patente 4) tienen una excelente capacidad de supervivencia y muestran un efecto inhibidor de la elevación de colesterol en suero, que *Bifidobacterium longum* BB536, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Bifidobacterium animalis* ATCC 25527 (Documento no de Patente 2) muestran un efecto de sedimentación de colesterol y similares. En la situación actual, existen pocas opciones de microorganismos que tengan una excelente capacidad de supervivencia y un efecto inhibidor de colesterol.

Además, puesto que con frecuencia es inevitable almacenar fármacos o alimentos usando estos microorganismos durante un largo período, se requiere una alta estabilidad de almacenamiento. Sin embargo, los microorganismos conocidos tienen una escasa capacidad de supervivencia después de almacenamiento a largo plazo y muchos de ellos tienen una escasa capacidad de supervivencia, particularmente, en condiciones no anaeróbicas.

[Documento de Patente 1] JP-A-61-271223

[Documento de Patente 2] JP-B-6-96537

[Documento de Patente 3] JP-B-3384907

[Documento de Patente 4] JP-A-2003-238423

[Documento no de Patente 1] The 6th Japan Bifidus Foundation, Annual Meeting Proceedings, p. 18, 1987

[Documento no de Patente 2] Letters in Applied Microbiology, Vol.21, 149-151, 1995

Descripción de la invención60 **Problemas a resolver por la invención**

En consecuencia, un objeto de la presente invención es proporcionar una bacteria que pertenece al género *Bifidobacterium* que muestre una excelente capacidad de supervivencia en el tracto gastrointestinal, tenga efectos de inhibición de la absorción del colesterol en el tracto intestinal, sea excelente en efectos de mejora del metabolismo de lípidos que incluyen disminuir el nivel del colesterol en sangre y muestre una tasa de supervivencia alta después de almacenamiento y un inhibidor de absorción de colesterol que usa la misma.

Medio para resolver los problemas

Los inventores de la presente invención realizaron diversas investigaciones para conseguir el objetivo anterior. Como resultado, han descubierto sorprendentemente que *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394 y *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 y YIT 10393 son excelentes en efectos de eliminación de colesterol, muestran una potente tolerancia al ácido y tolerancia al ácido biliar, tienen adicionalmente un excelente efecto de la inhibición de la absorción de colesterol en los intestinos y muestran una alta capacidad de supervivencia después de almacenamiento, en particular, una alta tasa de supervivencia después de almacenamiento incluso en condiciones no anaeróbicas. Por lo tanto, la presente invención se logró. Los microorganismos usados en la presente invención, en concreto *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 y *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 son microorganismos nuevos descubiertos por los inventores de la presente invención.

Específicamente, la presente invención proporciona un inhibidor de absorción de colesterol que comprende, como principio activo, al menos un microorganismo seleccionado de *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 y *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393.

Además, la presente invención proporciona microorganismos nuevos, *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394 (FERM BP-10662), *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 (FERM BP-10660) y *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 (FERM BP-10661).

Puesto que *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394 y *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 y YIT 10393 de la presente invención no sólo tienen un excelente efecto de eliminación de colesterol sino que también son excelentes en la tolerancia al ácido y tolerancia al ácido biliar, también muestran un excelente efecto en la inhibición de la absorción de colesterol en los intestinos y pueden utilizarse para el fin de mejorar el metabolismo de lípidos, por ejemplo, disminuir el nivel de colesterol en sangre. Además, puesto que estos microorganismos tienen una alta tasa de supervivencia después de almacenamiento, en particular, una alta tasa de supervivencia incluso después de almacenamiento en condiciones no anaeróbicas, el inhibidor de absorción de colesterol de la presente invención puede almacenarse durante un período largo así como en condiciones no anaeróbicas.

Mejor forma de llevar a cabo la invención

Las *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* usadas en la presente invención son *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 y *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393.

Estas *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392, *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 y *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, los microorganismos usados en la presente invención, son nuevas cepas bacterianas aisladas por los inventores de la presente invención como cepas bacterianas que tienen propiedades tales como mostrar una actividad de eliminación de colesterol del 70% o mayor, una tasa de supervivencia del 20% o mayor en un jugo gástrico artificial y una tasa de proliferación de 100 o más, como un valor de Klett (turbidez celular bacteriana), en un medio que contiene ácido biliar. Estas cepas bacterianas tienen las siguientes propiedades microbiológicas. Específicamente, todas estas cepas bacterianas son bacilos polimórficos Gram-positivos que no forman esporas, no tienen motilidad y son aeróbicos obligados, pueden crecer a 37°C y muestran propiedades de *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum*, *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum*, *Bifidobacterium animalis subsp. animalis*, respectivamente, en este orden, aparte de la actividad de eliminación de colesterol, la tasa de supervivencia en un jugo gástrico artificial y la tasa de proliferación en un medio que contiene ácido biliar mostrado anteriormente.

Las especies de estas cepas bacterianas nuevas se identificaron basándose en los hallazgos en la identificación de especies bacterianas usando la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de que la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de YIT 10392 muestra una homología del 99,6% con la de *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* (N° de Acceso D86194), la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de YIT 10393 muestra una homología del 99,6% con la de *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* (N° de Acceso D86194) y la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de YIT 10394 muestra una homología del 99,7% con la de *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* (N° de Acceso D86185). Aquí, la identificación de especies bacterianas usando secuencia de nucleótidos de ADNr 16S se realizó mediante la amplificación de la longitud completa de una secuencia de ADNr 16S mediante PCR usando, como un molde, ADN extraído de células bacterianas obtenidas por lavado con centrifugación de una solución bacteriana cultivada de forma anaeróbica (sustitución de dióxido de carbono) usando un medio de GAM con glucosa añadida al 0,5% a 37°C durante 24 horas, determinando la secuencia de nucleótidos del producto de amplificación mediante el método de terminador de colorante y buscando la secuencia de nucleótidos obtenida en una base de datos. Además, se determinó que estas cepas bacterianas eran nuevas basándose en los hallazgos de que sus secuencias de nucleótidos de ADNr 16S eran diferentes de las de las cepas tipo y los resultados de análisis de polimorfismo de ADN cromosómico por el método de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) eran diferentes.

Bifidobacterium animalis subsp. animalis YIT 10394, *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 y *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 se transfirieron como los Números de Acceso FERM BP-10662, FERM BP-10660 y FERM BP-10661, respectivamente, al Organismo Depositario de Patente Internacional,

ES 2 355 064 T3

Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial avanzada el 14 de agosto, de 2006. Estos microorganismos se han depositado en la misma organización el 18 de agosto de 2005 antes de la transferencia. La dirección postal de este depositario es código postal 305-8566, Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón.

5 Además, tanto *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253 como *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 pueden comprarse de la Colección de Microorganismos de Japón (JCM) y la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y los números ATCC de los mismos son ATCC 27536 y ATCC 27674, respectivamente.

10 Un microorganismo cuya tasa de supervivencia es del 50% o mayor cuando se almacena una comida o bebida con leche fermentada producida usando el microorganismo a 10°C durante 21 días en una condición no anaeróbica (aeróbica) se prefiere como el microorganismo usado en la presente invención.

15 Además, como microorganismos de la presente invención, se prefieren bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* con una actividad de eliminación del colesterol del 70% o mayor, y se prefieren más bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* con una actividad de eliminación de colesterol del 70% o mayor, una tasa de supervivencia del 20% o mayor en un jugo gástrico artificial y una tasa de proliferación de 100 o más, como el valor de Klett (turbidez celular bacteriana) en un medio que contiene ácido biliar. Las bacterias comunes que pertenecen al género de *Bifidobacterium*, tienen una tasa de supervivencia de aproximadamente 0 a varios porcentajes en un jugo gástrico artificial y una tasa de proliferación de aproximadamente 0 a varias decenas, como el valor de Klett (turbidez celular bacteriana), en un medio que contiene ácido biliar. Muchas células de bacterias que tienen alta tolerancia al ácido y tolerancia al ácido biliar que se seleccionan basándose en los valores anteriormente mencionados pueden alcanzar los intestinos en un estado viable.

25 Aquí, la actividad de eliminación del colesterol puede calcularse mediante, por ejemplo, la medición del nivel de colesterol en el sobrenadante de acuerdo con un método habitual después de permitir a las células del microorganismo permanecer junto con micelas lipídicas artificiales, comparando con el nivel de colesterol en un sobrenadante que no contenía células bacterianas e insertando los valores en la siguiente ecuación.

30
$$\text{Actividad de eliminación de colesterol (\%)} = 100 - (\text{nivel de colesterol en el sobrenadante que contiene células bacterianas}) / (\text{nivel de colesterol en el sobrenadante que no contiene células bacterianas}) \times 100$$

35 Además, la tasa de supervivencia en un jugo gástrico artificial puede definirse como, por ejemplo, la tasa de supervivencia después de almacenamiento en un jugo gástrico artificial de pH 3,0 a 37°C durante 1 hora. Cuando este valor es alto, significa que la tasa de supervivencia en el tracto gastrointestinal es alta.

40 Además, la tasa de proliferación en un medio que contiene ácido biliar puede definirse como, por ejemplo, turbidez tras cultivo en un medio que contiene ácido biliar al 0,2% a 37°C durante 24 horas expresado con un valor de Klett (colorímetro de Klett-Summerson, filtro N° 66). Cuando este valor es alto, la tasa de supervivencia y la tasa de proliferación en el tracto gastrointestinal son altas.

45 *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* ATCC 27536 es idéntica a *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253 y *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* ATCC 27674 es idéntica a *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117. Todas estas cepas bacterianas se clasifican como *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* en JCM y ATCC. Sin embargo, puesto que las secuencias de nucleótidos de ADNr 16S de estas dos cepas bacterianas coincidía al 100% con las de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (N° de Acceso X89513), estas cepas se clasifican como *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*.

50 Puesto que los microorganismos de la presente invención tienen una actividad de eliminación del colesterol y disminuyen el nivel de colesterol, en particular, el nivel del colesterol en sangre como se muestra en los ejemplos descritos posteriormente, los agentes que contienen estos microorganismos en una cantidad eficaz son útiles como inhibidores de la absorción de colesterol, en particular, como inhibidores de absorción de colesterol del tracto intestinal. Se espera que el inhibidor de la absorción de colesterol de la presente invención pueda usarse para disminuir los niveles de colesterol, triglicéridos y colesterolos VLDL y LDL en sangre y el índice de arteriosclerosis, mejorar el metabolismo de lípidos incluyendo elevar el colesterol HDL, mejorar la hiperlipidemia, que con frecuencia se desarrolla debido a falta de hormonas sexuales femeninas tras la menopausia, y disminuir un riesgo de desarrollar arterioesclerosis.

60 Además, puesto que los microorganismos de la presente invención muestran tolerancia al ácido y tolerancia al ácido biliar como se muestra en los ejemplos descritos posteriormente, los agentes que contienen estos microorganismos en una cantidad eficaz pueden usarse como inhibidores de absorción de colesterol para administración oral.

65 Además, puesto que los microorganismos de la presente invención tienen una alta capacidad de supervivencia incluso después de almacenamiento en una comida o bebida de leche fermentada en una condición aeróbica (no anaeróbica) como se muestra en los ejemplos descritos posteriormente, los agentes que contienen estos microorganismos en una cantidad eficaz pueden usarse como inhibidores de la absorción de colesterol almacenados en una condición aeróbica (no anaeróbica). La temperatura de almacenamiento puede ajustarse a, por ejemplo, de -80 a 10°C.

Es suficiente que el inhibidor de absorción del colesterol de la presente invención comprenda, como un principio activo, al menos un microorganismo seleccionado de *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394 y *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 y YIT 10393. Los ejemplos de una combinación de microorganismos usados en este documento incluyen al menos una combinación seleccionada de *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 y *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393.

Además, el inhibidor de absorción de colesterol de la presente invención usa *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394 y *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 y YIT 10393 solamente o en combinación o puede usar estos microorganismos en combinación con otros microorganismos. Los ejemplos de tales microorganismos incluyen bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* tales como *Bifidobacterium animalis subsp. animalis*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium gallicum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium pseudolongum subsp. pseudolongum*, *Bifidobacterium suis* y *Bifidobacterium thermophilum*; bacterias que pertenecen a los *Lactobacillus* tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus maltaromicus*, *Lactobacillus paracasei*, y *Lactobacillus pentosus*; bacterias que pertenecen al género *Streptococcus* tales como *Streptococcus thermophilus*; bacterias que pertenecen al género *Lactococcus* tales como *Lactococcus lactis subsp. cremoris* y *Lactococcus lactis subsp. lactis*; bacterias que pertenecen al género *Leuconostoc* tales como *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*; bacterias que pertenecen al género *Pediococcus* tales como *Pediococcus cerevisiae*; bacterias que pertenecen al género *Enterococcus* tales como *Enterococcus faecalis*; bacterias que pertenecen al género *Acetobacter* tales como *Acetobacter aceti*; bacterias que pertenecen al género *Gluconobacter* tales como *Gluconobacter oxydans*; bacterias que pertenecen al género *Bacillus* tales como *Bacillus subtilis*; levaduras que pertenecen al género *Saccharomyces* tales como *Saccharomyces cerevisiae*; levaduras que pertenecen al género *Torulaspora* tales como *Torulaspora delbrueckii*; levaduras que pertenecen al género *Candida* tales como *Candida kefir*; levaduras que pertenecen al género *Kluyveromyces* tales como *Kluyveromyces marxianus*; levaduras que pertenecen al género *Debaryomyces* tales como *Debaryomyces hansenii*; levaduras que pertenecen al género *Pichia* tales como *Pichia anomala*; levaduras que pertenecen al género *Zygosaccharomyces* tales como *Zygosaccharomyces rouxii*; hongos que pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Monascus*, *Penicillium*, *Rhizomucor* y *Rhizopus* tales como *Aspergillus oryzae*, *Mucor japonicus*, *Monascus purpureus*, *Penicillium camemberti*, *Rhizomucor pusillus* y *Rhizopus arrhizus*.

Además, los microorganismos contenidos en el inhibidor de absorción de colesterol de la presente invención pueden liofilizarse o utilizarse como un cultivo que contiene estos microorganismos. En cualquier forma, es preferible que los microorganismos estén en el estado de células viables.

El inhibidor de absorción de colesterol de la presente invención puede administrarse en forma de una formación de fármaco habitualmente usada mediante la mezcla de los microorganismos anteriormente mencionados con vehículos no tóxicos farmacéuticos sólidos o líquidos. Los ejemplos de dicha formulación incluyen formulaciones sólidas tales como comprimido, gránulo, polvo y cápsula, formulaciones líquidas tales como soluciones, suspensiones y emulsiones, formulaciones liofilizadas. Estas formulaciones pueden prepararse por los medios habituales para la fabricación de formulaciones. Los ejemplos de los vehículos no tóxicos farmacéuticos incluyen glucosa, lactosa, sacarosa, almidón, manitol, dextrina, glicéridos de ácidos grasos, polietilenglicol, almidón de hidroxietilo, etilenglicol, ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno, aminoácidos, gelatina, albúmina, agua, solución salina fisiológica. Además, pueden añadirse adecuadamente aditivos habitualmente usados tales como estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, aglutinantes y agentes isotonzadores según se requiera.

Además, el inhibidor de absorción de colesterol de la presente invención puede tomarse como los microorganismos anteriormente mencionados tal cual son, mediante su adición directamente a un alimento o en forma de una comida o bebida. Los ejemplos preferidos de la comida o bebida incluyen leche fermentada, leche de soja fermentada, zumo de frutas fermentado, zumo vegetal fermentado, zumo de arroz fermentado, coliflor fermentada y comidas y bebidas fermentadas usando materiales derivados de animales o plantas (encurtidos, pasta de soja fermentada, salsa de soja, té fermentado, salchichas fermentadas, mayonesa fermentada, queso, vísceras de pescado en salmuera, etc.) que comprenden los microorganismos de la presente invención en el estado de células viables. La comida o bebida puede fabricarse por un método habitual. Por ejemplo, cuando se fabrica leche fermentada, primero, se obtiene una base de leche fermentada inoculando y cultivando al menos uno de *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 y *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* solos o junto con otros microorganismos en un medio de leche esterilizada y homogeneizando el medio. Después, se añade y mezcla una solución de jarabe preparada de forma separada y la mezcla se homogeneiza con un homogenizador o similar y se añade adicionalmente un saporífero para completar un producto final. La leche fermentada de la presente invención obtenida de este modo puede prepararse como un producto en cualquier forma tal como de tipo normal, tipo blando o de tipo con sabor a frutas, en un estado sólido, líquido o congelado o similar. También se incluyen piensos animales en la comida o bebida. El microorganismo de la presente invención en leche fermentada puede contenerse, por ejemplo, a una concentración de 10^3 a 10^{13} ufc/ml.

En este caso, el inhibidor de la absorción de colesterol de la presente invención puede mezclarse con materiales alimentarios habitualmente usados en comidas y bebidas tales, por ejemplo, sacáridos, proteínas, péptidos, lípidos, vitaminas, minerales, componentes vegetales tales como verduras, granos y fruta, componentes animales tales como sangre, leche, hígado, huesos y músculos, componentes de microorganismos tales como bacterias, hongos, levaduras y champiñones, componentes de cultivo de los mismos, agentes gelatinizantes, agentes de fijación, agentes espesantes, saporíferos, agentes colorantes, agentes promotores del crecimiento de bacterias de *Bifidobacterium*, agentes promotores de crecimiento de bacterias de ácido láctico. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen diversos edulcorantes tales como glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa, isoglucosa, xilosa, palatinosa, miel, jarabe de arce y amazake, diversos alcoholes de azúcares tales como sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, palatinit, jarabe de almidón reducido y jarabe de maltosa reducido, diversos edulcorantes altamente dulces tales como sucralosa y aspartamo, diversos edulcorantes naturales tales como regaliz, stevia y glucósido de ácido glicirricínico, diversos emulsionantes tales como ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de azúcar de glicerina y lecitina y diversos agentes espesantes (estabilizantes) tales como agar, gelatina, carragenina, goma guar, goma arábica, goma de xantano, pectina y goma de algarroba.

Además, los ejemplos de los materiales de comida incluyen también diversos carbohidratos tales como tagatosa, lactosa, trehalosa, agarooligosacárido, nigerooligosacárido, galactooligosacárido, fructooligosacárido, xilooligosacárido, rafinosa, estaquiosa, lactulosa, maltotriosa, isomaltooligosacárido, ciclodextrina, glucosamina y n-acetilglucosamina, diversas fibras dietéticas tales como ácido alginico, alginato sódico, fucoidán, sargasano, furcerán, funorán, porfirano, aminarano, pululano, goma de tara, manano de konjak, inulina, quitosán, polidextrosa, ácido hialurónico, condroitín sulfato, β -glucano, manano, galactano, fructano, xilano, arabinano, arabinogalactano, glucomanano, galactomanano, fibra de remolacha, fibra de avena, fibra de trigo, fibra de soja, fibra de arroz, fibra de cebada, goma de xantano, fibra de maíz, fibra de manzana, fibra de cítricos, fibra de Psyllium, fibra de pino, fibra de ciruela, fibra de guisante, fibra de banana, celulosa de bacterias de ácido acético, pared celular de bacterias de ácido láctico, pared celular de bacterias *Bifidobacterium*, pared celular de levadura, fructano de natto, colágeno y ácido poliglutámico de natto o diversos hidrolisatos de estas fibras dietéticas y diversos materiales que contienen fibras dietéticas no digeribles tales como salvado de trigo, salvado de cebada, salvado de arroz, salvado de avena fatua, salvado de avena, salvado de centeno, Psyllium, polvo de salvado de arroz, arroz pardo, achicoria, residuo de tofu, pulpa de manzana, almidón resistente, malta de cebada, cáscara de maíz, células bacterianas de ácido láctico, células bacterianas de *Bifidobacterium*, células de levadura de la cerveza, células de levadura del vino, lías del vino, lías del saque, lías de la salsa de soja, lías de cerveza, arroz malteado, trigo malteado, judías malteadas, *Monascus pilosus*, *Aspergillus oryzae*, sustancia viscosa de soja fermentada, extracto de semilla de uva, jalea real, propóleos, clorela, espirulina, euglena, undaria, kombu, grapa del mar, eisenia, *Eisenia bicyclis*, *Porphyra tenera*, alga nori, hizikia, ulvaceae y *Nemacystus decipiens*.

Además, los ejemplos de los materiales de comida incluyen diversos minerales tales como calcio, magnesio, zinc, hierro, manganeso, yodo, selenio, cobre, cobalto y dolomita y diversas sales de estos minerales, diversos ácidos tales como ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido pirúvico, ácido glucónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido fosfórico y aminoácidos tales como creatina, metionina, cisteína y ácido glutámico y diversas sales de estos ácidos, diversos componentes tales como glutatión, fitina, ácido fítico, lignina, ácido poli- γ -glutámico y productos de degradación de los mismos, saponina, ácido ferúlico, ácido γ -aminobutírico, γ -orizanól, chalcona, flavonona, flavona, flavonol, isoflavona, antociano, catequina, proantocianidina, polifenol de hoja de té, curcumida, capsaicinoide, sesaminol, lignano de sésamo, teaflavina, β -dicetonas, carotenoides, compuestos de alilsulfuro, isotiocianatos, terpenos, clorofilas, esfingolípidos, gangliósidos, ácidos grasos n-3 poliinsaturados, ácidos grasos n-6 poliinsaturados, ácidos linoleicos conjugados, fosfolípidos y esteroides vegetales, diversas proteínas tales como proteínas de soja tales como glicinina y conglucina, proteínas de huevos tales como ovoalbúmina y ovomucoide, lactoproteínas y proteínas del suero de leche tales como caseína, lactalbúmina y lactoferrina, proteínas del arroz tales como fosfopéptido de caseína y oricenina, proteínas del trigo tales como glutenina y gliadina y proteínas del pescado y péptidos degradados con enzimas y péptidos degradados con ácido de las mismas, diversas vitaminas tales como vitamina A, familia de la vitamina B, vitamina C, familia de la vitamina D, vitamina E, familia de la vitamina K, β -caroteno, ácido retinoico y ácido fólico, diversos extractos de hierbas sonajero, semilla de calabaza, semilla de granada, hierba de San Juan, pasiflora, valeriana, *Pueraria mirifica*, romero, menta piperita, perejil, caléndula, melisa, cártamo, semilla de rábano japonés, árbol del café, aralia, frutos de la cucurbita, pieles de cítricos, hoja de ginkgo, azufaifo, goji, regaliz, *Ganoderma lucidum*, ginseng, guaraná y similares, diversos extractos vegetales de té verde, té negro, té oolong, té de gymnema, té de guayaba y similares, y diversas especias tales como pimienta, *Zanthoxylum*, canela, cúrcuma, salvia, tomillo, albahaca, pimienta roja y nuez moscada.

Además, los ejemplos de los materiales de comida incluyen diversos componentes de grano tales como arroz, arroz pardo, cebada, trigo, avena, centeno, trigo tropical, amaranto, *Setaria italica*, *Panicum miliaceum*, trigo negro, sorgo bicolor y maíz y diversos componentes de germinación de semillas de estos granos, diversos componentes vegetales tales como judía adzuki, judía adzuki blanca, judía kintoki, alubia, *Pisum sativum*, alubia de flor, garbanzos, soja negra, soja azul, frijol de oro, haba, alubia daifuku, *Angelica keiskei*, berza, cúrcuma, patata, boniato, boniato púrpura, ñame japonés, calabaza, berenjena, tomate, melón amargo, pimientos, sésamo, col, brécol, coliflor, lechuga, soja verde, jengibre, lampazo, apio, rábano japonés, rábano rústicano japonés, aguacate, zanahoria, espinaca, cebolla, ajo, lirio, cebolleta, *Perilla frutescens crispata*, cebolleta, *Allium odorum*, chirivía, *Pteridium aquilinum*, brotes de bambú, champiñón Shiitake y champiñón, componentes de fruta tales como limón, manzana, uva, fresa, naranja, caqui, guayaba, plátano, arándano, zarzamora, arándano agrio, frambuesa, arándano rojo, mirica, feijoa, tomate de árbol, cereza de indias, lima, *Citrus depressa*, melón, melocotón, mango, limón chino, papaya, piña, pera, ciruela, pomelo, mem-

ES 2 355 064 T3

brillo, albaricoque, mandarina, granada, sandía, ciruela y kiwi, diversos componentes de nueces tales como cacahuete, almendra, coco, anacardo, macadamia, cacao, castaña, nuez de ginkgo y nuez, diversos productos lácteos tales como leche de vaca, leche desnatada, suero de leche, nata, leche fermentada, yogur, lactoproteína, caseína y proteína de suero de leche y componentes de los mismos, licores fermentados tales como saque refinado, vino, vino de Shaoxing y cerveza, licores destilados tales como whisky, brandy y vodka.

Para mejorar la capacidad de supervivencia en comidas o bebidas de leche fermentada usando bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* durante el almacenamiento, se han usado principalmente envases hechos de materiales de embalaje impermeables al oxígeno tales como vidrio y papel revestido de aluminio. Como se muestra en los ejemplos posteriores, sin embargo, los microorganismos de la presente invención tienen una alta tolerancia al oxígeno y no requieren una condición estrictamente anaeróbica. Por lo tanto, como materiales envases para el inhibidor de absorción de colesterol de la presente invención, también pueden usarse resinas altamente permeables a oxígeno (poliestireno, polietileno, tereftalato de polietileno, etc.). Los envases que usan estas resinas son baratos y tienen ventajas tales como un alto grado de libertad en su moldeo en comparación con envases hechos de materiales de embalaje impermeables a oxígeno.

Los microorganismos usados como un principio activo del inhibidor de absorción de colesterol de la presente invención muestran una excelente tolerancia a ácido como se muestra en los ejemplos posteriores. Por lo tanto, el inhibidor de absorción de colesterol de la presente invención puede prepararse ácido. Por ejemplo, su pH a 25°C puede ajustarse de 2 a 7, en particular de 3 a 6.

Las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* usadas como un principio activo del inhibidor de absorción del colesterol de la presente invención se han utilizado como comida y se ha confirmado la seguridad de estas bacterias. Por lo tanto, las dosis de estas bacterias cuando se usan como un inhibidor de absorción del colesterol no están estrictamente limitadas, sino que son preferiblemente de 10^5 a 10^{13} ufc, particularmente preferiblemente de 10^8 a 10^{12} ufc por día como un conteo celular viable.

Ejemplos

La presente invención se explicará más específicamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, el ámbito de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo de Ensayo 1

(1) Actividad de eliminación de colesterol

Se cultivaron de forma anaeróbica células bacterianas en medio m-ILS (Int. J. Food. Microbiol. 81. 131-136, 2003) a 37°C durante 24 horas, el caldo de cultivo se centrifugó a 12.000 rpm y 4°C durante 15 minutos y las células bacterianas se lavaron con tampón fosfato 150 mM (pH 5,5). El lavado por centrifuga se repitió tres veces y las células bacterianas se suspendieron en tampón fosfato 150 mM para proporcionar turbidez (absorbancia a 600 nm) de 3 (conteo celular bacteriano de 10^8 - 10^9 ufc/ml) para preparar una suspensión celular bacteriana. La suspensión celular bacteriana se esterilizó en autoclave adicionalmente a 121°C durante 15 minutos para preparar una suspensión de células bacterianas muertas.

Se suspendieron 2 g de polvo de bilis bovina, 921 mg de colesterol, 135 mg de lisofosfatidilcolina, 90,2 mg de ácido monooleico y 702,2 mg de ácido oleico en tampón fosfato 150 mM (pH 7,0), la suspensión se ultrasonificó durante 12 minutos y después se ultracentrifugó a 100.000 G y 25°C durante 18 horas y se recogió una capa de micela para preparar micelas lipídicas artificiales. Se añadieron 150 μ l de micelas lipídicas artificiales por ml de suspensión celular bacteriana (conteo de células bacterianas de 10^8 - 10^9 ufc) y se permitió que la suspensión se mantuviera a 37°C. Después de 18 horas, la suspensión se centrifugó a 12.000 rpm y 4°C durante 15 minutos y se cuantificaron los colesteroles en el sobrenadante usando Determiner TC555 (Kyowa Medics Co, Ltd.). Se trató un tampón fosfato que no contenía células bacterianas de forma similar como un control y se calculó la actividad de eliminación de colesterol mediante la siguiente ecuación. Además, la actividad de eliminación del colesterol se calculó de forma similar para la suspensión de células bacterianas muertas.

$$\text{Actividad de eliminación del colesterol (\%)} = 100 - (\text{nivel de colesterol en el sobrenadante que contiene células bacterianas}) / (\text{nivel de colesterol en el sobrenadante que no contiene células bacterianas}) \times 100$$

(2) Tolerancia al ácido

Se añadieron 0,1 ml de solución bacteriana cultivada en medio GAM (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd) hasta la fase estacionaria a 10 ml de solución de Na_2HPO_4 50 mM ajustada a pH 3 con ácido clorhídrico y se trató la mezcla a 37°C durante 1 hora y se calculó la tasa de supervivencia mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Tasa de supervivencia (\%)} = (\text{conteo de células viables después de tratamiento con ácido}) / (\text{conteo de células viables antes del tratamiento con ácido}) \times 100$$

ES 2 355 064 T3

(3) Tolerancia al ácido biliar

Se inocularon 30 μ l de solución bacteriana cultivada en medio GAM hasta la fase estacionaria en 3 ml de medio GAM que contenía ácido biliar al 0,2% y se cultivó de forma anaeróbica a 37°C. Después de 24 horas, se midió la turbidez celular bacteriana usando un colorímetro Klett-Summerson (filtro N° 66).

Los resultados del ensayo de los anteriores (1) a (3) se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Resultados de determinación de actividad de eliminación de colesterol, tolerancia a ácido y tolerancia a ácido biliar de cada bacteria				
	Actividad de eliminación del colesterol de células bacterianas viables (%)	Actividad de eliminación del colesterol de células bacterianas muertas por calor (%)	Tolerancia a ácido (tasa de supervivencia, %)	Tolerancia al ácido biliar (valor de Klett)
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> YIT 10394	85	NE	97	310
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> JCM 1253*	86	NE	117	256
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> JCM 7117*	79	NE	92	177
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> YIT 10392	77	2	100	153
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> YIT 10393	86	4	100	112
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703 (cepa tipo)*	20	6	< 1	198
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i> JCM 1190 (cepa tipo)*	66	4	100	152
<i>Bifidobacterium angulatum</i> ATCC 27535 (cepa tipo)*	8	NE	12	108
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697 (cepa tipo)*	39	NE	< 1	-
<i>Bifidobacterium</i>	10	6	< 1	80

ES 2 355 064 T3

5	<i>catenulatum</i> ATCC 27539 (cepa tipo)*				
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> JCM 1200 (cepa tipo)*	19	11	< 1	126
10	<i>Bifidobacterium bifidum</i> IFO 14252 (cepas tipo)*	13	NE	< 1	-
15	<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 (cepa tipo)*	27	9	< 1	116
20	<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 (cepa tipo)*	34	12	< 1	-
25	NE: no ensayado < 1: la tasa de supervivencia era de 1% o menor en el examen de la tolerancia a ácido. - : se determinó por examen visual que virtualmente no había crecido ninguna bacteria en el medio de GAM con ácido biliar añadido en el examen de la tolerancia a ácido biliar. * Referencia				

30

35 Como se muestra en la Tabla 1, *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* y *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* de la presente invención mostraron una alta actividad de eliminación de colesterol y fueron excelentes en tolerancia a ácido y tolerancia a ácido biliar. Además, puesto que las células bacterianas muertas no tuvieron una actividad de eliminación de colesterol, se descubrió que esas bacterias muestran la actividad en un estado de célula viable.

40 Posteriormente, para averiguar si la eliminación de los colesteroles del sobrenadante resultaba de la precipitación o conversión o degradación, se midió el nivel de colesterol en la parte precipitada. Como resultado, se descubrió que los colesteroles eliminados del sobrenadante no se convirtieron o degradaron y existían en el precipitado. Este resultado sugirió la posibilidad de que las células bacterianas hubieran tomado los colesteroles en el sobrenadante y éstos precipitaran o las micelas lipídicas podrían haberse desintegrado por el efecto desconjugador del ácido biliar de células bacterianas o similares y precipitarse.

45 Ejemplo de Ensayo 2

Efectos en lípido en sangre y lípidos hepáticos en animales

50 Se esterilizó un medio de leche desnatada en polvo al 10% que contenía extracto de levadura al 0,03% a 121°C durante 15 minutos y se inoculó *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 al 1% y se cultivó de forma anaeróbica durante 24 horas. Este caldo de cultivo se inoculó al 2% en el mismo medio y se cultivó de forma anaeróbica a 37°C durante 46 a 54 horas. El conteo de células viables contenidas en la leche fermentada preparada de este modo fue de $3,7 \times 10^8$ ufc/ml. Esta leche fermentada se liofilizó y se preparó un pienso con una composición mostrada en la Tabla 2. Aquí, el conteo de células viables en el pienso fue de $1,0 \times 10^6$ ufc/g. Mientras tanto, como control, se esterilizó un medio de leche desnatada en polvo al 10% que contenía extracto de levadura al 0,03% a 121°C durante 15 minutos y se liofilizó después sin inocular bacterias como leche no fermentada y se preparó un pienso con una composición mostrada en la Tabla 2.

60

65

ES 2 355 064 T3

TABLA 2

Composición de pienso suministrado a animales (%)

	Oligosacárido	No añadido	Añadido
5	Caseína	19,66	19,66
	Aceite de maíz	5	5
10	Mezcla de vitaminas (AIN-93G)	1	1
	Mezcla mineral (AIN-93G)	3,5	3,5
	Bitartrato de colina	0,2	0,2
15	Sacarosa	14,34	11,84
	Almidón de maíz α	50	50
	Celulosa	5	5
20	DL-metionina	0,3	0,3
	Leche fermentada o leche no fermentada	1	1
	Galactooligosacárido	0	2,5

25 Posteriormente, después de una semana de cría preliminar, se habituó a ratas de 8 semanas Wistar ovariectomizadas (obtenidas de Japan SLC) o ratas de simulación a dieta purificada AIN-93G durante una semana y se dividieron en los grupos experimentales mostrados en la Tabla 3 dependiendo del peso corporal.

TABLA 3

Grupos experimentales

	Animales	Leche	Galactooligosacárido (%)	Nº de animales
35	Simulado	SM	0	4
	OVX	SM	0	5
40	OVX	FSM	0	5
	OVX	SM	2,5	5
	OVX	FSM	2,5	5

45 Simulado: animales a los que se sometió a operación simulada, OVX: animales a los que se sometió a ovariectomía, SM: leche no fermentada, FSM: leche fermentada

50 Se crió a las ratas agrupadas de este modo en jaulas de abrazadera individuales usando los piensos de ensayo a temperatura ambiente de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ y humedad de $55 \pm 5\%$ con el pienso correspondiente a cada grupo y agua disponible a voluntad durante 34 días. La toma diaria de células viables fue de aproximadamente 10^7 ufc/animal.

55 Se anestesió a los animales con Nembutal. Se retiró la comida durante 4 horas antes de la muerte. Se recogió sangre de la aorta ventral y se recogió el hígado en reflujo. El hígado se almacenó a -20°C antes de su análisis y la sangre se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos para separar el plasma. Después de la liofilización, se extrajo el hígado mediante el método de Folch (J. Biol. Chem. 226, 497-509, 1957).

60 Los niveles de colesterol y triglicéridos totales contenidos en el extracto de plasma e hígado obtenidos de este modo se obtuvieron usando Determiner TC555 (Kyowa Medics, Co., Ltd) y ensayo E de triglicéridos Wako (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.), respectivamente. Además, el nivel de colesterol HDL contenido en plasma se obtuvo usando el ensayo E de colesterol HDL Wako (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.). Además, el nivel de colesterol VLDL + LDL contenido en plasma se obtuvo deduciendo el nivel de colesterol HDL del nivel de colesterol total.

65 Basándose en los resultados obtenidos, se obtuvo el p valor para el grupo de ovariectomía mediante análisis de varianza de dos vías. Además, se realizó un ensayo de t entre las ratas ovariectomizadas y las ratas de simulación, ambas de las cuales recibieron el mismo pienso. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4 a 6. Los valores se expresaron con media más \pm DT. En las Tablas 4 a 6 el término "interacción" significa una interacción entre leche fermentada y galacto-oligosacárido.

[Tabla 4]
Efecto de leche fermentada preparada usando *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* YIT 10393 en el crecimiento

	Grupo simulado con leche no fermentada sin oligosacáridos	Grupo de ovariectomía						Resultado de análisis de varianza (p<)			
		Leche no fermentada			Leche fermentada			Leche fermentada	Oligosacárido	Interacción	
		Sin oligosacárido	Con oligosacárido	Con oligosacárido	Sin oligosacárido	Con oligosacárido					
Peso corporal inicial (g)	157±6	182±7***	182±6	182±6	183±6	182±8	NS	NS	NS		
Peso corporal final (g)	185±6	235±13***	233±8	233±8	234±14	232±5	NS	NS	NS		
Aumento en peso corporal (g)	28±2	53±6***	52±6	52±6	52±10	50±7	NS	NS	NS		
Cantidad de alimento ingerido (g/34 días)	372±19	454±37**	433±24	433±24	452±35	425±11	NS	NS	NS		

** , ***: Se observó una diferencia significativa entre el grupo simulado/leche no fermentada/sin oligosacárido y el grupo de ovariectomía/leche no fermentada/sin oligosacárido a un nivel de significación de 0,01 ó 0,001. NS: no significativo

Como se muestra en la Tabla 4, las ratas ovariectomizadas tenían un mayor peso corporal e ingirieron más comida en comparación con el grupo simulado, como se ha indicado anteriormente (J. comp. Physiol. Physicol 88: 183-193, 1975). Sin embargo, no se observaron efectos de la presencia o ausencia de oligosacárido o administración de leche fermentada en el grupo de ovariectomía y los animales crecieron favorablemente.

[Tabla 5]
Efecto de leche fermentada preparada usando *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* YIT 10393 en lípidos en sangre

Grupo simulado con leche no fermentada sin oligosacáridos	Grupo de ovariectomía						Resultado de análisis de varianza (p<)		
	Leche no fermentada			Leche fermentada			Leche fermentada	Oligosacárido	Interacción
	Sin oligosacárido	Con oligosacárido	Con oligosacárido	Sin oligosacárido	Con oligosacárido	Con oligosacárido			
TC	101,7±3,7	134,7±8,6*	145,7±25,5	124,5±17,7	120,3±10,3	0,05	NS	NS	
TG	54,9±11,9	77,1±15,0	74,4±35,3	58,5±17,6	50,5±9,4	0,05	NS	NS	
HDL-C	67,5±5,3	90,0±15,0*	91,3±16,7	101,3±16,8	100,3±7,1	NS	NS	NS	
VLDL+LDL+C	34,0±4,2	44,7±11,2	54,4±9,6	23,2±13,8	20,1±11,9	0,0001	NS	NS	
IA	0,507±0,096	0,521±0,197	0,598±0,061	0,241±0,178	0,204±0,124	0,001	NS	NS	

*: se observó una diferencia significativa entre el grupo simulado/leche no fermentada/sin oligosacárido y el grupo de ovariectomía/leche no fermentada/sin oligosacárido a un nivel de significación de 0,05.
 TC, colesterol total (mg/dl); TG, triglicéridos (mg/dl); HDL-C, colesterol HDL (mg/dl); colestero VLDL+LDL-C, VLDL+LDL (mg/dl); IA, índice de arterioesclerosis (VLDL+LDL-C/HDL-C)
 NE: no significativo

ES 2 355 064 T3

Además, como se muestra en la Tabla 5, se observaron efectos de leche fermentada preparada usando *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* YIT 10393 en colesterol, triglicéridos, colesterol VLDL+LDL en sangre y el índice de arterioesclerosis y todos estos parámetros disminuyeron. En particular, el nivel de colesterol VLDL+LDL disminuyó notablemente. Además, aunque los efectos de los oligosacáridos en estos parámetros y una interacción entre leche fermentada y oligosacárido no eran estadísticamente significativos, los niveles de colesterol, triglicéridos y colesterol VLDL+LDL totales en sangre y el índice de arterioesclerosis fueron menores en los animales tratados con oligosacáridos y leche fermentada. Se sabe que se utiliza galactooligosacárido específicamente por las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium*. Por lo tanto, se demostró que *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* YIT 10393 crece en el tracto intestinal y disminuye los niveles de lípido en sangre de forma eficaz mediante la administración de leche fermentada que contiene galactooligosacárido. Además, se sabe que el colesterol en sangre total se eleva después de una ovariectomía y un animal que ha experimentado una ovariectomía es útil como un modelo de hiperlipidemia postmenopáusica. La comparación de datos del grupo de ovariectomía/leche no fermentada/sin oligosacárido y el grupo simulado mostró que la ovariectomía en este ensayo había sido exitosa.

15

(Tabla pasa a página siguiente)

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

[Tabla 6]
 Efecto de leche fermentada preparada usando *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* YIT 10393 en lípidos hepáticos

	Grupo simulado con leche no fermentada sin oligosacáridos	Grupo de ovariectomía				Resultado de análisis de varianza (p<)		
		Leche no fermentada		Leche fermentada		Leche fermentada	oligosacárido	interacción
		Sin oligosacárido	Con oligosacárido	Sin oligosacárido	Con oligosacárido			
Peso del hígado (g)	6,5±0,6	7,9±0,8*	7,5±0,7	7,6±1,0	7,3±0,5	NS	NS	NS
Colesterol total (mg/g)	7,4±0,8	7,1±0,3	7,0±0,4	7,3±0,4	7,3±0,4	NS	NS	NS
Colesterol total (mg/hígado)	13,6±1,6	16,6±1,4*	16,0±1,3	16,0±2,6	15,4±0,43	NS	NS	NS
Triglicéidos (mg/g)	72,1±12,7	137,7±26,5**	138,4±28,8	117,7±29,0	103,3±11,1	0,05	NS	NS
Triglicéidos (mg/hígado)	132,4±23,8	325,8±80,3**	319,1±97,7	268,4±113,9	220,4±29,6	NS	NS	NS

*, **: se observó una diferencia significativa entre el grupo simulado/leche no fermentada/sin oligosacárido y el grupo de ovariectomía/leche no fermentada/sin oligosacárido a un nivel de significación de 0,05 ó 0,001; NS: no significativo

ES 2 355 064 T3

Como se muestra en la Tabla 6, el contenido de colesterol en el hígado no se vio afectado por la presencia de oligosacárido o administración de leche fermentada y los lípidos no se acumularon en el hígado. No se observó una significación estadística en el nivel de triglicéridos por hígado después de la administración de leche fermentada, pero el contenido de triglicéridos por gramo de hígado disminuyó.

Puesto que la leche fermentada preparada usando *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* YIT 10393 disminuyó el colesterol total, los triglicéridos y los niveles de colesterol VLDL+LDL en sangre y el índice de arterioesclerosis como se ha mostrado anteriormente, se descubrió que esta bacteria tiene una capacidad de mejora del metabolismo lipídico no sólo para el colesterol sino para diversos lípidos de la sangre y un efecto de disminución del riesgo de desarrollo de arterioesclerosis.

Ejemplo de Ensayo 3

Examen de la capacidad de supervivencia en leche fermentada

Se añadió extracto de levadura al 0,03% a una solución de leche desnatada en polvo al 10% y se esterilizó la mezcla, se inoculó cada una de las bacterias (*Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* JCM 1253, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* JCM 7117 y *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* YIT 10392, *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* YIT 10393) al 2% y se cultivaron a 37°C con pH 5,1 ± 1,0, se produjeron 5 tipos de leche fermentada. Además, como control, se produjo una leche fermentada de la misma manera usando *Bifidobacterium longum* ATCC 15707.

Se vertieron 10 ml de cada una de las leches fermentadas preparadas en un tubo de ensayo de vidrio para almacenamiento anaeróbico y un tubo de polipropileno para almacenamiento no anaeróbico (aeróbico) y se almacenó a 10°C durante 12 semanas. Para el almacenamiento anaeróbico, se cerró estrechamente el tubo de ensayo con un tapón de goma de butilo en un flujo de gas de nitrógeno. Para almacenamiento no anaeróbico, la tapa del tubo de polipropileno se cerró sin apretar. La Tabla 7 muestra pH y conteo de células viables después de la compleción del cultivo. La Tabla 8 muestra cambios en el conteo de células bacterianas en almacenamiento no anaeróbico. La Tabla 9 muestra cambios en el conteo de células bacterianas en el almacenamiento anaeróbico.

TABLA 7

pH y conteo de células viables de cada bacteria tras la compleción de cultivo			
	pH	Conteo de células viables (ufc/ml)	Tiempo de cultivo (h)
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> YIT 10394	5,06	9,1 x 10 ⁸	27
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 1253 *	5,13	5,9 x 10 ⁸	30
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 7117 *	5,19	1,4 x 10 ⁹	30
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> YIT 10392	5,19	3,4 x 10 ⁸	30
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> YIT 10393	5,14	6,2 x 10 ⁸	30
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	5,01	3,3 x 10 ⁸	27
* Referencia			

ES 2 355 064 T3

TABLA 8

Cambios en conteo de células viables de cada bacteria en leche fermentada en almacenamiento a 10°C en condiciones no anaeróbicas (aeróbicas)				
	Tras compleción del cultivo	Después de 3 semanas	Después de 8 semanas	Después de 12 semanas
<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>subsp. animalis</i> YIT 10394	$9,1 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$	$4,1 \times 10^6$
<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>subsp. lactis</i> JCM 1253 *	$5,9 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$
<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>subsp. lactis</i> JCM 7117 *	$1,4 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$7,0 \times 10^8$
<i>Bifidobacterium</i> <i>pseudolongum subsp.</i> <i>globosum</i> YIT 10392	$3,4 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$7,6 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
<i>Bifidobacterium</i> <i>pseudolongum subsp.</i> <i>globosum</i> YIT 10393	$6,2 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$	$3,9 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	$3,3 \times 10^8$	$9,2 \times 10^3$	-	-
- : no detectado * Referencia				

ES 2 355 064 T3

TABLA 9

Cambios en conteo de células viables de cada bacteria en leche fermentada en almacenamiento a 10°C en condiciones anaeróbicas			
	Tras compleción del cultivo	Después de 3 semanas	Después de 12 semanas
<i>Bifidobacterium animalis subsp. animalis</i> YIT 10394	$9,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$4,7 \times 10^8$
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> JCM 1253 *	$5,9 \times 10^8$	$5,9 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> JCM 7117 *	$1,4 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
<i>Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum</i> YIT 10392	$3,4 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
<i>Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum</i> YIT 10393	$6,2 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	$3,3 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$	$4,2 \times 10^6$
*Referencia			

Como se muestra en la Tabla 8, después de 3 semanas de almacenamiento en condiciones no anaeróbicas (aeróbicas), *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 usado como control disminuyó a $9,2 \times 10^3$ ufc/ml y no se detectó después de 8 semanas. Por otro lado, ninguna cepa bacteriana de la presente invención disminuyó por debajo de 1×10^8 ufc/ml incluso después de 3 semanas de almacenamiento y la tasa de supervivencia fue del 50% o mayor en comparación con el conteo celular tras la compleción del cultivo. Además, después de 12 semanas de almacenamiento, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253 y *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 no estaban por debajo de 1×10^8 ufc/ml y las tres cepas bacterianas restantes (*Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392, *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 y *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394) disminuyeron sólo aproximadamente de uno a dos órdenes.

Como se muestra en la Tabla 9, después de 3 semanas de almacenamiento en condiciones anaeróbicas, el conteo de células bacterianas de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 disminuyó a aproximadamente 1/10. Sin embargo, los conteos de células bacterianas de las bacterias *Bifidobacterium* de la presente invención tras la compleción del cultivo virtualmente se mantuvieron. Los conteos de células bacterianas de *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392, *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 y *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394 disminuyeron sólo hasta aproximadamente 1/2 a 1/6 después de almacenamiento durante 12 semanas y los conteos de células bacterianas de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253 y *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 permanecieron virtualmente sin cambios incluso después de 12 semanas.

ES 2 355 064 T3

Ejemplo de Prescripción 1

Producción de comprimido

5 Diversos componentes se mezclaron, granularon, secaron y seleccionaron por tamaño de acuerdo con la siguiente prescripción y se comprimieron para producir un comprimido.

	(Prescripción)	(mg)
10	Células bacterianas secas de la bacteria de la presente invención ¹⁾	20
	Celulosa microcristalina	100
15	Lactosa	80
	Estearato de magnesio	0,5
	Metilcelulosa	12
20	<hr/> ¹⁾ : obtenida por liofilización de células viables de <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> YIT 10392 <hr/>	

Ejemplo de Prescripción 2

25

Producción de bebida de leche fermentada

30 Se añadió glucosa al 3% a solución de leche desnatada en polvo al 15%, se esterilizó la mezcla y se inoculó *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* YIT 10392 al 1% y se cultivó de forma anaeróbica a 35°C durante 24 horas para obtener 210 g de base de leche fermentada. Mientras tanto, se disolvieron 97 g de azúcar y 0,2 g de hierro emulsionado en agua para preparar 790 g como la cantidad total y se esterizaron para obtener un jarabe. La base de leche fermentada y el jarabe obtenido como se ha descrito anteriormente se mezclaron, seguido de la adición de 1 g de saborífero, se homogeneizó a 15 Mpa y se introdujeron en un envase para obtener una bebida de leche fermentada. La bebida de leche fermentada obtenida era favorable tanto en apariencia como en sabor y el conteo de células viables inmediateamente después de la producción fue de $2,5 \times 10^8$ ufc/ml. Además, la estabilidad de almacenamiento también era favorable, siendo el conteo de células viables después de almacenamiento a 10°C durante 21 días de $1,4 \times 10^8$ ufc/ml.

Ejemplo de Prescripción 3

Producción de refresco

45 Se mezclaron los componentes de la siguiente prescripción y se homogeneizaron por un método habitual para obtener un refresco. El refresco obtenido se introdujo en una botella marrón, se selló con un tapón de aluminio y se sometió a tratamiento por calor. El refresco obtenido era favorable tanto en apariencia como en sabor y la estabilidad de almacenamiento también era favorable.

	(Prescripción)	(g)
50	Células bacterianas secas de la bacteria de la presente invención ¹⁾	5
	Saborífero	0,8
55	Agua	100
	Almidón reducido glucosilado	24
	Fructosa	18
60	<hr/> ¹⁾ : obtenidas por liofilización de células viables de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> YIT 10394 <hr/>	

65

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo seleccionado de *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394 (FERM BP-10662),
5 *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 (FERM BP-10660) y *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 (FERM BP-10661).
2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en la disminución de los niveles de coleste-
10 roles, triglicéridos y colesterolos VLDL y LDL en sangre y el índice de arterioesclerosis, la mejora del metabolismo de lípidos incluyendo elevar el colesterol HDL, mejorar la hiperlipidemia o disminuir un riesgo de desarrollar arte-
riosclerosis.
3. Un inhibidor de absorción de colesterol que comprende, como un principio activo, al menos un microorganismo
15 como se define en la reivindicación 1.
4. El inhibidor de absorción de colesterol de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el microorganismo contenido
en el inhibidor de absorción de colesterol se liofiliza o se utiliza como un cultivo que contiene el microorganismo.
5. El inhibidor de absorción de colesterol de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, que es una formulación far-
20 macológica seleccionada de un comprimido, granulo, polvo, cápsula, solución, suspensión, emulsión y formulación liofilizada.
6. El inhibidor de absorción de colesterol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que com-
25 prende el microorganismo en el estado de células viables.
7. El inhibidor de absorción de colesterol de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, que es una comida o bebida
seleccionada de leche fermentada, leche de soja fermentada, zumo de fruta fermentado, zumo vegetal fermentado,
zumo de arroz fermentado, coliflor fermentada y comidas y bebidas fermentadas que usan materiales derivados de
30 animales o plantas, que comprende el microorganismo en el estado de células viables.
8. El inhibidor de absorción de colesterol de acuerdo con la reivindicación 7, que está envasado en un envase hecho
de resinas permeables a oxígeno seleccionadas de poliestireno, polietileno y tereftalato de polietileno.
9. El inhibidor de absorción de colesterol de acuerdo con la reivindicación 7, que tiene un pH ácido a 25°C de 2 a
35 7.
10. El inhibidor de absorción de colesterol de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en el que la dosis de las bacterias
es de 10^5 a 10^{13} ufc por día como un conteo de células viables.
- 40 11. Uso de un microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 para preparar un inhibidor de absorción de
colesterol.

45

50

55

60

65