

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 990 032**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747 (2015.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A61K 36/48 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
C12R 1/24 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2016 PCT/KR2016/009994**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17047968**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2016 E 16846789 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 3351617**

54 Título: **Nueva cepa de Lactobacillus plantarum con diversas funciones relevantes para la salud y composiciones para su uso que comprenden dicha cepa**

30 Prioridad:

15.09.2015 KR 20150130124
15.01.2016 KR 20160005018

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITY - INDUSTRY COOPERATIONGROUP
OF KYUNG HEE UNIVERSITY (50.0%)
1732 Deogyong-daeroGiheung-gu
Yongin-si, Gyeonggi-do 17104, KR y
NAVIPHARM CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KIM, DONG HYUN y
HAN, MYUNG JOO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 990 032 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

Nueva cepa de *Lactobacillus plantarum* con diversas funciones relevantes para la salud y composiciones para su uso que comprenden dicha cepa

[Campo técnico de la invención]

La presente invención se refiere a nuevas bacterias del ácido láctico y similares, y más particularmente a nuevas bacterias del ácido láctico o nuevas mezclas de bacterias del ácido láctico, que se aíslan del kimchi o de las heces humanas y tienen diversas actividades fisiológicas, tales como la actividad antioxidante, la actividad inhibidora de la β -glucuronidasa, la actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS), o la actividad inductora de la expresión de la proteína de unión estrecha. Además, la presente invención se refiere a diversos usos alimentarios y medicinales de nuevas bacterias del ácido láctico o nuevas mezclas de bacterias del ácido láctico.

[Antecedentes de la invención]

A medida que la humanidad se ha ido convirtiendo en una sociedad próspera, el estilo de vida se ha occidentalizado rápidamente y el patrón de las enfermedades también ha cambiado drásticamente. En particular, en la gente moderna, la alteración de la flora intestinal, el síndrome de permeabilidad intestinal, la colitis, las enfermedades hepáticas, las enfermedades alérgicas, la obesidad y similares están aumentando debido a los hábitos alimentarios occidentalizados basados en la carne y la grasa, las comidas irregulares, el consumo excesivo de alcohol, la falta de ejercicio, el estrés excesivo, la exposición a ambientes nocivos y similares.

Alteración de la flora intestinal

Hay muchas bacterias que viven en el tracto gastrointestinal del cuerpo humano. El cuerpo humano tiene aproximadamente 10 billones de células normales, pero tiene unos 10 billones de bacterias que son aproximadamente 10 veces más grandes que las células normales. Estas bacterias pueden dividirse en bacterias beneficiosas que ayudan a la salud intestinal humana y bacterias nocivas que son perjudiciales para la salud humana. La salud del cuerpo humano puede mantenerse cuando las bacterias beneficiosas, tales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* y similares son más dominantes en el tracto gastrointestinal que las bacterias perjudiciales. De lo contrario, se pueden provocar enfermedades tales como la obesidad, el síndrome de permeabilidad intestinal, enfermedades hepáticas, envejecimiento acelerado, enteritis y similares.

Síndrome de permeabilidad intestinal

El tracto gastrointestinal del cuerpo humano está compuesto por mucosidad y vellosidades, que absorben eficazmente los componentes nutritivos, pero impiden la absorción de microorganismos patógenos de elevado peso molecular o de toxinas producidas por estos microorganismos. Además, el cuerpo humano dispone de un sistema inmune capaz de protegerlo de la invasión de antígenos externos de elevado peso molecular. Sin embargo, debido a la infección con muchos microorganismos patógenos o toxinas, el estrés excesivo, la ingesta de alimentos, tales como las dietas ricas en grasas capaces de proliferar la vida bacteriana nociva en el tracto gastrointestinal, la ingesta excesiva de alcohol, el abuso de fármacos (por ejemplo, antibióticos) y similares, la flora intestinal se ve alterada, se producen anomalías en el sistema inmune del tracto gastrointestinal y se inhibe la expresión de las proteínas de la unión estrecha. Si se inhibe la expresión de las proteínas de la unión estrecha, la unión estrecha de la mucosa intestinal se afloja y se produce la invasión *in vivo* de grandes moléculas debido al hueco aflojado y anomalías en el sistema inmune. El síndrome de permeabilidad intestinal también se conoce como síndrome del intestino permeable, y se refiere a una afección en la que elementos externos, tales como alimentos menos digeridos, microorganismos patógenos, toxinas o similares se introducen continuamente en la sangre, debido a que el sistema de barrera de unión hermética de las células epiteliales que forman el tracto gastrointestinal no funciona correctamente. Cuando se produce el síndrome de permeabilidad intestinal, entran en el organismo antígenos externos que generalmente no se absorben, lo que provoca colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, lesiones hepáticas, disfunción hepática, enfermedades alérgicas (incluyendo el asma), atopia, enfermedades autoinmunes, esteatorrea, trastorno de la absorción digestiva, acné, envejecimiento acelerado, endotoxemia, infección intestinal, eczema, síndrome del intestino irritable, síndrome de fatiga crónica, psoriasis, artritis reumatoide, insuficiencia pancreática, enfermedades inflamatorias de las articulaciones o similares.

Colitis

Aunque anteriormente se sabía que la incidencia de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn es alta en los europeos, el número de pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn en los países orientales, incluyendo Corea, ha aumentado rápidamente en los últimos tiempos debido a los cambios en los estilos de vida, tales como los hábitos alimentarios. Sin embargo, la causa no está clara, por lo que aún no se ha establecido un método de tratamiento fundamental para estas enfermedades. Por este motivo, se utilizan fármacos que no pretenden tratar por completo, sino aliviar los síntomas y mantener este estado de alivio durante el mayor tiempo posible. Como

fármacos para esta terapia sintomática, se utilizan principalmente agentes de ácido aminosalicílico, agentes adrenocorticosteroides, inmunosupresores y similares, pero se ha informado de que causan diversos efectos secundarios. Por ejemplo, se ha informado de que la salazosulfapiridina, que se utiliza con frecuencia como agente del ácido aminosalicílico, causa efectos secundarios, incluyendo náuseas, vómitos, anorexia, erupción cutánea, dolor de cabeza, lesión hepática, leucocitopenia, eritrocitos anormales, proteinuria, diarrea y similares. Además, los agentes adrenocorticosteroides se utilizan generalmente mediante la administración oral de prednisolona, infusión, supositorio, inyección intravenosa o similares, pero causan fuertes efectos secundarios, tales como úlcera gástrica o necrosis femoral en caso de uso prolongado. Sin embargo, la interrupción de los medicamentos puede hacer que reaparezcan los síntomas, por lo que estos fármacos deben utilizarse de forma continua. En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar agentes para el tratamiento de enfermedades intestinales, tales como la colitis ulcerosa, las enfermedades de Crohn y similares, que tengan efectos excelentes, sean seguros y no causen efectos secundarios. El síndrome del intestino irritable (SII) también es una enfermedad abdominal crónica cuya causa no está clara. En la actualidad, no existe ningún agente terapéutico fundamental para el SII, y la terapia sintomática se lleva a cabo con el fin de aliviar los síntomas de cada tipo de SII. Por ejemplo, para el SII de tipo diarreico se utiliza un agente anticolinérgico con acción antipirética que suprime la contracción de los músculos lisos, y para el SII de tipo estreñimiento se utilizan laxantes salinos. Para el SII de tipo hábito deposicional mixto difícil de controlar con fármacos, se utiliza fundamentalmente un agente para mejorar la función motora gastrointestinal.

Enfermedades hepáticas

En el cuerpo humano, el hígado desempeña funciones tales como el metabolismo energético (tratamiento y almacenamiento de nutrientes y excreción de residuos), la desintoxicación de toxinas, la síntesis de proteínas séricas y la absorción suave de grasas en el intestino mediante la secreción de jugos biliares, y también es importante en el mantenimiento de la inmunidad (defensa del organismo) y el metabolismo de las vitaminas. Sin embargo, la infección por virus de la hepatitis o la ingesta excesiva de alcohol o de comidas ricas en grasas pueden provocar enfermedades hepáticas, tales como la hepatitis o la cirrosis hepática. Además, las enfermedades hepáticas también pueden estar causadas por fármacos (medicamentos terapéuticos contra la tuberculosis, aspirina, antibióticos, anestésicos, antihipertensivos, anticonceptivos orales, etc.), trastornos metabólicos congénitos, insuficiencia cardíaca, shock o similares. Cuando se produce una enfermedad hepática, puede convertirse en una hepatitis crónica, empezando por una hepatitis aguda con fatiga, vómitos, diarrea, anorexia, ictericia, dolor en el cuadrante superior derecho, fiebre o dolor muscular.

Enfermedades alérgicas

A medida que la sociedad se ha ido complicando y la industria y la civilización se han desarrollado, la contaminación ambiental y el estrés han aumentado, y como los hábitos alimentarios han cambiado, los pacientes con enfermedades alérgicas han aumentado cada año. Los pacientes con enfermedades alérgicas, tales como atopía, anafilaxis, asma y similares eran menos del 1 % en 1980, pero aumentaron rápidamente hasta el 5 % o más en la década de 2000, y se calcula que son más del 10 %, incluyendo los pacientes potenciales. Las enfermedades alérgicas están causadas por respuestas inmunes excesivas de un organismo vivo, que son el resultado de reacciones antígeno-anticuerpo, y las enfermedades alérgicas se clasifican en los tipos 1 a 4 de reacciones de hipersensibilidad en función del tiempo de respuesta y de si intervienen o no los complementos. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo 1 incluyen atopía, shock anafiláctico, asma bronquial, urticaria, polinosis y similares; las reacciones de hipersensibilidad de tipo 2 incluyen transfusión inadecuada, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica causada por fármacos, granulocitopenia, púrpura trombocitopénica y similares; las reacciones de hipersensibilidad de tipo 4 incluyen eritema, inflamación linfática, artralgia, artritis, nefritis, glomerulonefritis aguda tras una infección estreptocócica y similares; y las reacciones de hipersensibilidad de tipo 4 incluyen inflamación crónica y similares. Para mejorar las enfermedades alérgicas, es preferible eliminar los alérgenos (polvo doméstico, ácaros, etc.) de la piel duchándose o bañándose y evitar la ingesta de alérgenos. Sin embargo, cuando las enfermedades alérgicas no mejoran, se utilizan fármacos, tales como esteroides, antihistamínicos, inmunosupresores o similares, que provocan fácilmente efectos secundarios, tales como atrofia cutánea, vasodilatación, decoloración, púrpura (esteroides), somnolencia (antihistamínicos), insuficiencia renal (inmunosupresores) y similares. Entre los fármacos desarrollados hasta ahora, no hay ninguno que pueda curar completamente las alergias, y se espera que estos fármacos mejoren los síntomas, pero tienen el problema de causar importantes efectos secundarios.

Obesidad

La obesidad es un trastorno metabólico provocado por el desequilibrio entre la ingesta y el consumo de calorías, y está causada por el aumento del tamaño (hipertrofia) o del número (hiperplasia) de los adipocitos *in vivo* en términos morfológicos. La obesidad no sólo es el trastorno de malnutrición más común en la sociedad occidental, sino que la prevalencia de la obesidad en Corea también está aumentando rápidamente debido a la mejora de los hábitos alimentarios y a la occidentalización de los estilos de vida. Por ello, se ha hecho mucho hincapié en la importancia del tratamiento y la prevención de la obesidad. La obesidad es un factor importante que perturba al individuo en términos psicológicos y también aumenta el riesgo de padecer diversas enfermedades de adultos en

términos sociales. Se sabe que la obesidad está directamente relacionada con el aumento de la prevalencia de diversas enfermedades del adulto, tales como diabetes de tipo 2, hipertensión, hiperlipidemia, enfermedades cardíacas y similares (Cell 87:377, 1999), y las enfermedades relacionadas con la obesidad se denominan colectivamente síndrome metabólico o síndrome de resistencia a la insulina, y se ha informado de que estas enfermedades causan arteriosclerosis y enfermedades cardiovasculares. Los agentes terapéuticos para la obesidad conocidos hasta ahora incluyen Xenical (Roche Pharmaceuticals, Suiza), Reductil (Evothe, Abbott, EE. UU.), Exolise (Arkopharma, Francia) y similares, y se clasifican en gran medida en supresores del apetito, promotores del gasto energético e inhibidores de la absorción de grasas. La mayoría de los agentes terapéuticos contra la obesidad son supresores del apetito que lo suprimen controlando los neurotransmisores asociados al hipotálamo. Sin embargo, los agentes terapéuticos convencionales provocan efectos secundarios, tales como enfermedades cardíacas, respiratorias, neurológicas y similares, y la persistencia de sus efectos también es baja. Por ello, es necesario desarrollar mejores agentes terapéuticos contra la obesidad. Además, entre los productos desarrollados actualmente, hay pocos o ningún agente terapéutico que tenga un efecto terapéutico satisfactorio sin causar efectos secundarios, por lo que se requiere el desarrollo de un nuevo agente terapéutico para la obesidad.

Los probióticos se denominan colectivamente microorganismos vivos que mejoran el entorno microbiano del hospedero en el tracto gastrointestinal de los animales, incluyendo los seres humanos, y tienen efectos beneficiosos para la salud del hospedero. Para ser eficaces como probióticos, es necesario que tengan una excelente resistencia a los ácidos, resistencia a la bilis y adherencia a las células epiteliales, ya que la mayoría de estos probióticos deben llegar al intestino delgado tras su administración oral y deben adherirse a la superficie intestinal. Las bacterias del ácido láctico se utilizan como probióticos porque desempeñan un papel en la descomposición de las proteínas fibrosas y complejas para producir nutrientes importantes mientras viven en el sistema digestivo del cuerpo humano. Se ha informado de que las bacterias del ácido láctico presentan efectos como el mantenimiento de la flora intestinal normal, la mejora de la flora intestinal, efectos antidiabéticos y antihiperlipidémicos, inhibición de la carcinogénesis, inhibición de la colitis y actividad inespecífica del sistema inmune del hospedero. Entre estas bacterias del ácido láctico, las cepas de *Lactobacillus* sp. son miembros principales de las comunidades microbianas normales que viven en el intestino del cuerpo humano y se sabe desde hace tiempo que son importantes para mantener un tracto digestivo y un entorno vaginal sanos. En la actualidad, de acuerdo con las directrices del Servicio de Salud Pública de EE. UU., todas las cepas de *Lactobacillus* depositadas en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) están clasificadas como de "nivel de bioseguridad 1", que se reconoce como sin riesgo potencial conocido de causar enfermedades en humanos o animales. Mientras tanto, se ha informado de que las bacterias del ácido láctico del kimchi que intervienen en la fermentación del kimchi tienen efectos potenciadores del sistema inmune, efectos antimicrobianos, efectos antioxidantes, efectos anticancerígenos, efectos antiobesidad, efectos preventivos de la hipertensión o efectos preventivos del estreñimiento [Hivak P, Odrska J, Ferencik M, Ebringer L, Jahnova E, Mikes Z. : One-year application of Probiotic strain Enterococcus faecium M-74 decreases Serum cholesterol levels. : Bratisl lek Listy 2005; 106(2): 67-72; Agerholm-Larsen L. Bell ML. Grunwald GK. Astrup A. : The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol : a metaanalysis of short-term intervention studies ; Eur J Clin Nutr. 2000; 54(11) 856-860; Renato Sousa, Jaroslava Helper, Jian Zhang, Stephen J Lewis y Wani O Li ; Effect of Lactobacillus acidophilus supernants on body weight and leptin expression in rats; BMC complementary and alternative medicine. 2008; 8(5)1-8].

Dado que se conocían diversas actividades bioactivas de las bacterias del ácido láctico, recientemente se han llevado a cabo estudios para desarrollar cepas de bacterias del ácido láctico que tengan excelentes funcionalidades y que a la vez sean seguras para el ser humano, y para aplicar estas cepas a medicamentos o alimentos funcionales. Por ejemplo, la publicación de solicitud de patente coreana No. 10-2009-0116051 divulga *Lactobacillus brevis* HY7401 con efectos de tratamiento y prevención de la colitis. Además, la publicación de solicitud de patente coreana No. 10-2006-0119045 divulga una bacteria del ácido láctico para prevenir o tratar la dermatitis atópica, que se selecciona del grupo que consiste en *Leuconostoc citreum* KACC91035, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3100 y *Lactobacillus brevis* KCTC 3498. Además, la publicación de solicitud de patente coreana No. 10-2013-0092182 divulga un alimento saludable funcional para prevenir la enfermedad hepática alcohólica o aliviar la resaca, que contiene *Lactobacillus brevis* HD-01 (número de acceso: KACC91701P) con una excelente capacidad para descomponer el alcohol. Además, la publicación de solicitud de patente coreana No. 10-2010-0010015 divulga una cepa de *Lactobacillus johnsonii* HFI 108 (KCTC 11356BP) con actividades reductoras del colesterol sanguíneo y contra la obesidad. Además, la publicación de solicitud de patente coreana No. 10-2014-0006509 divulga una composición para prevenir o tratar la obesidad, que contiene, como un principio activo, una cepa de *Bifidobacterium longum* CGB-C11 (número de acceso: KCTC 11979BP) que produce ácido linoleico conjugado.

WO2008/157728 divulga una composición que comprende un compuesto aislado, soluble, antiinflamatorio y citoprotector derivado de *Lactobacillus plantarum*, en donde el compuesto induce la expresión de la proteína de choque térmico, el compuesto es un inhibidor de la activación de NF- κ B y es un inhibidor del proteasoma. Se sugiere utilizar el compuesto en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

R. Sultana et al, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 79, No. 16, p. 4887-4894 divulga que el lisado de *Lactobacillus plantarum* ATCC 10241 podría mejorar la función de barrera de unión estrecha en queratinocitos

epidérmicos primarios humanos.

Sin embargo, no se ha informado de ninguna tecnología relacionada con las bacterias del ácido láctico capaz de aliviar o tratar todas las alteraciones de la flora intestinal, el síndrome de permeabilidad intestinal, la colitis, las enfermedades hepáticas, las enfermedades alérgicas, la obesidad y similares, que están aumentando en los humanos modernos. Por lo tanto, existe la necesidad de cribar una cepa nueva que tenga diversas funcionalidades y de desarrollar medicamentos, alimentos funcionales y similares mediante el uso de esta cepa.

[Divulgación]

[Problema técnico]

La presente invención se ha realizado en el marco de los antecedentes de la invención descrito anteriormente, y es objeto de la presente invención proporcionar nuevas bacterias del ácido láctico que tengan diversas actividades fisiológicas o funcionalidades necesarias para los probióticos, así como los usos alimentarios y medicinales de las mismas.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una novedosa mezcla de bacterias del ácido láctico capaz de mostrar diversas actividades o funcionalidades fisiológicas maximizadas, así como los usos alimentarios y medicinales de la misma.

[Solución técnica]

Los presentes inventores han examinado numerosas bacterias del ácido láctico procedentes del kimchi o de las heces humanas, y han descubierto que, entre estas bacterias del ácido láctico examinadas, una determinada cepa de *Lactobacillus* sp., una determinada cepa de *Bifidobacterium* sp. o una mezcla de las mismas tiene un efecto excelente en la mejora de daños intestinales, tal como el síndrome de permeabilidad intestinal, lesiones hepáticas, tal como el hígado graso, enfermedades alérgicas, tal como la dermatitis atópica, o enfermedades inflamatorias, tal como la colitis, completando así la presente invención.

Para lograr los objetos anteriores, una realización de la presente invención proporciona una bacteria del ácido láctico seleccionada entre *Lactobacillus plantarum* LC27 (número de acceso: KCCM 11801P).

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende *Lactobacillus plantarum* LC27 (número de acceso: KCCM 11801P) o un cultivo de *Lactobacillus plantarum* LC27 para su uso en la prevención o el tratamiento de una o más enfermedades seleccionadas de un grupo que consiste en daños intestinales, lesiones hepáticas, enfermedades alérgicas y enfermedades inflamatorias.

En una realización, el daño intestinal es el síndrome de permeabilidad intestinal. En una realización, la lesión hepática se selecciona del grupo que consiste en hepatitis, hígado graso y cirrosis hepática. En una realización, la enfermedad alérgica se selecciona del grupo que consiste en dermatitis atópica, asma, faringitis y dermatitis crónica. En una realización, la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en gastritis, úlcera gástrica, colitis y artritis.

La composición para uso descrita anteriormente puede comprender además una o más bacterias del ácido láctico seleccionadas de un grupo que consiste en *Lactobacillus brevis* CH23 (número de acceso: KCCM 11762P), *Bifidobacterium longum* CH57 (número de acceso: KCCM 11764P), *Lactobacillus plantarum* LC5 (número de acceso: KCCM 11800P) y *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P).

La composición de uso, puede comprender además *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P), un cultivo de *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P), un lisado de *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P) o un extracto de *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P) para su uso en la prevención o el tratamiento de una o más enfermedades seleccionadas de un grupo que consiste en lesiones hepáticas, enfermedades alérgicas y enfermedades inflamatorias.

También se describe en la presente, que no está comprendida en el enunciado de las reivindicaciones, la bacteria *Lactobacillus brevis* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4, *Lactobacillus plantarum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5, o *Bifidobacterium longum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7. Las bacterias *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* o *Bifidobacterium longum* tienen actividad antioxidante, actividad inhibidora de la β -glucuronidasa, actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS) o actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha. También se describe en la presente, que no está comprendida en el enunciado de las reivindicaciones, una composición

farmacéutica para prevenir o tratar daños intestinales, lesiones hepáticas, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias u obesidad, que contiene, como un principio activo, una bacteria del ácido láctico seleccionada entre *Lactobacillus brevis* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4, *Lactobacillus plantarum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5, o *Bifidobacterium longum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7, un cultivo de la bacteria del ácido láctico, un lisado de la bacteria del ácido láctico, o un extracto de la bacteria del ácido láctico. También se describe en la presente, que no está comprendida en el enunciado de las reivindicaciones, una composición alimentaria para prevenir o aliviar daños intestinales, lesiones hepáticas, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias u obesidad, que contiene, como un principio activo, *Lactobacillus brevis* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4, *Lactobacillus plantarum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5, o *Bifidobacterium longum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7, un cultivo de la bacteria del ácido láctico, un lisado de la bacteria del ácido láctico, o un extracto de la bacteria del ácido láctico.

También se describe en la presente, que no está comprendida en el enunciado de las reivindicaciones, una mezcla de dos o más bacterias del ácido láctico seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus brevis* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4, *Lactobacillus plantarum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5, y *Bifidobacterium longum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7. La mezcla de bacterias del ácido láctico tiene actividad antioxidante, actividad inhibidora de la β -glucuronidasa, actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS) o actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha. También se describe en la presente, que no está comprendida en el enunciado de las reivindicaciones, una composición para prevenir o tratar daños intestinales, lesiones hepáticas, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias u obesidad, que contiene, como un principio activo, una mezcla de dos o más bacterias del ácido láctico seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus brevis* que comprenden una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4, *Lactobacillus plantarum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5, y *Bifidobacterium longum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7, un cultivo de la mezcla de bacterias del ácido láctico, un lisado de la mezcla de bacterias del ácido láctico, o un extracto de la mezcla de bacterias del ácido láctico. También se describe en la presente, que no está comprendida en el enunciado de las reivindicaciones, una composición alimentaria para prevenir o aliviar daños intestinales, lesiones hepáticas, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias u obesidad, que contiene, como un principio activo, una mezcla de dos o más bacterias del ácido láctico seleccionadas del grupo formado por *Lactobacillus brevis* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4, *Lactobacillus plantarum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5, y *Bifidobacterium longum* que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7, un cultivo de la mezcla de bacterias del ácido láctico, un lisado de la mezcla de bacterias del ácido láctico, o un extracto de la mezcla de bacterias del ácido láctico.

[Efectos ventajosos]

Una determinada cepa de *Lactobacillus* sp. de acuerdo con la presente invención se aísla del kimchi o de las heces humanas, por lo que es altamente segura, y tiene diversas actividades fisiológicas, tales como la actividad antioxidante, la actividad inhibidora de la β -glucuronidasa, la actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS), o la actividad inductora de la expresión de la proteína de unión estrecha. En consecuencia, una determinada cepa de *Lactobacillus* sp., o su mezcla con una determinada cepa de *Bifidobacterium* sp. según la presente invención puede utilizarse como alimento funcional o material medicinal útil para la prevención, el alivio o el tratamiento de daños intestinales, lesiones hepáticas, enfermedades alérgicas o enfermedades inflamatorias.

[Descripción de los dibujos]

La FIG. 1 es un gráfico que muestra el cambio en el valor GOT cuando se administraron bacterias del ácido láctico a animales modelo con lesión hepática inducida por D-galactosamina, en un primer experimento.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra el cambio en el valor GPT cuando se administraron bacterias del ácido láctico

a animales modelo con lesión hepática inducida por D-galactosamina, en un primer experimento.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra el cambio en el valor MDA cuando se administraron bacterias del ácido láctico a animales modelo con lesión hepática inducida por D-galactosamina, en un primer experimento.

La FIG. 4 es un gráfico que muestra el efecto de las bacterias del ácido láctico, examinadas en un primer experimento, sobre la respuesta inflamatoria de las células dendríticas inducida por lipopolisacáridos (LPS). El gráfico de la izquierda en la FIG. 4 muestra el efecto de las bacterias del ácido láctico sobre las células no tratadas con LPS (lipopolisacárido), y el gráfico de la derecha muestra el efecto de las bacterias del ácido láctico sobre las células tratadas con LPS (lipopolisacárido).

La FIG. 5 es un gráfico que muestra el efecto de *Bifidobacterium longum* CH57 sobre la respuesta inflamatoria de los macrófagos inducida por LPS (lipopolisacáridos) en un primer experimento.

La FIG. 6 muestra los resultados del análisis del efecto de *Lactobacillus brevis* CH23 sobre la diferenciación de las células T (aisladas del bazo) en células Th17 o células Treg mediante un sistema de clasificación celular activado por fluorescencia en un primer experimento.

La FIG. 7 muestra los resultados del análisis del efecto de *Lactobacillus brevis* CH23, *Bifidobacterium longum* CH57 o una mezcla de las mismas sobre la expresión de la proteína ZO-1 en células CaCO2 en un primer experimento.

La FIG. 8 muestra la apariencia del colon o la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) que indica el efecto de *Bifidobacterium longum* CH57 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un primer experimento.

La FIG. 9 representa imágenes histológicas que muestran el efecto de *Bifidobacterium longum* CH57 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un primer experimento.

La FIG. 10 muestra los niveles de citocinas relacionadas con la inflamación que indican el efecto de *Bifidobacterium longum* CH57 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un primer experimento.

La FIG. 11 muestra la apariencia del colon o la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) que indica el efecto de *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un primer experimento.

La FIG. 12 representa imágenes histológicas del colon, que muestran el efecto de *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un primer experimento.

La FIG. 13 muestra patrones de diferenciación de células T que indican el efecto de *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un primer experimento.

La FIG. 14 muestra los niveles de citocinas relacionadas con la inflamación que indican el efecto de *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un primer experimento.

La FIG. 15 muestra la apariencia del colon o la actividad mieloperoxidasa (MPO) que indica el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un primer experimento.

La FIG. 16 representa imágenes histológicas que muestran el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un primer experimento.

La FIG. 17 muestra los niveles de citocinas relacionadas con la inflamación que indican el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un primer experimento.

La FIG. 18 muestra los cambios de peso que indican el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un primer experimento.

La FIG. 19 muestra la apariencia del colon, la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), imágenes histológicas del colon y similares, que indican el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo inducidos por la obesidad, en un primer experimento.

La FIG. 20 muestra los niveles de citocinas relacionadas con la inflamación que indican el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo inducidos por la obesidad, en un primer experimento.

La FIG. 21 muestra los marcadores de respuesta inflamatoria que indican el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo inducidos por la obesidad, en un primer experimento.

5 La FIG. 22 muestra los patrones de diferenciación de las células T en células Th17, que indican el efecto de las bacterias del ácido láctico en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un segundo experimento de la presente invención.

10 La FIG. 23 muestra los patrones de diferenciación de las células T en células Treg, que indican el efecto de las bacterias del ácido láctico en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un segundo experimento de la presente invención.

15 La FIG. 24 muestra marcadores de respuesta inflamatoria que indican el efecto de las bacterias del ácido láctico en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, en un segundo experimento de la presente invención.

La FIG. 25 representa imágenes que muestran el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa estomacal de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en un segundo experimento de la presente invención.

20 La FIG. 26 muestra el puntaje bruto de la lesión gástrica que indica el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa del estómago de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en un segundo experimento de la presente invención.

25 La FIG. 27 muestra el índice de úlcera que indica el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa del estómago de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en un segundo experimento de la presente invención.

La FIG. 28 muestra el índice de actividad histológica que indica el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa estomacal de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en un segundo experimento de la presente invención.

30 La FIG. 29 muestra la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) que indica el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa del estómago de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en un segundo experimento de la presente invención.

35 La FIG. 30 muestra los niveles de expresión de CXCL4 que indican el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa estomacal de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en un segundo experimento de la presente invención.

40 La FIG. 31 muestra los niveles de expresión de TNF- α que indican el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa estomacal de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en un segundo experimento de la presente invención.

[Modo para la invención]

45 Tal y como se utilizan en la presente, se definirán los términos empleados en la presente invención.

Tal y como se utiliza en la presente, el término "cultivo" se refiere a un producto obtenido mediante el cultivo de un microorganismo en un medio líquido o sólido conocido, por lo que se entiende que incluye un microorganismo.

50 Tal como se utilizan en la presente, los términos "farmacéuticamente aceptable" y "sitológicamente aceptable" significan que no estimulan de forma significativa a un organismo ni inhiben la actividad biológica y las características de un material activo administrado.

55 Tal y como se utiliza en la presente, el término "prevenir" se refiere a todas las acciones que inhiben los síntomas o retrasan la progresión de los síntomas mediante la administración de la composición de la presente invención.

Tal como se utiliza en la presente, el término "tratar" se refiere a todas las acciones que alivian o modifican beneficiosamente los síntomas de una enfermedad particular mediante la administración de la composición de la presente invención.

60 Tal y como se utiliza en la presente, el término "aliviar" se refiere a todas las acciones que reducen al menos un parámetro relacionado con la condición a tratar, por ejemplo, el grado de sintomatología.

65 Tal como se utiliza en la presente, el término "administrar" significa proporcionar la composición de la presente invención a un sujeto mediante cualquier método adecuado. Tal como se utiliza en la presente, el término "sujeto" se refiere a todos los animales, incluyendo los seres humanos, monos, perros, cabras, cerdos o ratas, que padecen una enfermedad concreta cuyos síntomas pueden aliviarse mediante la administración de la composición de la

presente invención.

Tal como se utiliza en la presente, el término "cantidad eficaz desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a una cantidad suficiente para tratar enfermedades, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. La cantidad eficaz desde el punto de vista farmacéutico puede determinarse en función de factores que incluyen el tipo de enfermedad del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la actividad del fármaco, la sensibilidad al fármaco, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la duración del tratamiento y los fármacos utilizados en combinación con la composición, así como otros factores conocidos en el ámbito médico.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con detalle.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una nueva bacteria del ácido láctico *Lactobacillus plantarum* LC27 (número de acceso: KCCM 11801P) que tienen diversas actividades fisiológicas. Una nueva mezcla de bacterias del ácido láctico que incluye *Lactobacillus plantarum* LC27 puede tener mayores actividades fisiológicas.

Una bacteria de ácido láctico novedosa en una composición para su uso de acuerdo con una realización de la presente invención se selecciona entre *Lactobacillus brevis* CH23 (número de acceso: KCCM 11762P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* CH57 (número de acceso: KCCM 11764P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* LC5 (número de acceso: KCCM 11800P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4, *Lactobacillus plantarum* LC27 (número de acceso: KCCM 11801P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5, o *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7, y tiene actividad antioxidante, actividad inhibidora de la β -glucuronidasa, actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS) o actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha.

La bacteria *Lactobacillus brevis* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1 es un bacilo anaerobio aislado del kimchi, es positivo a la tinción de Gram, puede sobrevivir en un amplio rango de temperaturas, pH bajos y altas concentraciones de sal, y produce glucosidasa. Además, la bacteria *Lactobacillus brevis* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1 utiliza D-ribosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, esculina, salicina, maltosa, melibiosa, 5-ceto-gluconato y similares como fuentes de carbono. Adicionalmente, la bacteria *Lactobacillus brevis* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1 es preferiblemente *Lactobacillus brevis* CH23 (número de acceso: KCCM 11762P). La bacteria *Bifidobacterium longum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3 es un bacilo anaerobio aislado de heces humanas, es positivo a la tinción de Gram y produce glucosidasa. Además, la bacteria *Bifidobacterium longum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3 utiliza D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa y similares como fuentes de carbono. Adicionalmente, la bacteria *Bifidobacterium longum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3 es preferiblemente *Bifidobacterium longum* CH57 (número de acceso: KCCM 11764P). La bacteria *Lactobacillus plantarum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4 es un bacilo anaerobio aislado del kimchi y es positivo a la tinción de Gram. Además, la bacteria *Lactobacillus plantarum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4 utiliza como fuentes de carbono D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, manitol, sorbitol, N-acetil-glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa, melecitosa y similares. Adicionalmente, la bacteria *Lactobacillus plantarum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4 es preferiblemente *Lactobacillus plantarum* LC5 (número de acceso: KCCM 11800P). La bacteria *Lactobacillus plantarum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5 es un bacilo anaerobio aislado del kimchi, y es positivo a la tinción de Gram. Además, la bacteria *Lactobacillus plantarum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5 utiliza como fuentes de carbono L-arabinosa, D-ribosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, manitol, sorbitol, N-acetil-glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa, melecitosa y similares. Adicionalmente, la bacteria *Lactobacillus plantarum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5 es preferiblemente *Lactobacillus plantarum* LC27 (número de acceso: KCCM 11801P). La bacteria *Bifidobacterium longum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7 es un bacilo anaerobio aislado de heces humanas, y es positivo a la tinción de Gram. Además, la bacteria *Bifidobacterium longum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7 utiliza como fuentes de carbono L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, esculina, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa y similares. Adicionalmente, la bacteria *Bifidobacterium longum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7 es preferiblemente *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P).

Una mezcla de bacterias del ácido láctico en una composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4 es una mezcla de dos o más bacterias del ácido láctico seleccionadas entre *Lactobacillus plantarum* LC27

(número de acceso: KCCM 11801P) y una o varias cepas más seleccionadas entre *Lactobacillus brevis* CH23 (número de acceso: KCCM 11762P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* CH57 (número de acceso: KCCM 11764P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* LC5 (número de acceso: KCCM 11800P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4, *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7. En vista del efecto sinérgico de las bacterias del ácido láctico, la mezcla de bacterias del ácido láctico en una composición es preferiblemente una combinación de *Lactobacillus brevis* CH23 (número de acceso: KCCM 11762P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1 y *Bifidobacterium longum* CH57 (número de acceso: KCCM 11764P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3 (dicha composición no está comprendida en el texto de las reivindicaciones).

Además, en vista del efecto sinérgico de las bacterias lácticas, la mezcla de bacterias lácticas en una composición para su uso de acuerdo con la realización de la presente invención es preferiblemente una combinación de *Lactobacillus plantarum* LC5 (número de acceso: KCCM 11800P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO 4 o *Lactobacillus plantarum* LC27 (número de acceso: KCCM 11801P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5, y *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7 (la combinación de *Lactobacillus plantarum* LC5 y *Bifidobacterium longum* LC67 no entra en el alcance de protección de la presente solicitud).

La mezcla de bacterias del ácido láctico tiene mayor actividad antioxidante, actividad inhibidora de la β -glucuronidasa, actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS) o actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha que una sola bacteria láctica debido al efecto sinérgico de una cepa específica de *Lactobacillus* sp. y una cepa específica de *Bifidobacterium* sp., y es más ventajosa en términos de alimentos funcionales y materiales medicinales. En la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, la bacteria *Lactobacillus brevis* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1 es preferiblemente *Lactobacillus brevis* CH23 (número de acceso: KCCM 11762P); la bacteria *Bifidobacterium longum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3 es preferiblemente *Bifidobacterium longum* CH57 (número de acceso: KCCM 11764P); la bacteria *Lactobacillus plantarum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4 es preferiblemente *Lactobacillus plantarum* LC5 (número de acceso: KCCM 11800P); la bacteria *Lactobacillus plantarum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5 es *Lactobacillus plantarum* LC27 (número de acceso: KCCM 11801P); y la bacteria *Bifidobacterium longum* que comprende la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7 es preferiblemente *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición para su uso en la prevención, el alivio o el tratamiento de daños intestinales, lesiones hepáticas, enfermedades alérgicas o enfermedades inflamatorias, que contiene, como principio activo, la bacteria del ácido láctico *Lactobacillus plantarum* LC27 (número de acceso: KCCM 11801P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5, comprendiendo opcionalmente además *Lactobacillus brevis* CH23 (número de acceso: KCCM 11762P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* CH57 (número de acceso: KCCM 11764P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* que comprende LC5 (número de acceso: KCCM 11800P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4, o *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7, un cultivo de la misma, un lisado de la misma o un extracto de la misma. Además, la presente invención se dirige a una composición para su uso en la prevención, alivio o tratamiento de daños intestinales, lesiones hepáticas, enfermedades alérgicas o enfermedades inflamatorias de acuerdo con la reivindicación 3, que contiene una mezcla de dos o más bacterias del ácido láctico seleccionadas entre *Lactobacillus plantarum* LC27 (número de acceso: KCCM 11801P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 5, y uno o más de *Lactobacillus brevis* CH23 (número de acceso: KCCM 11762P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* CH57 (número de acceso: KCCM 11764P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* LC5 (número de acceso: KCCM 11800P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 4, y *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P) que comprende una secuencia de nucleótidos de ADNr 16S representada por SEQ ID NO: 7, un cultivo de la misma, un lisado de la misma o un extracto de la misma. En la composición de la presente invención, las características técnicas de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* son las descritas anteriormente, por lo que se omite su descripción. El daño intestinal se refiere a una afección en la que la función de los intestinos (en particular el intestino delgado o el intestino grueso) es anormal debido a una alteración de la flora intestinal o similar. Preferiblemente, el daño intestinal es el síndrome de permeabilidad intestinal. Además, la lesión hepática se refiere a una afección en la que la función del hígado es anormal debido a factores externos o internos. Preferiblemente,

la lesión hepática se selecciona entre hepatitis, hígado graso o cirrosis hepática. Además, la hepatitis incluye todas las hepatitis no alcohólicas y las hepatitis alcohólicas. Además, el hígado graso incluye tanto el hígado graso no alcohólico como el hígado graso alcohólico. Además, la enfermedad alérgica puede ser cualquier enfermedad causada por respuestas inmunes excesivas de un organismo vivo, y se selecciona preferentemente entre dermatitis atópica, asma, faringitis o dermatitis crónica. Además, la enfermedad inflamatoria puede ser cualquier enfermedad causada por respuestas inflamatorias, y se selecciona preferentemente entre gastritis, úlcera gástrica, artritis o colitis. Además, la artritis incluye la artritis reumatoide. La colitis hace referencia a una afección en la que se produce una inflamación en el intestino grueso debido a una infección bacteriana o a una fermentación patológica del contenido intestinal. La colitis incluye la colitis infecciosa y la colitis no infecciosa. Entre los ejemplos específicos de colitis se incluyen las enfermedades inflamatorias intestinales, el síndrome del intestino irritable y similares. Además, las enfermedades inflamatorias intestinales incluyen colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn o similares.

En la presente invención, se produce un cultivo de la bacteria del ácido láctico o un cultivo de la mezcla de bacterias del ácido láctico cultivando una cepa determinada o una mezcla de cepas en un medio. Aquí, el medio puede seleccionarse entre medios líquidos o sólidos conocidos, y puede ser, por ejemplo, medio líquido MRS, medio de agar MRS o medio de agar BL.

En la presente invención, la composición puede presentarse como una composición farmacéutica, un aditivo alimentario, una composición alimentaria (en particular, una composición alimentaria funcional), un aditivo para alimentos o similares en función del uso o aspecto previsto. Además, el contenido de la bacteria del ácido láctico o de la mezcla de bacterias del ácido láctico como un principio activo también puede ajustarse dentro de un amplio rango en función del tipo específico, el uso previsto o el aspecto de la composición.

El contenido de la nueva bacteria del ácido láctico, la nueva mezcla de bacterias del ácido láctico, un cultivo de la misma, un lisado de la misma o un extracto de la misma como un principio activo en la composición farmacéutica según la presente invención no está particularmente limitado. Por ejemplo, el contenido puede ser de 0,01 a 99 % en peso, preferiblemente de 0,5 a 50 % en peso, más preferiblemente de 1 a 30 % en peso, con base en el peso total de la composición. Además, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede contener, además del principio activo, aditivos como portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los portadores, excipientes y diluyentes, que puede contener la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábica, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Una composición farmacéutica puede comprender *Lactobacillus plantarum* LC27 (número de acceso: KCCM 11801P), otros ingredientes mencionados en las reivindicaciones 3 y 4 y uno o más principios activos que tengan el efecto de prevenir o tratar daños intestinales, lesiones hepáticas, enfermedades alérgicas o enfermedades inflamatorias. La composición farmacéutica puede prepararse como formulaciones para administración oral o formulaciones para administración parenteral, y las formulaciones pueden prepararse utilizando diluyentes o excipientes, tales como materiales de relleno, extensores, aglutinantes, agentes humectantes, desintegrantes, tensoactivos y similares, que se utilizan habitualmente. Las formulaciones sólidas para administración oral incluyen comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas y similares, y dichas formulaciones sólidas pueden prepararse mezclando el principio activo con al menos un excipiente, por ejemplo, almidón, carbonato cálcico, sacarosa, lactosa o gelatina. Además de los excipientes simples, también pueden utilizarse lubricantes, tales como el estearato de magnesio o el talco. Las formulaciones líquidas para administración oral incluyen suspensiones, disoluciones, emulsiones y jarabe, y pueden contener diversos excipientes, por ejemplo, agentes humectantes, agentes saborizantes, conservantes y similares, además de agua y parafina líquida, que se utilizan frecuentemente como diluyentes simples. Las formulaciones para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas esterilizadas, disoluciones no acuosas, suspensiones, emulsiones, preparados liofilizados y supositorios. Como disolventes no acuosos o agentes suspensorios, pueden utilizarse propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva, ésteres inyectables, tales como el oleato de etilo y similares. Como base de los supositorios pueden utilizarse witepsol, Macrogol, Tween 61, manteca de cacao, grasa de laurina, glicerogelatina y similares. Además, la composición puede formularse preferentemente en función de cada enfermedad o componente mediante un método adecuado conocido en la técnica o el método divulgado en Remington's Pharmaceutical Science (la última edición), Mack Publishing Company, Easton PA. La composición farmacéutica puede ser para uso en administración oral o parenteral a mamíferos, incluyendo los humanos. Las vías de administración parenteral incluyen la aplicación externa cutánea, la inyección intraperitoneal, la inyección intrarrectal, la inyección subcutánea, la inyección intravenosa, la inyección intramuscular, la inyección intratorácica o similares. La dosis de la composición farmacéutica no está particularmente limitada siempre que se trate de una cantidad eficaz desde el punto de vista farmacéutico. La dosis puede variar en función del peso, la edad, el sexo, la condición de salud y la dieta del paciente, el tiempo de administración, el modo de administración, la tasa de excreción y la gravedad de la enfermedad. La dosis diaria de la composición farmacéutica no está particularmente limitada, pero es preferiblemente de 0,1 a 3000 mg/kg (con base en el principio activo), más preferiblemente de 1 a 2000 mg/kg (con base en el principio activo), y puede ser para una administración una o varias veces al día.

Además, el contenido de la nueva bacteria del ácido láctico, la nueva mezcla de bacterias del ácido láctico, un cultivo de la misma, un lisado de la misma o un extracto de la misma como un principio activo en una composición

alimentaria puede ser del 0,01 al 99 % en peso, preferiblemente del 0,1 al 50 % en peso, más preferiblemente del 0,5 al 25 % en peso, con base en el peso total de la composición, pero no está limitado a ello. La composición alimentaria puede presentarse en forma de píldoras, polvos, gránulos, infusiones, comprimidos, cápsulas, líquidos o similares, y entre los ejemplos específicos de alimentos se pueden incluir carnes, embutidos, panes, chocolates, caramelos, aperitivos, confitería, pizzas, ramen, otros fideos, gomas, productos lácteos, incluyendo helados, diversos tipos de sopas, bebidas, té, agua funcional, bebidas, bebidas alcohólicas, complejos vitamínicos y similares, y puede incluir todos los alimentos saludables en un sentido general. La composición alimentaria puede contener, además del principio activo, diversos agentes saborizantes o hidratos de carbono naturales como ingredientes adicionales. Además, la composición alimentaria puede contener diversos nutrientes, vitaminas, electrolitos, agentes saorizantes, colorantes, ácido péctico y su sal, ácido algínico y su sal, un ácido orgánico, un espesante coloidal protector, un agente de ajuste del pH, un estabilizador, un conservante, glicerina, alcohol, un agente carbonatante utilizado para bebidas gaseosas, y similares. Además, la composición alimentaria puede contener pulpa de fruta para preparar zumos de fruta naturales, bebidas de zumo de fruta y bebidas vegetales. Estos ingredientes pueden utilizarse de forma independiente o como una mezcla. Los carbohidratos naturales descritos pueden incluir monosacáridos, tales como la glucosa y la fructosa, disacáridos, tales como la maltosa y la sacarosa, polisacáridos, tales como la dextrina y la ciclodextrina, y alcoholes de azúcar, tales como el xilitol, el sorbitol y el eritritol. Como un agente saborizante, puede utilizarse un agente saborizante natural, tal como la taumatina o un extracto de stevia, o un aromatizante sintético, tal como la sacarina o el aspartamo.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. No obstante, debe entenderse que estos ejemplos sólo pretenden ilustrar claramente las características técnicas de la presente invención y no limitan el alcance de la misma.

I. Primer experimento de selección de bacterias del ácido láctico y evaluación de sus efectos (ejemplo comparativo)

1. Aislamiento e identificación de bacterias del ácido láctico

(1) Aislamiento de bacterias del ácido láctico del kimchi

Se trituró cada uno de los tipos de kimchi de col china, kimchi de rábano y kimchi de cebolla verde, y el líquido triturado se suspendió en medio líquido MRS (Caldo MRS; Difco, EE. UU.). A continuación, se recolectó el sobrenadante, se transfirió a un medio de agar MRS (Difco, EE. UU.) y se cultivó anaeróbicamente a 37 °C durante unas 48 horas, tras lo cual se aislaron las cepas que formaron colonias.

(2) Aislamiento de bacterias del ácido láctico de las heces humanas

Las heces humanas se suspendieron en medio líquido GAM (caldo GAM; Nissui Pharmaceutical, Japón). A continuación, se recolectó el sobrenadante, se transfirió a un medio de agar BL (Nissui Pharmaceutical, Japón) y se cultivó anaeróbicamente a 37 °C durante unas 48 horas, tras lo cual se aislaron las cepas de *Bifidobacterium* sp. que formaron colonias.

(3) Identificación de las bacterias del ácido láctico seleccionadas

Se analizaron las características fisiológicas y las secuencias de ADNr 16S de las cepas aisladas del kimchi o de las heces humanas para identificar las especies de las cepas, y se dieron nombres a las cepas. En la Tabla 1 se indican los números de control y los nombres de las cepas de las bacterias del ácido láctico aisladas de kimchi de col china, kimchi de rábano, kimchi de cebolla verde y heces humanas.

Tabla 1

No. de control	Nombre de la cepa	No. de control	Nombre de la cepa
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH1	31	<i>Lactobacillus sakei</i> CH31
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH2	32	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH32
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH3	33	<i>Lactobacillus sakei</i> CH33
4	<i>Lactobacillus brevis</i> CH4	34	<i>Lactobacillus sakei</i> CH34
5	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH5	35	<i>Lactobacillus plantarum</i> CH35
6	<i>Lactobacillus brevis</i> CH6	36	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> CH36
7	<i>Lactobacillus casei</i> CH7	37	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH37
8	<i>Lactobacillus planantrum</i> CH8	38	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH38
9	<i>Lactobacillus sakei</i> CH9	39	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH39

No. de control	Nombre de la cepa	No. de control	Nombre de la cepa
10	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH10	40	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH40
11	<i>Lactobacillus sakei</i> CH11	41	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH41
12	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH12	42	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH42
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> CH13	43	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH43
14	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH14	44	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH44
15	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH15	45	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH45
16	<i>Lactobacillus gasseri</i> CH16	46	<i>Bifidobacterium breve</i> CH46
17	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH17	47	<i>Bifidobacterium breve</i> CH47
18	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH18	48	<i>Bifidobacterium breve</i> CH48
19	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH19	49	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH49
20	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH20	50	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH50
21	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH21	51	<i>Bifidobacterium dentium</i> CH51
22	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH22	52	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH52
23	<i>Lactobacillus brevis</i> CH23	53	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH53
24	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH24	54	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH54
25	<i>Lactobacillus kimchi</i> CH25	55	<i>Bifidobacterium longum</i> CH55
26	<i>Lactobacillus gasseri</i> CH26	56	<i>Bifidobacterium longum</i> CH56
27	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH27	57	<i>Bifidobacterium longum</i> CH57
28	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH28	58	<i>Bifidobacterium longum</i> CH58
29	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH29	59	<i>Bifidobacterium longum</i> CH59
30	<i>Lactobacillus reuteri</i> CH30	60	<i>Bifidobacterium longum</i> CH60

Entre las cepas que figuran en la Tabla 1, la bacteria *Lactobacillus brevis* CH23 era un bacilo anaerobio grampositivo, no formaba esporas y podía sobrevivir incluso en condiciones aerobias. Además, la bacteria *Lactobacillus brevis* CH23 sobrevivió entre 10 y 42 °C y fue una cepa resistente a los ácidos y estable a pH 2 durante 2 horas. Además, la bacteria *Lactobacillus brevis* CH23 sobrevivió incluso en una disolución de cloruro sódico al 2 % y produjo activamente glucosidasa. Además, para clasificar químicamente la bacteria *Lactobacillus brevis* CH23, se analizó el ADNr 16S del mismo y, como resultado, se demostró que *Lactobacillus brevis* CH23 tenía una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. La secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de *Lactobacillus brevis* CH23 se buscó mediante BLAST en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y como resultado no se encontró una cepa de *Lactobacillus brevis* que tiene la misma secuencia de nucleótidos de ADNr 16S que la de *Lactobacillus brevis* CH23, y *Lactobacillus brevis* CH23 mostró una homología del 99 % con la secuencia de ADNr 16S de la cepa FJ004 de *Lactobacillus brevis*.

Entre las cepas que figuran en la Tabla 1, la bacteria *Lactobacillus johnsonii* CH32 era un bacilo anaerobio grampositivo, no formaba esporas y podía sobrevivir en condiciones aerobias. Además, la bacteria *Lactobacillus johnsonii* CH32 sobrevivió de forma estable a una temperatura de hasta 45 °C, y fue una cepa resistente al ácido estable en H₂ durante 2 horas. Además, la bacteria *Lactobacillus johnsonii* CH32 produjo activamente glucosidasa, pero no β -glucuronidasa. Además, para clasificar químicamente la bacteria *Lactobacillus johnsonii* CH32, se analizó el ADNr 16S del mismo y, como un resultado, se demostró que *Lactobacillus johnsonii* CH32 tenía una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2. La secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de *Lactobacillus johnsonii* CH32 se buscó mediante BLAST en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y como resultado no se encontró una cepa de *Lactobacillus johnsonii* que tiene la misma secuencia de nucleótidos de ADNr 16S que la de *Lactobacillus johnsonii* CH32, y *Lactobacillus johnsonii* CH32 mostró una homología del 99 % con la secuencia de ADNr 16S de la cepa JCM 2012 de *Lactobacillus johnsonii*.

Entre las cepas indicadas en la Tabla 1, *Bifidobacterium longum* CH57 era un bacilo anaerobio grampositivo, no formaba esporas y mostraba una viabilidad muy baja en condiciones aerobias. Además, *Bifidobacterium longum* CH57 era térmicamente inestable. Además, la bacteria *Bifidobacterium longum* CH57 produjo activamente glucosidasa, pero no produjo β -glucuronidasa. Además, para clasificar químicamente la bacteria *Bifidobacterium longum* CH57, se analizó el ADNr 16S de la misma y, como resultado, se demostró que *Bifidobacterium longum*

CH57 tenía una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3. La secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de *Bifidobacterium longum* CH57 se buscó mediante BLAST en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y como resultado no se encontró una cepa de *Bifidobacterium longum* que tiene la misma secuencia de nucleótidos de ADNr 16S que la de *Bifidobacterium longum* CH57, y *Bifidobacterium longum* CH57 mostró una homología del 99 % con la secuencia de ADNr 16S de la cepa CBT-6 de *Bifidobacterium longum*.

Además, entre las características fisiológicas de *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32 y *Bifidobacterium longum* CH57, se analizó la utilización de la fuente de carbono mediante una fermentación de azúcares con un kit API (modelo: API 50 CHL; fabricado por BioMerieux, EE. UU.). La Tabla 2 muestra los resultados del análisis de la utilización de la fuente de carbono de *Lactobacillus brevis* CH23; la Tabla 3 muestra los resultados del análisis de la utilización de la fuente de carbono de *Lactobacillus johnsonii* CH32; y la Tabla 4 muestra los resultados del análisis de la utilización de la fuente de carbono de *Bifidobacterium longum* CH57. En las tablas 2, 3 y 4, "+" indica el caso en el que la utilización de la fuente de carbono es positiva; "-" indica el caso en el que la utilización de la fuente de carbono es negativa; y "±" indica el caso en el que la utilización de la fuente de carbono es ambigua. Como se muestra a continuación en las Tablas 2, 3 y 4, *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32 y *Bifidobacterium longum* CH57 mostraron una utilización de la fuente de carbono diferente a la de otras cepas de la misma especie con respecto a algunas fuentes de carbono.

Tabla 2

Fuente de carbono	Nombre de la cepa		Fuente de carbono	Nombre de la cepa	
	<i>L. brevis</i> ¹⁾	<i>L. brevis</i> CH23		<i>L. brevis</i> ¹⁾	<i>L. brevis</i> CH23
glicerol	-	-	salicina	+	+
eritritol	-	-	celobiosa	+	-
D-arabinosa	-	-	maltosa	+	+
L-arabinosa	+	-	lactosa	+	-
D-ribosa	+	+	melibiosa	-	+
D-ailosa	+	+	sacarosa	+	-
L-ailosa	-	-	trehalosa	+	-
D-adonitol	-	-	inulina	+	-
metil-β-D-xilopiranosida	-	-	melecitosa	+	-
D-galactosa	+	-	rafinosa	-	-
D-glucosa	+	+	almidón	-	-
D-fructosa	+	+	glucógeno	-	-
D-manosa	+	-	xilitol	-	-
L-sorbosa	-	-	gentiobiosa	+	-
L-ramnosa	-	-	D-turanosa	+	-
dulcitol	+	-	D-lixosa	-	-
inositol	-	-	D-tagatosa	+	-
manitol	+	-	D-fucosa	-	-
sorbitol	+	-	L-fficosa	-	-
α-metil-D-manósido	-	-	D-arabitol	-	-
α-metil-D-glucósido	-	-	L-arabitol	-	-
N-acetil-glucosamina	+	±	gluconato	+	±
amigdalina	+	-	2-ceto-gluconato	-	-
arbutina	+	-	5-ceto-gluconato	-	+
esculina	+	+			

¹⁾ Suriasih K., Aryanta WR, MahardikaG, Astawa NM. Microbiological and Chemical Properties of Kefir Made of Bali Cattle Milk. Food Science and Quality Management 2012;6:112-22.

Tabla 3

Fuente de carbono	Nombre de la cepa		Fuente de carbono	Nombre de la cepa	
	<i>L. johnsonii</i> ²⁾	<i>L. johnsonii</i> CH32		<i>L. johnsonii</i> ²⁾	<i>L. johnsonii</i> CH32
glicerol	-	-	salicina	-	-
eritritol	-	-	celobiosa	+	-
D-arabinosa	-	-	maltosa	-	+
L-arabinosa	-	-	lactosa	-	+
D-ribosa	-	-	melibiosa	+	-
D-ailosa	-	-	sacarosa	+	+
L-ailosa	-	-	trehalosa	+	-
D-adonitol	-	-	inulina	-	-
metil-β-D-xilopiranosida	-	-	melecitosa	-	-
D-galactosa	-	-	rafinosa	+	-
D-glucosa	-	+	almidón	-	-
D-fructosa	-	+	glucógeno	-	-
D-manosa	+	+	xilitol	-	-
L-sorbosa	-	-	gentiobiosa	-	+
L-ramnosa	-	-	D-turanosa	-	-
dulcitol	-	-	D-lixosa	-	-
inositol	-	-	D-tagatosa	-	-
manitol	-	-	D-fucosa	-	-
sorbitol	-	-	L-fucosa	-	-
α-metil-D-manósido	-	-	D-arabitol	-	-
α-metil-D-glucósido	-	-	L-arabitol	-	-
N-acetil-glucosamina	+	+	gluconato	-	-
amigdalina	-	-	2-ceto-gluconato	-	-
arbutina	-	-	5-ceto-gluconato	-	-
esculina	-	-			

²⁾ Pridmore RD, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barretto C, Pittet AC, Zwahlen MC, Rouvet M, Altermann E, Barrangou R, Mollet B, Mercenier A, Klaenhammer T, Arigoni F, Schell MA. La secuencia del genoma de la bacteria intestinal probiótica *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Feb 24;101(8):2512-7.

Tabla 4

Fuente de carbono	Nombre de la cepa		Fuente de carbono	Nombre de la cepa	
	<i>B. longum</i> ³⁾	<i>B. longum</i> CH57		<i>B. longum</i> ³⁾	<i>B. longum</i> CH57
glicerol	±	-	salicina	±	-
eritritol	-	-	celobiosa	±	±
D-arabinosa	-	-	maltosa	-	-
L-arabinosa	-	-	lactosa	-	-
D-ribosa	±	-	melibiosa	-	-
D-ailosa	-	-	sacarosa	+	±

Fuente de carbono	Nombre de la cepa		Fuente de carbono	Nombre de la cepa	
	<i>B. longum</i> ³⁾	<i>B. longum</i> CH57		<i>B. longum</i> ³⁾	<i>B. longum</i> CH57
L-ailosa	-	-	trehalosa	±	-
D-adonitol	-	-	inulina	-	-
metil-β-D-xilopiranosida	-	-	melecitosa	-	-
D-galactosa	+	+	rafinosa	-	-
D-glucosa	+	+	almidón	-	-
D-fructosa	+	+	glucógeno	-	-
D-manosa	-	-	xilitol	-	-
L-sorbosa	-	-	gentiobiosa	-	-
L-ramnosa	-	-	D-turanosa	-	-
dulcitol	-	-	D-lixosa	-	-
inositol	-	-	D-tagatosa	-	-
manitol	+	-	D-fucosa	-	-
sorbitol	-	-	L-fficosa	-	-
α-metil-D-manósido	-	-	D-arabitol	-	-
α-metil-D-glucósido	-	-	L-arabitol	-	-
N-acetil-glucosamina	±	-	gluconato	±	-
amigdalina	-	-	2-ceto-gluconato	-	-
arbutina	±	-	5-ceto-gluconato	-	-
esculina	-	-			

³⁾ Lukacova D, Karovucova J, Greifova M, Greif G, Sovcikova A, Kohhajdova Z. In vitro testing of selected probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum*. Journal of Food and Nutrition Research 2006; 45: 77-83.

(4) Información sobre la deposición de bacterias del ácido láctico

Los presentes inventores depositaron la bacteria *Lactobacillus brevis* CH23 en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (dirección: Edificio Yurim, 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seúl, Corea), autoridad internacional de depósito, el 1 de septiembre de 2015, con el número de acceso KCCM 11762P. Además, los presentes inventores depositaron *Lactobacillus johnsonii* CH32 en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (dirección: Edificio Yurim, 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seúl, Corea), autoridad internacional de depósito, el 1 de septiembre de 2015, con el número de acceso KCCM 11763P. Además, los presentes inventores depositaron *Bifidobacterium longum* CH57 en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (dirección: Edificio Yurim, 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seúl, Corea), autoridad internacional de depósito, el 1 de septiembre de 2015, con el número de acceso KCCM 11764P.

2. Evaluación del efecto de las bacterias del ácido láctico en el alivio del daño intestinal o la permeabilidad intestinal

Para evaluar el efecto de las bacterias del ácido láctico, aisladas del kimchi o de las heces humanas, en el alivio del daño intestinal o la permeabilidad interna, se midió la actividad antioxidante, la actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS), la actividad inhibidora de la β-glucuronidasa (enzima intestinal nociva), y la actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha de las bacterias del ácido láctico.

(1) Métodos experimentales

* Actividad antioxidante

Se disolvió DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) en etanol hasta una concentración de 0,2 mM para preparar una disolución de DPPH. Se añadió una suspensión de bacterias del ácido láctico (1×10^8 UFC /ml) o una disolución de vitamina C (1 g/ml) a 0,1 ml de la disolución de DPPH y se cultivó a 37 °C durante 20 minutos. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se recolectó el sobrenadante. A continuación, se midió la absorbancia del sobrenadante a 517 nm y se calculó la actividad antioxidante de las bacterias del ácido láctico.

* Actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS)

Se suspendió 0,1 g de heces frescas humanas en 0,9 ml de disolución salina fisiológica estéril y se diluyó 100 veces con medio anaeróbico general para preparar una suspensión fecal. Se añadieron 0,1 ml de la suspensión fecal y 0,1 ml de bacterias del ácido láctico (1×10^4 o 1×10^5 UFC) a 9,8 ml de medio anaeróbico estéril (Nissui Pharmaceuticals, Japón) y se cultivaron anaeróticamente durante 24 horas. A continuación, el cultivo se sometió a sonicación durante aproximadamente 1 hora para romper la membrana celular externa de las bacterias, se centrifugó a $5000 \times g$ y se recolectó el sobrenadante. A continuación, se midió el contenido de LPS (lipopolisacárido) (que es una endotoxina típica) en el sobrenadante mediante un kit de ensayo de LAL (lisado de amebocitos de Limulus) (fabricado por Cape Cod Inc., EE. UU.). Además, para evaluar la actividad inhibidora de la proliferación de *E. coli* de las bacterias del ácido láctico, el cultivo obtenido mediante el mismo experimento descrito anteriormente se diluyó 1000 veces y 100000 veces y se cultivó en medio DHL, y después se contó el número de células de *E. coli*.

* Actividad inhibidora de la β -glucuronidasa

Se colocaron en un reactor 0,1 ml de disolución de p-nitrofenil- β -D-glucuronido 0,1 mM, 0,2 ml de disolución salina amortiguada con fosfato 50 mM y 0,1 ml de una suspensión de bacterias del ácido láctico (preparada mediante la suspensión de un cultivo de bacterias del ácido láctico en 5 ml de disolución salina fisiológica) y se sometieron a una reacción enzimática, y se añadieron 0,5 ml de disolución de NaOH 0,1 mM para detener la reacción. A continuación, se centrifugó la disolución de reacción a 3000 rpm durante 5 minutos y se recolectó el sobrenadante. A continuación, se midió la absorbancia del sobrenadante a 405 nm.

* Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha

Las células Caco2 obtenidas del Banco Coreano de Líneas Celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 durante 48 horas y, a continuación, las células Caco2 cultivadas se dispensaron en cada pozo de una placa de 12 pozos a una densidad de 2×10^6 células/pozo. A continuación, cada pozo se trató con 1 μ g de LPS (lipopolisacárido) o una combinación de 1 μ g de LPS (lipopolisacárido) y 1×10^3 UFC de bacterias del ácido láctico, y se incubó durante 24 horas. A continuación, se recolectaron las células cultivadas de cada pozo y se midió el nivel de expresión de la proteína de unión estrecha ZO-1 en las células mediante un método de inmunotransferencia.

(2) Resultados experimentales

Se midió la actividad antioxidante, la actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS), la actividad inhibidora de la β -glucuronidasa y la actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha de las bacterias del ácido láctico aisladas del kimchi o de las heces humanas, y los resultados de la medición se muestran en las Tablas 5 y 6 siguientes. Como se muestra a continuación en las Tablas 5 y 6, las bacterias del ácido láctico *Lactobacillus curvatus* CH5, *Lactobacillus sakei* CH11, *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CH38 y *Bifidobacterium longum* CH57 tuvieron una excelente actividad antioxidante, inhibieron fuertemente la producción de lipopolisacáridos (LPS) y la actividad de la β -glucuronidasa, e indujeron fuertemente la expresión de la proteína de la unión estrecha. Estas bacterias del ácido láctico tienen un excelente efecto antioxidante, inhiben la actividad enzimática de las bacterias nocivas de la flora intestinal asociadas a la inflamación y la carcinogénesis, inhiben la producción de endotoxina LPS (lipopolisacárido) por parte de las bacterias nocivas de la flora intestinal e inducen la expresión de la proteína de unión estrecha. Por lo tanto, estas bacterias del ácido láctico pueden mejorar el síndrome de permeabilidad intestinal.

Tabla 5

No. de control	Nombre de la cepa	Actividad antioxidante	Actividad inhibidora de la β -glucuronidasa	Actividad inhibidora de la producción de LPS	Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH1	+	+	-	-
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH2	+	+	+	-
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH3	+	+	+	-
4	<i>Lactobacillus brevis</i> CH4	+	+	-	-
5	<i>Lactobacillus</i>	+++	+	+++	++

No. de control	Nombre de la cepa	Actividad antioxidante	Actividad inhibidora de la beta-glucuronidasa	Actividad inhibidora de la producción de LPS	Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha
	<i>curvatus</i> CH5				
6	<i>Lactobacillus brevis</i> CH6	+	+	-	-
7	<i>Lactobacillus casei</i> CH7	+	+	-	-
8	<i>Lactobacillus planantrum</i> CH8	+	+	-	-
9	<i>Lactobacillus sakei</i> CH9	-	+	-	-
10	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH10	-	+	-	-
11	<i>Lactobacillus sakei</i> CH11	+++	+	+++	++
12	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH12	-	+	-	+
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> CH13	-	+	-	-
14	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH14	-	+	-	-
15	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH15	+++	+	++	-
16	<i>Lactobacillus gasseri</i> CH16	+	+	-	-
17	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH17	+	+	-	-
18	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH18	+	+	-	-
19	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH19	+	+	-	-
20	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH20	+	+	-	+
21	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH21	+	+	-	+
22	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH22	+	+	-	+
23	<i>Lactobacillus brevis</i> CH23	+++	+	++	++
24	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH24	+	+	-	-
25	<i>Lactobacillus kimchi</i> CH25	+	+	-	-
26	<i>Lactobacillus gasseri</i> CH26	+	+	-	-
27	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH27	+	+	-	+
28	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH28	+	+	-	-

No. de control	Nombre de la cepa	Actividad antioxidante	Actividad inhibidora de la beta-glucuronidasa	Actividad inhibidora de la producción de LPS	Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha
29	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH29	+	+	-	-
30	<i>Lactobacillus reuteri</i> CH30	+	-	-	-

Tabla 6

No. de control	Nombre de la cepa	Actividad antioxidante	Actividad inhibidora de la beta-glucuronidasa	Actividad inhibidora de la producción de LPS	Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha
31	<i>Lactobacillus sakei</i> CH31	-	+	-	+
32	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH32	+++	+	++	++
33	<i>Lactobacillus sakei</i> CH33	+	+	-	+
34	<i>Lactobacillus sakei</i> CH34	+	+	-	+
35	<i>Lactobacillus plantarum</i> CH35	+	+	+	+
36	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> CH36	+	+	+	+
37	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH37	-	+	-	+
38	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH38	+++	+	++	++
39	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH39	-	+	-	+
40	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH40	-	+	+++	+
41	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH41	+	+	-	+
42	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH42	+	+	-	-
43	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH43	+	+	-	-
44	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH44	+	+	-	-
45	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH45	+	+	-	-
46	<i>Bifidobacterium breve</i> CH46	+	-	-	-
47	<i>Bifidobacterium breve</i> CH47	+	+	-	+
48	<i>Bifidobacterium breve</i> CH48	+	+	-	+
49	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH49	+	+	-	++
50	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH50	-	+	-	-

No. de control	Nombre de la cepa	Actividad antioxidante	Actividad inhibidora de la beta-glucuronidasa	Actividad inhibidora de la producción de LPS	Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha
51	<i>Bifidobacterium dentium</i> CH51	+	-	-	-
52	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH52	-	+	-	-
53	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH53	-	+	-	-
54	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH54	+	+	-	-
55	<i>Bifidobacterium longum</i> CH55	+	+	-	+
56	<i>Bifidobacterium longum</i> CH56	+++	+	++	+
57	<i>Bifidobacterium longum</i> CH57	+++	+	+++	++
58	<i>Bifidobacterium longum</i> CH58	+	+	+	+
59	<i>Bifidobacterium longum</i> CH59	+	+	+	+
60	<i>Bifidobacterium longum</i> CH60	+	-	+	+

* La concentración final de bacterias del ácido láctico en la medición de la actividad antioxidante: 1×10^4 UFC/ml; la concentración de bacterias del ácido láctico añadidas para medir la actividad inhibidora de la betaglucuronidasa y la actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS): 1×10^4 UFC/ml; la concentración de bacterias del ácido láctico en la medición de la actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha: 1×10^4 UFC/ml.* Criterios para la medición de diversas actividades de las bacterias del ácido láctico: muy fuertemente (+++, >90 %); fuertemente (++ , >60-90 %); débilmente (+, >20-60 %); no o menos del 20 % (-, <20 %).

3. Evaluación del efecto de las bacterias del ácido láctico en el alivio de las lesiones hepáticas

Con base en la evaluación del efecto de las bacterias del ácido láctico en el alivio del daño intestinal o del síndrome de permeabilidad intestinal, se seleccionaron las siete cepas siguientes: *Lactobacillus curvatus* CH5, *Lactobacillus sakei* CH11, *Lactobacillus fermentum* CH15, *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CH38 y *Bifidobacterium longum*. Se evaluó el efecto de cada una de estas cepas seleccionadas o de una mezcla de estas cepas en el alivio de la lesión hepática utilizando varios animales modelo de lesión hepática.

(1) Medición del efecto paliativo de las lesiones hepáticas de las bacterias del ácido láctico mediante un experimento con animales modelo que presenten lesiones hepáticas inducidas por D-galactosamina

1) Método experimental

Los ratones (C57BL/6, machos) se dividieron en varios grupos, cada uno de ellos compuesto por 6 animales. Se administró D-galactosamina por vía intraperitoneal a los animales de prueba de los grupos distintos al normal a una dosis de 800 mg/kg para inducir la lesión hepática. A partir de 2 horas después de la administración intraperitoneal de D-galactosamina, se administraron por vía oral 1×10^9 UFC de bacterias del ácido láctico a los animales de prueba de los grupos distintos del grupo normal y del grupo de control negativo, una vez al día durante 3 días. Además, se administró silimarina por vía oral a los animales de prueba del grupo de control positivo en lugar de bacterias del ácido láctico a una dosis de 100 mg/kg, una vez al día durante 3 días. A las 6 horas de la última administración del fármaco, se extrajo sangre del corazón. La sangre extraída se dejó reposar a temperatura ambiente durante 60 minutos y se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos para separar el suero. Los niveles de GPT (transaminasa glutámica pirúvica) y GOT (transaminasa glutámica oxalacética) en el suero separado se midieron con un kit de ensayo sanguíneo (kit de medición de ALT y AST; Asan Pharm. Co., Corea).

Además, se diseccionó tejido hepático de los animales de prueba y se midió la cantidad de malondialdehído (MDA)

presente en el tejido hepático. El malondialdehído es un marcador de la peroxidación lipídica. Específicamente, se añadieron 0,5 g del tejido hepático diseccionado a un volumen 16 veces mayor de disolución RIPA (0,21 M de manitol, 0,1 M de EDTA-2Na, 0,07 M de sacarosa, 0,01 M de base Trizma), y después se homogeneizó utilizando un homogeneizador. La disolución homogeneizada se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos y se recolectó el homogeneizado de hígado. Se añadieron 0,5 ml del homogeneizado de hígado a 0,4 ml de SDS al 10 %, se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y se enfriaron; a continuación, se añadieron 3 ml de disolución amortiguadora de fosfato al 1 % y 1 ml de TBA al 0,6 % y se calentaron en un baño de agua a 100 °C durante 45 minutos para revelar la disolución de la muestra. Se añadieron 4 ml de n-butanol y se mezclaron con la disolución de muestra revelada; a continuación se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se recolectó el sobrenadante. Se midió la absorbancia del sobrenadante recolectado a 535 nm para cuantificar el MDA. Además, se trazó una curva de calibración para la medición del MDA utilizando 1,1,3,3-tetraetoxipropano.

2) Resultados experimentales

La FIG. 1 es un gráfico que muestra el cambio en el valor de GOT cuando se administraron bacterias del ácido láctico a animales modelo con lesión hepática inducida por D-galactosamina; la FIG. 2 es un gráfico que muestra el cambio en el valor GPT cuando se administraron bacterias del ácido láctico a animales modelo con lesión hepática inducida por D-galactosamina; y la FIG. 3 es un gráfico que muestra el cambio en el valor de MDA cuando se administraron bacterias del ácido láctico a animales modelo con lesión hepática inducida por D-galactosamina.

En el eje x de las FIGS. 1 a 3, "Nor" indica un grupo normal; "Con" indica un grupo de control negativo en el que no se administró un separado a los animales modelo con lesión hepática inducida por D-galactosamina; "ch11" indica un grupo con administración de *Lactobacillus sakei* CH11; "ch15" indica un grupo con administración de *Lactobacillus fermentum* CH15; "ch23" indica un grupo con administración de *Lactobacillus brevis* CH23; "ch32" indica un grupo con administración de *Lactobacillus johnsonii* CH32; "ch38" indica un grupo con administración de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CH38; "ch57" indica un grupo con administración de *Bifidobacterium longum* CH57; "ch57+ch11" indica un grupo con administración de una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus sakei* CH11 en la misma cantidad; "ch57+ch23" indica un grupo con administración de una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en la misma cantidad; "ch57+ch32" indica un grupo con administración de una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus johnsonii* CH32 en la misma cantidad; y "SM" indica un grupo de control positivo al que se administró silimarina en lugar de bacterias del ácido láctico.

Como se muestra en las FIGURAS 1 a 3, cuando se administró cada uno de *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32 y *Bifidobacterium longum* CH57 a los animales modelo en los que los valores de GOT, GPT y MAD aumentaron debido a la lesión hepática, ésta se alivió. En particular, cuando se administró una mezcla de bacterias del ácido láctico de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23, o una mezcla de bacterias del ácido láctico de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus johnsonii* CH32, se alivió en gran medida la lesión hepática. Además, las bacterias del ácido láctico específicas o una mezcla de bacterias del ácido láctico seleccionadas a partir de ellas mostraron un mejor efecto en el alivio de las lesiones hepáticas que la silimarina, que se utiliza como fármaco para el tratamiento de las lesiones hepáticas. Estos resultados sugieren que las bacterias del ácido láctico específicas o una mezcla de bacterias del ácido láctico seleccionadas a partir de ellas son eficaces para aliviar el hígado graso inducido por el alcohol o las dietas ricas en grasas o para aliviar las enfermedades hepáticas derivadas del estrés oxidativo.

(2) Medición del efecto paliativo de las lesiones hepáticas de las bacterias del ácido láctico mediante un experimento en el que se utilizan animales modelo con lesiones hepáticas inducidas por terc-butilperóxido

1) Método experimental

Los ratones (C57BL/6, machos) se dividieron en varios grupos, cada uno de ellos compuesto por 6 animales. Se administró terc-butilperóxido por vía intraperitoneal a los animales de prueba de los grupos distintos al normal en una cantidad de 2,5 mmol/kg para inducir la lesión hepática. A partir de 2 horas después de la administración intraperitoneal del terc-butilperóxido, se administraron por vía oral 1×10^9 UFC de bacterias del ácido láctico a los animales de prueba de los grupos distintos del grupo normal y del grupo de control negativo, una vez al día durante 3 días. Además, se administró silimarina por vía oral a los animales de prueba del grupo de control positivo en lugar de bacterias del ácido láctico a una dosis de 100 mg/kg, una vez al día durante 3 días. A las 6 horas de la última administración del fármaco, se extrajo sangre del corazón. La sangre extraída se dejó reposar a temperatura ambiente durante 60 minutos y se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos para separar el suero. Los niveles de GPT (transaminasa glutámica pirúvica) y GOT (transaminasa glutámica oxalacética) en el suero separado se midieron con un kit de ensayo sanguíneo (kit de medición de ALT y AST; Asan Pharm. Co., Corea).

2) Resultados experimentales

La tabla 7 muestra los cambios en los valores de GOT y GPT cuando se administraron bacterias del ácido láctico

a los animales modelo que presentaban lesiones hepáticas inducidas por terc-butilperóxido. Como se muestra en la Tabla 7, *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32 y *Bifidobacterium longum* CH57 mostraron excelentes efectos en el alivio de la lesión hepática en comparación con la silimarina, y una mezcla de bacterias del ácido láctico de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 o una mezcla de bacterias del ácido láctico de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus johnsonii* CH32 mostraron un mejor efecto en el alivio de la lesión hepática.

Tabla 7

Grupos de prueba	GOT(IU/L)	GPT(IU/L)
Grupo normal	36,1	26,3
Grupo de control negativo	84,1	96,1
Grupo con administración de CH23	58,0	74,2
Grupo con administración de CH32	53,0	70,5
Grupo con administración de CH57	57,6	71,2
Grupo con administración de CH57+CH23	48,6	64,3
Grupo con administración de CH57+CH32	51,2	68,4
Grupo con administración de silimarina	61,7	69,1

En la Tabla 7 anterior, "CH23" indica *Lactobacillus brevis* CH23; "CH32" indica *Lactobacillus johnsonii* CH32; "CH57" indica *Bifidobacterium longum* CH57; "CH57+CH23" indica una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en la misma cantidad; y "CH57+CH32" indica una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus johnsonii* CH32 en la misma cantidad.

4. Evaluación del efecto de las bacterias del ácido láctico en el alivio de la alergia

(1) Medición de la inhibición de la desgranulación por bacterias del ácido láctico

La línea celular RBL-2H3 (línea de mastocitos de rata, Banco Coreano de Líneas Celulares, No. de cat. 22256) se cultivaron con DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma, 22256) que contenía un 10 % de FBS (suero fetal bovino) y L-glutamina en un incubador humidificado con un 5 % de CO₂ a 37 °C. Las células contenidas en el medio de cultivo se hicieron flotar con disolución de tripsina-EDTA, y las células flotadas se aislaron, recolectaron y utilizaron en el experimento. Las células RBL-2H3 recolectadas se dispensaron en una placa de 24 pozos a una densidad de 5×10⁵ células/pozo y se sensibilizaron mediante incubación con 0,5 ug/ml de IgE monoclonal de ratón durante 12 horas. Las células sensibilizadas se lavaron con 0,5 ml de disolución amortiguadora de Siraganian (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7,2), y después se incubaron con 0,16 ml de disolución amortiguadora de Siraganian (suplementada con 5,6 mM glucosa, 1 mM CaCl₂, 0,1 % de BSA) a 37 °C durante 10 minutos. A continuación, se añadieron bacterias del ácido láctico como un fármaco de prueba al cultivo celular a una concentración de 1×10⁴ UFC/ml, o se añadieron 0,04 ml de DSCG (cromoglicato disódico) como fármaco de control al cultivo celular y, tras 20 minutos, se activaron las células con 0,02 ml de antígeno (1 ug/ml DNP-BSA) a 37 °C durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó el cultivo celular a 2000 rpm durante 10 minutos y se recolectó el sobrenadante. Se transfirieron 0,025 ml del sobrenadante recolectado a una placa de 96 pozos, a continuación, se añadieron 0,025 ml de p-NAG 1mM (una disolución de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamida en disolución amortiguadora de citrato 0,1M, pH 4,5) y la mezcla se dejó reaccionar a 37 °C durante 60 minutos. A continuación, se detuvo la reacción añadiendo 0,2 ml de Na₂CO₃/NaHCO₃, 1M, y se midió la absorbancia a 405 nm con un analizador ELISA.

(2) Medición de la inhibición del prurito por las bacterias del ácido láctico

Los ratones BALB/c se dividieron en varios grupos, cada uno de ellos compuesto por 5 animales. Se administraron por vía oral 1×10⁹ UFC de bacterias del ácido láctico como fármaco de prueba a los grupos de prueba distintos de un grupo normal y un grupo de control, una vez al día durante 3 días, o se administró por vía oral DSCG (cromoglicato disódico) o Azelastina como fármaco de control en una cantidad de 0,2 mg/ratón, una vez al día durante 3 días. Una hora después de la última administración del fármaco, se dejó que los ratones permanecieran en una jaula de observación (24 cm × 22 cm × 24 cm) durante 10 minutos para que se aclimataran al entorno y, a continuación, se les afeitó la parte posterior de la cabeza. A continuación, a los ratones del grupo normal se les inyectó disolución salina fisiológica, y a los ratones de los otros grupos de prueba se les inyectó un inductor del picor (50 ug del compuesto 48/80; Sigma, EE. UU.) con una aguja de calibre 29.

A continuación, se confinó inmediatamente a cada ratón en una jaula de observación y se observó el

comportamiento de prurito en la condición de desatendido grabando con una cámara de vídeo de 8 mm (SV-K80, Samsung) durante 1 hora. El rascado del área de inyección con el pie trasero se consideró el comportamiento de prurito, y el rascado de otras partes no se consideró.

5 (3) Medición de la inhibición de la permeabilidad capilar por bacterias del ácido láctico

Se sabe que las zonas con prurito presentan un aumento de la permeabilidad capilar. Este experimento se realizó para examinar si las bacterias del ácido láctico podían inhibir eficazmente la permeabilidad capilar causada por diversos compuestos. De acuerdo con el mismo método que el experimento descrito anteriormente para medir la actividad inhibidora del prurito, se administró el fármaco a los mismos ratones. A continuación, se inyectó disolución salina fisiológica por vía subcutánea en la parte posterior de la cabeza de los ratones del grupo normal y un inductor del prurito (50 ug del compuesto 48/80; Sigma, EE. UU.) por vía subcutánea en la parte posterior de la cabeza de los ratones del otro grupo de prueba. A continuación, se inyectaron 0,2 ml de disolución de azul de Evans al 1 % (Sigma, EE. UU.) en la vena de la cola y, al cabo de 1 hora, se sacrificaron los ratones. Se disecó la piel de la zona inyectada subcutáneamente y se incubó en 1 ml de KOH 1N a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, el tejido cutáneo incubado se mezcló con 4 ml de una mezcla de ácido fosfórico 0,6N y acetona (5:13) y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos; se recolectó el sobrenadante y se midió la absorbancia a 620 nm. La inhibición (%) de la permeabilidad capilar se calculó mediante la siguiente ecuación:

Inhibición (%) = $\{1 - [\text{absorbancia del área tratada con el fármaco y el inductor del prurito} - \text{absorbancia del área no tratada con el inductor del prurito}] / [\text{absorbancia del área tratada con el inductor del prurito} - \text{absorbancia del área no tratada con el inductor del prurito}]\} \times 100$

25 (4) Resultados experimentales

La Tabla 8 muestra los resultados de la medición de la tasa de inhibición de la degranulación, la tasa de inhibición del prurito y la tasa de inhibición de la permeabilidad capilar de las bacterias del ácido láctico. En la Tabla 8 a continuación, "CH5" indica *Lactobacillus curvatus* CH5; "CH11" indica *Lactobacillus sakei* CH11; "CH15" indica *Lactobacillus fermentum* CH15; "CH23" indica *Lactobacillus brevis* CH23; "CH32" indica *Lactobacillus johnsonii* CH32; "CH38" indica *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CH38; "CH57" indica *Bifidobacterium longum* CH57; "CH57+CH11" indica una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus sakei* CH11 en la misma cantidad; "CH57+CH23" indica una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en la misma cantidad; y "CH57+CH32" indica una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus johnsonii* CH32 en la misma cantidad.

Como se indica a continuación en la Tabla 8, *Lactobacillus curvatus* CH5, *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32 y *Bifidobacterium longum* CH57 inhibieron eficazmente la degranulación de los basófilos, y *Bifidobacterium longum* CH57 inhibió muy fuertemente el prurito y la permeabilidad capilar. Además, en comparación con estas bacterias del ácido láctico por sí solas, una mezcla de estas bacterias del ácido láctico, en particular una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 o una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus johnsonii* CH32 mostraron un mayor índice de inhibición de la degranulación, de inhibición del prurito y de inhibición de la permeabilidad capilar. Por lo tanto, puede verse que estas bacterias lácticas o sus mezclas pueden aliviar muy eficazmente la atopía alérgica, asma, faringitis, dermatitis crónica o similares.

Tabla 8

Fármaco	Inhibición (%)		
	Desgranulación	Prurito	Permeabilidad capilar
Ninguno	0	2	1
CH5	53	46	45
CH11	47	46	45
CH15	48	42	42
CH23	54	47	47
CH32	52	45	46
CH38	44	45	42
CH57	55	55	52
CH57+CH11	59	56	54
CH57+CH23	63	62	61

Fármaco	Inhibición (%)		
	Desgranulación	Prurito	Permeabilidad capilar
CH57+CH32	61	58	56
DSCG (cromoglicato disódico)	62	25	37
Azelastina	-	65	68

5. Evaluación *in vitro* del efecto antiinflamatorio y del efecto inhibidor de la permeabilidad intestinal de las bacterias del ácido láctico

5 (1) Aislamiento de células dendríticas y medición del marcador inflamatorio

Las células inmunes se aislaron de la médula ósea de ratones C57BL/6 (macho, 20-23 g) mediante el uso de RPMI 1640 (que contenía 10 % de FBS, 1 % de antibióticos, 1 % de glutamax y 0,1 % de mercaptoetanol). Las células aisladas se trataron con disolución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos, se lavaron, se dispensaron en cada pozo de una placa de 24 pozos, se trataron con GM-CSF e IL-4 en una relación de 1:1000 y se cultivaron. A los 5 días del cultivo, se sustituyó el medio por medio fresco y, a los 8 días, se recolectaron las células y se utilizaron como células dendríticas. A continuación, se sembraron las células dendríticas en una placa de 24 pozos a una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/pozo y se trataron con bacterias del ácido láctico (sustancia de prueba) y el inductor de la inflamación LPS (lipopolisacárido) durante 2 horas o 24 horas, y después se recolectaron el sobrenadante y las células. Utilizando el sobrenadante recolectado, se midieron los niveles de expresión de IL-10 e IL-12 mediante un método de inmunotransferencia.

La FIG. 4 es un gráfico que muestra el efecto de las bacterias del ácido láctico examinadas sobre la respuesta inflamatoria de las células dendríticas inducida por lipopolisacáridos (LPS). El gráfico de la izquierda en la FIG. 4 muestra el efecto de las bacterias del ácido láctico sobre las células no tratadas con LPS (lipopolisacárido), y el gráfico de la derecha muestra el efecto de las bacterias del ácido láctico sobre las células tratadas con LPS (lipopolisacárido). Además, en el eje x de la FIG. 4, "Nor" indica un grupo no tratado con la bacteria del ácido láctico de prueba y el inductor de la inflamación LPS (lipopolisacárido); "LPS" indica un grupo tratado con el inductor de la inflamación LPS (lipopolisacárido); "ch11" indica un grupo tratado con *Lactobacillus sakei* CH11; "ch15" indica un grupo tratado con *Lactobacillus fermentum* CH15; "ch23" indica un grupo tratado con *Lactobacillus brevis* CH23; "ch32" indica un grupo tratado con *Lactobacillus johnsonii* CH32; "ch38" indica un grupo tratado con *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CH38; "ch57" indica un grupo tratado con *Bifidobacterium longum* CH57; "ch57+ch11" indica un grupo tratado con una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus sakei* CH11 en la misma cantidad; "ch57+ch23" indica un grupo tratado con una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en la misma cantidad; y "ch57+ch32" indica un grupo tratado con una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus johnsonii* CH32 en la misma cantidad.

Como se muestra en la FIG. 4, *Lactobacillus sakei* CH11, *Lactobacillus brevis* CH23 y *Lactobacillus johnsonii* CH32 indujeron la producción de IL-10 de las células dendríticas obtenidas por diferenciación tras el aislamiento de la médula ósea, e inhibieron eficazmente la producción de IL-12 inducida por LPS (lipopolisacáridos), y también aumentaron los efectos cuando se utilizaron en combinación con *Bifidobacterium longum* CH57. En particular, una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 mostró el mejor efecto en la inhibición de la inflamación. Cuando se controlan las células dendríticas, se pueden controlar eficazmente las células Treg (células T reguladoras). Por esta razón, las bacterias del ácido láctico examinadas pueden aliviar eficazmente enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la colitis, enfermedades autoinmunes, tales como la artritis reumatoide, y similares.

(2) Aislamiento de macrófagos y medición del marcador inflamatorio

Se adquirieron ratones machos C57BL/6J de 6 semanas de edad (20-23 g) en RaonBio Co., Ltd. se administraron 2 ml de tioglicolato estéril al 4 % en la cavidad abdominal de cada ratón y, tras 96 horas, se anestesiaron los ratones y se administraron 8 ml de medio RPMI 1640 en la cavidad abdominal de cada ratón. Después de 5 a 10 minutos, se extrajo el medio RPMI (incluyendo los macrófagos) de la cavidad abdominal de los ratones, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y se lavó dos veces con medio RPMI 1640. Los macrófagos se sembraron en una placa de 24 pozos a una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/pozo y se trataron con la sustancia de prueba bacterias del ácido láctico y el inductor de la inflamación LPS (lipopolisacárido) durante 2 horas o 24 horas, y después se recolectaron el sobrenadante y las células. Las células recolectadas se homogeneizaron en amortiguador (Gibco). Utilizando el sobrenadante recolectado, se midieron los niveles de expresión de citocinas como el TNF- α y IL-1 β mediante un kit ELISA. Además, utilizando las células recogidas, se midieron los niveles de expresión de p65 (NF-kappa B), p-p65 (fósforo-NF-kappa B) y β -actina mediante un método de inmunotransferencia. Específicamente, se tomaron 50 μ g del sobrenadante y se electroforizaron en gel de poliácridamida SDS 10 % (p/v) durante 1 hora y 30 minutos. La muestra electroforizada se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en condiciones de 100 V y 400 mA

durante 1 hora y 10 minutos. La membrana de nitrocelulosa transferida a la muestra se bloqueó con leche desnatada al 5 % durante 30 minutos, y después se lavó tres veces con PBS-Tween durante 5 minutos cada vez, y se incubó con una dilución 1:100 de anticuerpo primario (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) durante toda la noche. A continuación, se lavó la membrana tres veces durante 10 minutos cada vez y se incubó con una dilución 1:1000 de anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) durante 1 hora y 20 minutos. A continuación, se lavó la membrana tres veces durante 15 minutos cada vez, se reveló por fluorescencia y se visualizó.

La FIG. 5 es un gráfico que muestra el efecto de *Bifidobacterium longum* CH57 sobre la respuesta inflamatoria de los macrófagos inducida por LPS (lipopolisacáridos). Como se muestra en la FIG. 5, *Bifidobacterium longum* CH57 inhibió eficazmente la respuesta inflamatoria inducida por LPS (lipopolisacárido).

(3) Aislamiento de células T del bazo y medición de la diferenciación en células Th17 o células Treg

Se separó el bazo de ratones C56BL/6J, se trituró adecuadamente y se suspendió en medio RPMI 1640 con un 10 % de FCS, y se aislaron de él células T CD4 utilizando un kit de aislamiento de células T CD4 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Las células T CD4 aisladas se sembraron en una placa de 12 pozos a una densidad de 5×10^5 células/pozo, y se les añadió anti-CD3 (1 ug/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y anti-CD28 (1 ug/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania), o bien anti-CD3 (1 ug/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania), anti-CD28 (1 ug/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania), IL-6 recombinante (20 ng/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y factor de crecimiento transformante beta recombinante (1 ng/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Mientras se cultivaban las células, se les añadieron 1×10^3 o 1×10^5 UFC de las bacterias del ácido láctico, y las células se cultivaron durante 4 días. A continuación, las células del cultivo se tiñeron con anticuerpos anti-FoxP3 o anti-IL-17A, y se analizó la distribución de células Th17 y Treg mediante un sistema FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) (Sistema C6 FlowCytometer®, San Jose, CA, EE. UU.).

La FIG. 6 muestra los resultados del análisis del efecto de *Lactobacillus brevis* CH23 sobre la diferenciación de las células T (aisladas del bazo) en células Th17 o células Treg mediante un sistema de clasificación celular activado por fluorescencia. Como se muestra en la FIG. 6, *Lactobacillus brevis* CH23 inhibió la diferenciación de las células T en células Th17 (células T helper 17) y promovió la diferenciación de las células T en células Treg. Estos resultados sugieren que *Lactobacillus brevis* CH23 puede aliviar eficazmente enfermedades inflamatorias, tales como la colitis y la artritis.

(4) Medición del efecto de las bacterias del ácido láctico en la expresión de la proteína ZO-1 de las células de CaCO2

Las células Caco2 obtenidas del Banco Coreano de Líneas Celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 durante 48 horas y, a continuación, las células Caco2 cultivadas se dispensaron en una placa de 12 pozos a una densidad de 2×10^6 células/pozo. A continuación, cada pozo se trató con 1 ug de LPS (lipopolisacárido) solo o con una combinación de 1 ug de LPS (lipopolisacárido) y 1×10^3 UFC o 1×10^5 UFC de bacterias del ácido láctico, y después se incubó durante 24 horas. A continuación, se recolectaron las células cultivadas de cada pozo y se midió el nivel de expresión de la proteína de unión estrecha ZO-1 mediante un método de inmunotransferencia.

La FIG. 7 muestra los resultados del análisis del efecto de *Lactobacillus brevis* CH23, *Bifidobacterium longum* CH57 o una mezcla de las mismas sobre la expresión de la proteína ZO-1 de células CaCO2. En la FIG. 7, "CH23" indica *Lactobacillus brevis* CH23; "CH57" indica *Bifidobacterium longum* CH57; "mezcla" indica una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus johnsonii* CH32 en la misma cantidad. Como se muestra en la FIG. 7, el tratamiento con *Lactobacillus brevis* CH23 y *Bifidobacterium longum* CH57 aumentó la expresión de la proteína de unión estrecha ZO-1, y el tratamiento con una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus johnsonii* CH32 aumentó sinérgicamente la expresión de la proteína de la unión estrecha ZO-1. Cuando aumenta la expresión de la proteína de la unión estrecha, puede bloquearse la penetración *in vivo* de sustancias tóxicas, evitando así el empeoramiento de la colitis, la artritis o las lesiones hepáticas.

6. Evaluación *in vivo* de los efectos antiinflamatorios y calmantes de la colitis de las bacterias del ácido láctico

(1) Animales de prueba

Los ratones macho C57BL/6 de 5 semanas de edad (24-27 g) se adquirieron en OrientBio y se alojaron en condiciones ambientales controladas (humedad: 50 ± 10 %, temperatura: 25 ± 2 °C, ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad), y luego se utilizaron en el experimento. Como alimento, se utilizó alimento experimental estándar (Samyang, Corea), y los animales tuvieron acceso a agua potable *ad libitum*. En todos los experimentos, un grupo consistía en 6 animales.

(2) Inducción de colitis por TNBS y administración de muestras

Un grupo de los animales de prueba se utilizó como grupo normal y los animales de prueba de los otros grupos se trataron con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) para inducir una colitis aguda. Específicamente, se anestesió ligeramente a los animales de prueba con éter y, a continuación, se administró una disolución de mezcla de 2,5 g de TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico) y 100 ml de etanol al 50 % en el colon a través del ano en una cantidad de 0,1 ml cada vez mediante el uso de una jeringa de punta redonda de 1 ml, y se levantó a los ratones verticalmente y se mantuvo durante 30 segundos, induciendo así la inflamación. Por otro lado, al grupo normal se le administró por vía oral 0,1 ml de disolución salina. Al día siguiente, las bacterias del ácido láctico o la mezcla de bacterias del ácido láctico como una muestra de prueba se suspendieron en disolución salina y se administraron por vía oral a cada ratón en una cantidad de $2,0 \times 10^9$ UFC. Al día siguiente del final de la administración de la muestra, se sacrificó a los animales con dióxido de carbono y se diseccionó y utilizó una porción de colon que abarcaba desde el ciego hasta el lugar situado justo antes del ano. Mientras tanto, a los animales de prueba del grupo normal se les administró por vía oral disolución salina sola en lugar de las bacterias del ácido láctico. Además, a los animales de prueba del grupo de control negativo se les administró por vía oral disolución salina sola en lugar de las bacterias del ácido láctico tras la inducción de colitis por TNBS. Además, a los animales de prueba del grupo de control positivo se les administró por vía oral 50 mg/kg de sulfasalazina, que es un fármaco para tratar la colitis, en lugar de las bacterias del ácido láctico.

(3) Análisis macroscópico del colon

Se observaron la longitud y la apariencia del colon disecado, y se analizó la apariencia puntuando según los criterios (Hollenbach et al., 2005, Criteria for Degree of Colitis) que se muestran a continuación en la Tabla 9. Tras la eliminación completa del contenido del colon, el tejido del colon se lavó con disolución salina. Una parte del tejido de colon lavado se fijó con una disolución de formaldehído al 4 % para utilizarla como muestra de tejido patológico, y el resto se utilizó para el análisis biológico molecular mientras se congelaba a -80°C .

Tabla 9

Puntaje macroscópico	Criterio
0	Se encuentra cualquier úlcera e inflamación.
1	Se detecta congestión sin hemorragia.
2	Se encuentra una úlcera con congestión.
3	Se encuentra inflamación en un solo sitio.
4	Se encuentran úlcera e inflamación en dos o más sitios.
5	La úlcera ha aumentado de tamaño 2 cm o más.

(4) Medición de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO)

Se homogeneizaron 100 mg de tejido de colon en 200 μl de disolución amortiguadora de fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0) que contenía 0,5 % de bromuro de hexadecil trimetilamonio. El tejido homogeneizado se centrifugó a $10,000 \times g$ y 4°C durante 10 minutos, y se recolectó el sobrenadante. Se añadieron 50 μl del sobrenadante a 0,95 ml de una disolución de reacción (que contenía 1,6 mM de tetrametilbencidina y 0,1 mM de H_2O_2) y se dejaron reaccionar a 37°C , y se midió la absorbancia a 650 nm en varios puntos temporales durante la reacción. Para calcular la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), se utilizó 1 $\mu\text{mol/ml}$ de peróxido producido por la reacción como 1 unidad.

(5) Medición del marcador inflamatorio

Mediante un método de inmunotransferencia tipo Western, se midieron marcadores inflamatorios, tales como p-p65, p65, iNOS, COX-2 y β -actina. Específicamente, de acuerdo con el mismo método que el experimento de medición de la actividad mieloperoxidasa (MPO), se obtuvo un sobrenadante. Se tomaron 50 μg del sobrenadante y se electroforizaron en gel de poliacrilamida SDS 10 % (p/v) durante 1 hora y 30 minutos. La muestra electroforizada se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en condiciones de 100 V y 400 mA durante 1 hora y 10 minutos. La membrana de nitrocelulosa transferida a la muestra se bloqueó con leche desnatada al 5 % durante 30 minutos, y después se lavó tres veces con PBS-Tween durante 5 minutos cada vez, y se incubó con una dilución 1:100 de anticuerpo primario (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) durante toda la noche. A continuación, se lavó la membrana tres veces durante 10 minutos cada vez y se incubó con una dilución 1:1000 de anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) durante 1 hora y 20 minutos. A continuación, se lavó la membrana tres veces durante 15 minutos cada vez, se reveló por fluorescencia y se visualizó.

Además, se midieron las citocinas relacionadas con la inflamación, tales como el $\text{TNF-}\alpha$, la $\text{IL-1}\beta$ y similares, mediante un kit ELISA.

(6) Resultados experimentales

La FIG. 8 muestra la apariencia del colon o la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) que indica el efecto de *Bifidobacterium longum* CH57 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS; la FIG. 9 representa imágenes histológicas del colon, que muestran el efecto de *Bifidobacterium longum* CH57 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS; y la FIG. 10 muestra los niveles de citocinas relacionadas con la inflamación que indican el efecto de *Bifidobacterium longum* CH57 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS. En las Figuras 8 a 10, "NOR" indica un grupo normal; "TNBS" indica un grupo de control negativo; "CH57" indica un grupo con administración de *Bifidobacterium longum* CH57; y "SS50" indica un grupo con administración de sulfasalazina. Como se muestra en la FIGS. 8 a 10, *Bifidobacterium longum* CH57 alivió eficazmente la colitis teniendo en cuenta el peso de los animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, los marcadores de colitis, la longitud del colon, la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) y similares, y mostró un mejor efecto en el alivio de la colitis que la sulfasalazina. Además, la bacteria *Bifidobacterium longum* CH57 inhibió la producción de citocinas inflamatorias y aumentó la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 en los animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS.

La FIG. 11 muestra la apariencia del colon o la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) que indica el efecto de *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS; la FIG. 12 representa imágenes histológicas del colon, que muestran el efecto de *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS; la FIG. 13 muestra patrones de diferenciación de células T que indican el efecto de *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS; y la FIG. 14 muestra los niveles de citocinas relacionadas con la inflamación que indican el efecto de *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS. En las Figuras 11 a 14, "N" indica un grupo normal; "TNBS" indica un grupo de control negativo; "CH23" indica un grupo con administración de *Lactobacillus brevis* CH23; y "SS" indica un grupo con administración de sulfasalazina. Como se muestra en la FIGS. 11 a 14, *Lactobacillus brevis* CH23 alivió eficazmente la colitis teniendo en cuenta el peso de los animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, los marcadores de colitis, la longitud del colon, la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) y similares, y mostró un mejor efecto en el alivio de la colitis que la sulfasalazina. Además, la bacteria *Lactobacillus brevis* CH23 inhibió la diferenciación de las células T en células Th17 e indujo la diferenciación de las células T en células Treg en los animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS. Además, la bacteria *Lactobacillus brevis* CH23 inhibió la producción de citocinas inflamatorias y aumentó la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 en los animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS.

La FIG. 15 muestra la apariencia del colon o la actividad mieloperoxidasa (MPO) que indica el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS; la FIG. 16 representa imágenes histológicas que muestran el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS; y la FIG. 17 muestra los niveles de citocinas relacionadas con la inflamación que indican el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS. En las Figuras 15 a 17, "NOR" indica un grupo normal; "TNBS" indica un grupo de control negativo; "BL" indica un grupo con administración de una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en la misma cantidad; y "SS50" indica un grupo administrado con sulfasalazina. Como se muestra en la FIGS. 15 a 17, una mezcla de bacterias del ácido láctico de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 mejoró significativamente los efectos contra la reducción de peso de los animales modelo que padecían colitis aguda inducida por TNBS, el aumento de los niveles de marcadores de colitis, el acortamiento de la longitud del colon y el aumento de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), y su efecto en el alivio de la colitis fue significativamente mejor que el de la sulfasalazina. Además, la mezcla de bacterias del ácido láctico de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 inhibió significativamente la producción de citocinas inflamatorias y aumentó drásticamente la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 en los animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS.

7. Evaluación *in vivo* de los efectos reductores de la obesidad y antiinflamatorios de las bacterias del ácido láctico

(1) Método experimental

Un total de 24 ratones C57BL6/J fueron adquiridos en RaonBio Co., Ltd., y aclimatados con dieta Chow (Purina) en condiciones de temperatura de 20±2 °C, humedad de 50±10 % y un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad durante 1 semana. A continuación, los animales de prueba se dividieron en tres grupos (LFD, HFD y HFD+BL), cada uno de ellos compuesto por 8 animales, el grupo LFD fue alimentado con una dieta normal (LFD, 10 % de calorías procedentes de grasas; Research, NJ, EE. UU.) durante 4 semanas, y el grupo HFD y el grupo HFD+BL fueron alimentados con una dieta rica en grasas (HFD, 60 % de calorías procedentes de grasas; Research, NJ, EE. UU.) durante 4 semanas. A continuación, al grupo LFD se le administró por vía oral PBS mientras se alimentaba con la dieta normal durante 4 semanas. Además, al grupo HFD se le administró por vía oral PBS mientras era alimentado con la dieta alta en grasas durante 4 semanas. Además, al grupo HFD+BL se le administró por vía oral una suspensión PBS de 2×10⁹ UFC de una mezcla de bacterias del ácido láctico mientras se alimentaba con la dieta alta en grasas durante 4 semanas. La mezcla de bacterias del ácido láctico se preparó mezclando *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en la misma cantidad.

(2) Análisis del efecto antiobesidad y antiinflamatorio de la mezcla de bacterias del ácido láctico

El efecto antiobesidad de la mezcla de bacterias del ácido láctico se analizó a través del cambio de peso. Además, se analizó el efecto antiinflamatorio de la mezcla de bacterias del ácido láctico utilizando el mismo método que el empleado en el experimento con los animales modelo que presentaban colitis aguda inducida por TNBS.

(3) Resultados experimentales

La FIG. 18 muestra los cambios de peso que indican el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS; la FIG. 19 muestra la apariencia del colon, la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), imágenes histológicas del colon y similares, que indican el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo inducidos por la obesidad; la FIG. 20 muestra los niveles de citocinas relacionadas con la inflamación que indican el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo inducidos por la obesidad; y la FIG. 21 muestra los marcadores de respuesta inflamatoria que indican el efecto de una mezcla de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 en animales modelo inducidos por la obesidad. Como se muestra en la FIGS. 18 a 21, la mezcla de bacterias del ácido láctico de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 redujo en gran medida el aumento de peso, el aumento de los niveles de marcadores de colitis y el aumento de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) de los animales modelo con obesidad inducida por la dieta rica en grasas, e inhibió el desarrollo de la colitis. Además, la mezcla de bacterias del ácido láctico de *Bifidobacterium longum* CH57 y *Lactobacillus brevis* CH23 inhibió en gran medida la producción de citocinas inflamatorias y aumentó la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 en los animales modelo con obesidad inducida por la dieta rica en grasas.

II. Segundo experimento de selección de bacterias del ácido láctico y evaluación de sus efectos

1. Aislamiento e identificación de bacterias del ácido láctico

(1) Aislamiento de bacterias del ácido láctico del kimchi

Se trituró cada uno de los tipos de kimchi de col china, kimchi de rábano y kimchi de cebolla verde, y el líquido triturado se suspendió en medio líquido MRS (Caldo MRS; Difco, EE. UU.). A continuación, se recolectó el sobrenadante, se transfirió al medio de agar MRS (Difco, EE. UU.) y se cultivó anaeróbicamente a 37 °C durante unas 48 horas, y después se separaron las cepas de *Bifidobacterium longum* que formaron colonias de acuerdo con su forma.

(3) Identificación de las bacterias del ácido láctico seleccionadas

Se analizaron las características de tinción de Gram, las características fisiológicas y las secuencias de ADNr 16S de las cepas aisladas del kimchi o de las heces humanas para identificar las especies de las cepas, y se dieron nombres a las cepas. En la Tabla 10 se muestran los números de control y los nombres de las cepas de las bacterias del ácido láctico aisladas de kimchi de col china, kimchi de rábano y kimchi de cebolla verde, y en la Tabla 11 se muestran los números de control y los nombres de las cepas de las bacterias del ácido láctico aisladas de heces humanas.

Tabla 10

No. de control	Nombre de la cepa	No. de control	Nombre de la cepa
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC1	26	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC26
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC2	27	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC27
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC3	28	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC28
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC4	29	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC29
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC5	30	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC30
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC6	31	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC31
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC7	32	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC32
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC8	33	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC33
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC9	34	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC34
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC10	35	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC35
11	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC1	36	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC36

No. de control	Nombre de la cepa	No. de control	Nombre de la cepa
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC12	37	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC37
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC13	38	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC38
14	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC14	39	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC39
15	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC15	40	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC40
16	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC16	41	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC41
17	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC17	42	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC42
18	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC18	43	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC43
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC19	44	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC44
20	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC20	45	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC45
21	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC21	46	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC46
22	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC22	47	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC47
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC23	48	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC48
24	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC24	49	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC49
25	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC25	50	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC50

Tabla 11

No. de control	Nombre de la cepa	No. de control	Nombre de la cepa
51	<i>Bifidobacterium longum</i> LC51	76	<i>Bifidobacterium longum</i> LC76
52	<i>Bifidobacterium longum</i> LC52	77	<i>Bifidobacterium longum</i> LC77
53	<i>Bifidobacterium longum</i> LC53	78	<i>Bifidobacterium longum</i> LC78
54	<i>Bifidobacterium longum</i> LC54	79	<i>Bifidobacterium longum</i> LC79
55	<i>Bifidobacterium longum</i> LC55	80	<i>Bifidobacterium longum</i> LC80
56	<i>Bifidobacterium longum</i> LC56	81	<i>Bifidobacterium longum</i> LC81
57	<i>Bifidobacterium longum</i> LC57	82	<i>Bifidobacterium longum</i> LC82
58	<i>Bifidobacterium longum</i> LC58	83	<i>Bifidobacterium longum</i> LC83
59	<i>Bifidobacterium longum</i> LC59	84	<i>Bifidobacterium longum</i> LC84
60	<i>Bifidobacterium longum</i> LC60	85	<i>Bifidobacterium longum</i> LC85
61	<i>Bifidobacterium longum</i> LC61	86	<i>Bifidobacterium longum</i> LC86
62	<i>Bifidobacterium longum</i> LC62	87	<i>Bifidobacterium longum</i> LC87
63	<i>Bifidobacterium longum</i> LC63	88	<i>Bifidobacterium longum</i> LC88
64	<i>Bifidobacterium longum</i> LC64	89	<i>Bifidobacterium longum</i> LC89
65	<i>Bifidobacterium longum</i> LC65	90	<i>Bifidobacterium longum</i> LC90
66	<i>Bifidobacterium longum</i> LC66	91	<i>Bifidobacterium longum</i> LC91
67	<i>Bifidobacterium longum</i> LC67	92	<i>Bifidobacterium longum</i> LC92
68	<i>Bifidobacterium longum</i> LC68	93	<i>Bifidobacterium longum</i> LC93
69	<i>Bifidobacterium longum</i> LC69	94	<i>Bifidobacterium longum</i> LC94
70	<i>Bifidobacterium longum</i> LC70	95	<i>Bifidobacterium longum</i> LC95
71	<i>Bifidobacterium longum</i> LC71	96	<i>Bifidobacterium longum</i> LC96
72	<i>Bifidobacterium longum</i> LC72	97	<i>Bifidobacterium longum</i> LC97
73	<i>Bifidobacterium longum</i> LC73	98	<i>Bifidobacterium longum</i> LC98
74	<i>Bifidobacterium longum</i> LC74	99	<i>Bifidobacterium longum</i> LC99

No. de control	Nombre de la cepa	No. de control	Nombre de la cepa
75	<i>Bifidobacterium longum</i> LC75	100	<i>Bifidobacterium longum</i> LC100

Se demostró que la bacteria *Lactobacillus plantarum* LC5 que aparece en la Tabla 10 anterior era un bacilo anaerobio grampositivo y su ADNr 16S tenía una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4. La secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de *Lactobacillus plantarum* LC5 se buscó mediante BLAST en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y como resultado no se encontró una cepa de *Lactobacillus plantarum* que tiene la misma secuencia de nucleótidos de ADNr 16S que la de *Lactobacillus plantarum* LC5, y *Lactobacillus plantarum* LC5 mostró una homología del 99 % con la secuencia de ADNr 16S de la cepa KF9 de *Lactobacillus plantarum*. Además, se demostró que la bacteria *Lactobacillus plantarum* LC27 que aparece en la Tabla 10 anterior era un bacilo anaerobio grampositivo y su ADNr 16S tenía una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5. La secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de *Lactobacillus plantarum* LC27 se buscó mediante BLAST en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y como resultado no se encontró una cepa de *Lactobacillus plantarum* que tiene la misma secuencia de nucleótidos de ADNr 16S que la de *Lactobacillus plantarum* LC27, y *Lactobacillus plantarum* LC27 mostró una homología del 99 % con la secuencia de ADNr 16S de la cepa JL18 de *Lactobacillus plantarum*. Adicionalmente, se demostró que la bacteria *Lactobacillus plantarum* LC28 que aparece en la Tabla 10 anterior era un bacilo anaerobio grampositivo y su ADNr 16S tenía una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6. La secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de *Lactobacillus plantarum* LC28 se buscó mediante BLAST en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y como resultado no se encontró una cepa de *Lactobacillus plantarum* que tiene la misma secuencia de nucleótidos de ADNr 16S que la de *Lactobacillus plantarum* LC28, y *Lactobacillus plantarum* LC28 mostró una homología del 99 % con la secuencia de ADNr 16S de la cepa USIM01 de *Lactobacillus plantarum*.

Se demostró que la bacteria *Bifidobacterium longum* LC67 que aparece en la Tabla 11 anterior era un bacilo anaerobio grampositivo y su ADNr 16S tenía una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7. La secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de *Bifidobacterium longum* LC67 se buscó mediante BLAST en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y como resultado no se encontró una cepa de *Bifidobacterium longum* que tiene la misma secuencia de nucleótidos de ADNr 16S que la de *Bifidobacterium longum* LC68, y *Bifidobacterium longum* LC68 mostró una homología del 99 % con la secuencia de ADNr 16S de la cepa CBT-6 de *Bifidobacterium longum*. Además, se demostró que la bacteria *Bifidobacterium longum* LC68 que aparece en la Tabla 11 anterior era un bacilo anaerobio grampositivo y su ADNr 16S tenía una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8. La secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de *Bifidobacterium longum* LC68 se buscó mediante BLAST en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y como resultado no se encontró una cepa de *Bifidobacterium longum* que tiene la misma secuencia de nucleótidos de ADNr 16S que la de *Bifidobacterium longum* LC68, y *Bifidobacterium longum* LC68 mostró una homología del 99 % con la secuencia de ADNr 16S de la cepa IMAUFB067 de *Bifidobacterium longum*.

Además, entre las características fisiológicas de *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Bifidobacterium longum* LC67 y *Bifidobacterium longum* LC68, se analizó la utilización de la fuente de carbono mediante una fermentación de azúcares con un kit API (modelo: API 50 CHL; fabricado por BioMerieux, EE. UU.). La Tabla 12 muestra los resultados del análisis de la utilización de la fuente de carbono de *Lactobacillus plantarum* LC5 y de *Lactobacillus plantarum* LC27, y la Tabla 13 muestra los resultados del análisis de la utilización de la fuente de carbono de *Bifidobacterium longum* LC67 y de *Bifidobacterium longum* LC68. En las Tablas 12 y 13 a continuación, "+" indica el caso en el que la utilización de la fuente de carbono es positiva; "-" indica el caso en el que la utilización de la fuente de carbono es negativa; y "±" indica el caso en el que la utilización de la fuente de carbono es ambigua. Como se muestra en 12 y 13 a continuación, *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Bifidobacterium longum* LC67 y *Bifidobacterium longum* LC68 mostraron una utilización de la fuente de carbono diferente a la de las cepas conocidas de la misma especie con respecto a algunas fuentes de carbono.

Tabla 12

Fuente de carbono	Nombre de la cepa		Fuente de carbono	Nombre de la cepa	
	<i>L. plantarum</i> LC5	<i>L. plantarum</i> LC27		<i>L. plantarum</i> LC5	<i>L. plantarum</i> LC27
glicerol	-	-	salicina	+	+
eritritol	-	-	celobiosa	+	+
D-arabinosa	-	-	maltosa	+	+
L-arabinosa	-	+	lactosa	-	+
D-ribosa	+	+	melibiosa	+	+
D-ailosa	-	-	sacarosa	+	+

Fuente de carbono	Nombre de la cepa		Fuente de carbono	Nombre de la cepa	
	<i>L. plantarum</i> LC5	<i>L. plantarum</i> LC27		<i>L. plantarum</i> LC5	<i>L. plantarum</i> LC27
L-xilosa	-	-	trehalosa	+	+
D-adonitol	-	-	inulina	-	-
metil- β -D-ailopiranosida	-	-	melecitosa	+	+
D-galactosa	+	$\pm$	rafinosa	$\pm$	-
D-glucosa	+	+	almidón	-	-
D-fructosa	+	+	glucógeno	-	-
D-manosa	+	+	xilitol	-	-
L-sorbosa	-	-	gentiobiosa	+	+
L-ramnosa	-	$\pm$	D-turanosa	-	+
dulcitol	-	-	D-lixosa	-	-
inositol	-	-	D-tagatosa	-	-
manitol	+	+	D-fucosa	-	-
sorbitol	+	+	L-fucosa	-	-
α -metil-D-manósido	-	$\pm$	D-arabitol	-	-
α -metil-D-glucósido	-	-	L-arabitol	-	-
N-acetil-glucosamina	+	+	gluconato	-	-
amigdalina	+	+	2-ceto-gluconato	-	-
arbutina	+	+	5-ceto-gluconato	-	-
esculina	+	+			

Tabla 13

Fuente de carbono	Nombre de la cepa		Fuente de carbono	Nombre de la cepa	
	<i>B. longum</i> LC67	<i>B. longum</i> LC68		<i>B. longum</i> LC67	<i>B. longum</i> LC68
glicerol	-	-	salicina	-	-
eritritol	-	-	celobiosa	-	-
D-arabinosa	-	-	maltosa	+	+
L-arabinosa	+	+	lactosa	+	+
D-ribosa	-	-	melibiosa	+	+
D-xilosa	+	$\pm$	sacarosa	+	$\pm$
L-xilosa	-	-	trehalosa	-	$\pm$
D-adonitol	-	-	inulina	-	-
metil- β -D-xilopiranosida	-	-	melecitosa	-	+
D-galactosa	$\pm$	+	rafinosa	+	+
D-glucosa	+	+	almidón	-	-
D-fructosa	+	+	glucógeno	-	-
D-manosa	-	-	xilitol	-	-
L-sorbosa	-	-	gentiobiosa	+	$\pm$

Fuente de carbono	Nombre de la cepa		Fuente de carbono	Nombre de la cepa	
	<i>B. longum</i> LC67	<i>B. longum</i> LC68		<i>B. longum</i> LC67	<i>B. longum</i> LC68
L-ramnosa	-	-	D-turanosa	±	±
dulcitol	-	-	D-lixosa	-	-
inositol	-	-	D-tagatosa	-	-
manitol	±	+	D-fucosa	-	-
sorbitol	±	+	L-fucosa	-	-
α-metil-D-manósido	-	-	D-arabitol	-	-
α-metil-D-glucósido	±	±	L-arabitol	-	-
N-acetil-glucosamina	-	-	gluconato	-	-
amigdalina	-	±	2-ceto-gluconato	-	-
arbutina	-	-	5-ceto-gluconato	-	-
esculina	+	+			

(4) Información sobre la deposición de bacterias del ácido láctico

Los presentes inventores depositaron la bacteria *Lactobacillus plantarum* LC5 en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (dirección: Edificio Yurim, 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seúl, Corea), autoridad internacional de depósito, el 11 de enero de 2016, con el número de acceso KCCM 11800P. Además, los presentes inventores depositaron *Lactobacillus plantarum* LC27 en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (dirección: Edificio Yurim, 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seúl, Corea), autoridad internacional de depósito, el 11 de enero de 2016, con el número de acceso KCCM 11801P. Además, los presentes inventores depositaron *Bifidobacterium longum* LC67 en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (dirección: Edificio Yurim, 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seúl, Corea), autoridad internacional de depósito, el 11 de enero de 2016, con el número de acceso KCCM 11802P.

2. Evaluación del efecto de las bacterias del ácido láctico en el alivio del daño intestinal o la permeabilidad intestinal

Para evaluar el efecto de las bacterias del ácido láctico, aisladas del kimchi o de las heces humanas, en el alivio del daño intestinal o la permeabilidad interna, se midió la actividad antioxidante, la actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS), la actividad inhibidora de la β-glucuronidasa (enzima intestinal nociva), y la actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha de las bacterias del ácido láctico.

(1) Métodos experimentales

* Actividad antioxidante

Se disolvió DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) en etanol hasta una concentración de 0,2 mM para preparar una disolución de DPPH. Se añadió una suspensión de bacterias del ácido láctico (1×10^8 UFC /ml) o una disolución de vitamina C (1 g/ml) a 0,1 ml de la disolución de DPPH y se cultivó a 37 °C durante 20 minutos. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se recolectó el sobrenadante. A continuación, se midió la absorbancia del sobrenadante a 517 nm y se calculó la actividad antioxidante de las bacterias del ácido láctico.

* Actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS)

Se suspendió 0,1 g de heces frescas humanas en 0,9 ml de disolución salina fisiológica estéril y se diluyó 100 veces con medio anaeróbico general para preparar una suspensión fecal. Se añadieron 0,1 ml de la suspensión fecal y 0,1 ml de bacterias del ácido láctico (1×10^4 o 1×10^5 UFC) a 9,8 ml de medio anaeróbico estéril (Nissui Pharmaceuticals, Japón) y se cultivaron anaeróticamente durante 24 horas. A continuación, el cultivo se sometió a sonicación durante aproximadamente 1 hora para romper la membrana celular externa de las bacterias, se centrifugó a 5000×g y se recolectó el sobrenadante. A continuación, se midió el contenido de LPS (lipopolisacárido) (que es una endotoxina típica) en el sobrenadante mediante un kit de ensayo de LAL (lisado de amebocitos de *Limulus*) (fabricado por Cape Cod Inc., EE. UU.). Además, para evaluar la actividad inhibidora de la proliferación de *E. coli* de las bacterias del ácido láctico, el cultivo obtenido mediante el mismo experimento descrito anteriormente se diluyó 1000 veces y 100000 veces y se cultivó en medio DHL, y después se contó el número de

células de *E. coli*.

* Actividad inhibidora de la β -glucuronidasa

- 5 Se colocaron en un reactor 0,1 ml de disolución de p-nitrofenil- β -D-glucurónido 0,1 mM, 0,2 ml de disolución salina amortiguada con fosfato 50 mM y 0,1 ml de una suspensión de bacterias del ácido láctico (preparada mediante la suspensión de un cultivo de bacterias del ácido láctico en 5 ml de disolución salina fisiológica) y se sometieron a una reacción enzimática, y se añadieron 0,5 ml de disolución de NaOH 0,1 mM para detener la reacción. A continuación, se centrifugó la disolución de reacción a 3000 rpm durante 5 minutos y se recolectó el sobrenadante.
- 10 A continuación, se midió la absorbancia del sobrenadante a 405 nm.

* Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha

- 15 Las células Caco2 obtenidas del Banco Coreano de Líneas Celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 durante 48 horas y, a continuación, las células Caco2 cultivadas se dispensaron en cada pozo de una placa de 12 pozos a una densidad de 2×10^6 células/pozo. A continuación, cada pozo se trató con 1 μ g de LPS (lipopolisacárido) o una combinación de 1 μ g de LPS (lipopolisacárido) y 1×10^3 UFC de bacterias del ácido láctico, y se incubó durante 24 horas. A continuación, se recolectaron las células cultivadas de cada pozo y se midió el nivel de expresión de la proteína de unión estrecha ZO-1 en las células mediante un método de inmunotransferencia.
- 20

(2) Resultados experimentales

- 25 Se midió la actividad antioxidante, la actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS), la actividad inhibidora de la β -glucuronidasa y la actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha de las bacterias del ácido láctico aisladas del kimchi o de las heces humanas, y los resultados de la medición se muestran en las Tablas 14 a 16 siguientes. Como se muestra a continuación en las Tablas 14 a 16, *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC15, *Lactobacillus plantarum* LC17, *Lactobacillus plantarum* LC25, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Lactobacillus plantarum* LC28, *Bifidobacterium longum* LC55, *Bifidobacterium longum* LC65, *Bifidobacterium longum* LC67 y *Bifidobacterium longum* LC68 tuvieron una excelente actividad antioxidante,
- 30 inhibieron fuertemente la producción de lipopolisacáridos (LPS) y la actividad de la β -glucuronidasa, e indujeron fuertemente la expresión de la proteína de la unión estrecha. En particular, *Bifidobacterium longum* LC67 mostró la mejor actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha. Estas bacterias del ácido láctico tienen un excelente efecto antioxidante, inhiben la actividad enzimática de las bacterias nocivas de la flora intestinal asociadas a la inflamación y la carcinogénesis, inhiben la producción de endotoxina LPS (lipopolisacárido) por parte de las bacterias nocivas de la flora intestinal e inducen la expresión de la proteína de unión estrecha. Por lo tanto, estas bacterias del ácido láctico pueden mejorar el síndrome de permeabilidad intestinal.
- 35

Tabla 14

No. de control	Nombre de la cepa	Actividad antioxidante	Actividad inhibidora de la beta-glucuronidasa	Actividad inhibidora de la producción de LPS	Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC1	++	+	+	-
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC2	++	++	+	-
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC3	+++	++	+	-
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC4	+++	++	+	+
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC5	+++	+++	++	++
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC6	++	+++	+	-
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC7	+++	++	+	-
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC8	++	+++	+	-
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC9	++	++	+	+

No. de control	Nombre de la cepa	Actividad antioxidante	Actividad inhibidora de la beta-glucuronidasa	Actividad inhibidora de la producción de LPS	Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC10	++	+++	+	+
11	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC11	++	++	+	-
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC12	++	+++	+	+
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC13	++	++	+	+
14	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC14	++	++	+	-
15	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC15	+++	+++	++	++
16	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC16	+	+++	+	-
17	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC17	+++	+++	++	++
18	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC18	++	++	+	+
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC19	++	+++	+	+
20	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC20	++	++	+	-
21	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC21	++	++	+	-
22	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC22	++	+++	-	-
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC23	+++	++	-	-
24	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC24	+++	+	-	-
25	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC25	+++	+++	++	++
26	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC26	++	+	+	+
27	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC27	+++	+++	++	++
28	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC28	+++	+++	++	++
29	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC29	++	+	-	-
30	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC30	++	+	+	-
31	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC31	+++	++	+	-
32	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC32	+++	++	+	-
33	<i>Lactobacillus</i>	+++	++	+	-

No. de control	Nombre de la cepa	Actividad antioxidante	Actividad inhibidora de la beta-glucuronidasa	Actividad inhibidora de la producción de LPS	Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha
	<i>plantarum</i> LC33				
34	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC34	++	++	+	+
35	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC35	++	++	+	+

Tabla 15

No. de control	Nombre de la cepa	Actividad antioxidante	Actividad inhibidora de la beta-glucuronidasa	Actividad inhibidora de la producción de LPS	Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha
36	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC36	++	++	++	-
37	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC37	+++	++	+	+
38	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC38	++	++	+	-
39	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC39	++	+	+	-
40	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC40	+++	+	-	-
41	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC41	++	++	-	+
42	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC42	+++	+	-	+
43	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC43	++	+	-	+
44	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC44	++	+	-	+
45	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC45	++	++	-	+
46	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC46	++	+	-	+
47	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC47	+++	+	-	+
48	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC48	++	++	-	+
49	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC49	++	+++	+	+
50	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC50	+++	++	+	-
51	<i>Bifidobacterium longum</i> LC51	++	++	+	-
52	<i>Bifidobacterium longum</i> LC52	+++	+++	+	-
53	<i>Bifidobacterium longum</i> LC53	++	+++	-	+
54	<i>Bifidobacterium</i>	+++	++	+	+

No. de control	Nombre de la cepa	Actividad antioxidante	Actividad inhibidora de la beta-glucuronidasa	Actividad inhibidora de la producción de LPS	Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha
	<i>longum</i> LC54				
55	<i>Bifidobacterium longum</i> LC55	+++	+++	++	++
56	<i>Bifidobacterium longum</i> LC56	+++	++	+	+
57	<i>Bifidobacterium longum</i> LC57	++	+	-	+
58	<i>Bifidobacterium longum</i> LC58	+++	+	-	+
59	<i>Bifidobacterium longum</i> LC59	++	+	-	-
60	<i>Bifidobacterium longum</i> LC60	+++	+	-	-
61	<i>Bifidobacterium longum</i> LC61	++	+	+	-
62	<i>Bifidobacterium longum</i> LC62	+++	+	+	-
63	<i>Bifidobacterium longum</i> LC63	++	++	++	-
64	<i>Bifidobacterium longum</i> LC64	+++	+	-	-
65	<i>Bifidobacterium longum</i> LC65	+++	+++	++	++
66	<i>Bifidobacterium longum</i> LC66	++	+	+	+
67	<i>Bifidobacterium longum</i> LC67	+++	+++	++	+++
68	<i>Bifidobacterium longum</i> LC68	+++	+++	++	++
69	<i>Bifidobacterium longum</i> LC69	+++	+	-	-
70	<i>Bifidobacterium longum</i> LC70	++	+	-	+

Tabla 16

No. de control	Nombre de la cepa	Actividad antioxidante	Actividad inhibidora de la beta-glucuronidasa	Actividad inhibidora de la producción de LPS	Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha
71	<i>Bifidobacterium longum</i> LC71	++	+	-	+
72	<i>Bifidobacterium longum</i> LC72	+++	++	-	+
73	<i>Bifidobacterium longum</i> LC73	++	++	+	-
74	<i>Bifidobacterium longum</i> LC74	++	+++	+	-
75	<i>Bifidobacterium</i>	+++	+	-	+

No. de control	Nombre de la cepa	Actividad antioxidante	Actividad inhibidora de la beta-glucuronidasa	Actividad inhibidora de la producción de LPS	Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha
	<i>longum</i> LC75				
76	<i>Bifidobacterium longum</i> LC76	++	+	-	+
77	<i>Bifidobacterium longum</i> LC77	++	++	+	+
78	<i>Bifidobacterium longum</i> LC78	++	+	+	+
79	<i>Bifidobacterium longum</i> LC79	+++	+	+	+
80	<i>Bifidobacterium longum</i> LC80	++	+	+	+
81	<i>Bifidobacterium longum</i> LC81	++	+	+	+
82	<i>Bifidobacterium longum</i> LC82	++	++	-	+
83	<i>Bifidobacterium longum</i> LC83	+++	+	-	+
84	<i>Bifidobacterium longum</i> LC84	++	++	-	-
85	<i>Bifidobacterium longum</i> LC85	+++	++	-	+
86	<i>Bifidobacterium longum</i> LC86	++	+	+	-
87	<i>Bifidobacterium longum</i> LC87	++	++	+	-
88	<i>Bifidobacterium longum</i> LC88	++	+++	+	+
89	<i>Bifidobacterium longum</i> LC89	++	++	+	+
90	<i>Bifidobacterium longum</i> LC90	++	++	+	+
91	<i>Bifidobacterium longum</i> LC91	+++	+++	+	+
92	<i>Bifidobacterium longum</i> LC92	+++	++	+	+
93	<i>Bifidobacterium longum</i> LC93	++	++	+	+
94	<i>Bifidobacterium longum</i> LC94	++	++	-	+
95	<i>Bifidobacterium longum</i> LC95	++	+++	-	-
96	<i>Bifidobacterium longum</i> LC96	++	+	-	-
97	<i>Bifidobacterium longum</i> LC97	++	+	-	-
98	<i>Bifidobacterium longum</i> LC98	++	++	-	-

No. de control	Nombre de la cepa	Actividad antioxidante	Actividad inhibidora de la beta-glucuronidasa	Actividad inhibidora de la producción de LPS	Actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha
99	<i>Bifidobacterium longum</i> LC99	++	++	-	-
100	<i>Bifidobacterium longum</i> LC100	++	++	-	+

* La concentración final de bacterias del ácido láctico en la medición de la actividad antioxidante: 1×10^4 UFC/ml; la concentración de bacterias del ácido láctico añadidas para medir la actividad inhibidora de la betaglucuronidasa y la actividad inhibidora de la producción de lipopolisacáridos (LPS): 1×10^4 UFC/ml; la concentración de bacterias del ácido láctico en la medición de la actividad inductora de la expresión de la proteína de la unión estrecha: 1×10^4 UFC/ml.* Criterios para la medición de diversas actividades de las bacterias del ácido láctico: muy fuertemente (+++; >90 %); fuertemente (++; >60-90 %); débilmente (+; >20-60 %); no o menos del 20 % (-; <20 %).

3. Evaluación del efecto de las bacterias del ácido láctico en el alivio de las lesiones hepáticas

Con base en la evaluación del efecto de las bacterias del ácido láctico en el alivio del daño intestinal o del síndrome de permeabilidad intestinal, se seleccionaron las siete cepas siguientes: *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC15, *Lactobacillus plantarum* LC17, *Lactobacillus plantarum* LC25, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Lactobacillus plantarum* LC28, *Bifidobacterium longum* LC55, *Bifidobacterium longum* LC65, *Bifidobacterium longum* LC67, y *Bifidobacterium longum*. Se evaluó el efecto de cada una de estas cepas de bacterias del ácido láctico seleccionadas o de una mezcla de estas cepas en el alivio de la lesión hepática utilizando animales modelo con lesión hepática inducida por terc-butilperóxido.

1) Método experimental

Los ratones (C57BL/6, machos) se dividieron en varios grupos, cada uno de ellos compuesto por 6 animales. Se administró terc-butilperóxido por vía intraperitoneal a los animales de prueba de los grupos distintos al normal a una dosis de 2,5 mmol/kg para inducir la lesión hepática. A partir de 2 horas después de la administración del terc-butilperóxido, se administraron por vía oral 2×10^9 UFC de bacterias del ácido láctico a los animales de prueba de los grupos distintos del grupo normal y del grupo de control negativo, una vez al día durante 3 días. Además, se administró silimarina por vía oral a los animales de prueba del grupo de control positivo en lugar de bacterias del ácido láctico a una dosis de 100 mg/kg, una vez al día durante 3 días. A las 6 horas de la última administración del fármaco, se extrajo sangre del corazón. La sangre extraída se dejó reposar a temperatura ambiente durante 60 minutos y se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos para separar el suero. Los niveles de GPT (transaminasa glutámica pirúvica) y GOT (transaminasa glutámica oxalacética) en el suero separado se midieron con un kit de ensayo sanguíneo (kit de medición de ALT y AST; Asan Pharm. Co., Corea). Además, 1 g del tejido hepático disecado de cada animal de prueba se añadió a una disolución salina y se homogeneizó utilizando un homogeneizador, y el sobrenadante se analizó mediante un kit ELISA para medir el nivel de TNF- α .

(2) Resultados experimentales

La Tabla 17 muestra los cambios en los valores de GOT, GPT y TNF- α cuando se administraron bacterias del ácido láctico a animales modelo con lesiones hepáticas inducidas por terc-butilperóxido. Como se muestra a continuación en la Tabla 17, *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Lactobacillus plantarum* LC28, *Bifidobacterium longum* LC67 y *Bifidobacterium longum* LC68 mostraron excelentes efectos en el alivio de la lesión hepática en comparación con la silimarina, y las mezclas de estas bacterias del ácido láctico mostraron mejores efectos en el alivio de la lesión hepática.

Tabla 17

Grupos de prueba	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	TNF- α (pg/g)
Grupo normal	42,4	6,2	140,4
Grupo de control negativo	103,1	28,0	298,0
Grupo con administración de LC5	36,9	5,4	115,7
Grupo con administración de LC15	60,3	6,2	154,3
Grupo con administración de LC17	65,8	6,8	136,7
Grupo con administración de LC25	64,6	11,3	132,4

Grupos de prueba	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	TNF- α (pg/g)
Grupo con administración de LC27	35,3	3,3	157,1
Grupo con administración de LC28	42,0	1,0	185,7
Grupo con administración de LC55	55,6	17,6	251,4
Grupo con administración de LC65	61,4	17,3	127,6
Grupo con administración de LC67	50,8	3,8	150,5
Grupo con administración de LC68	40,8	5,7	82,4
Grupo con administración de LC5+LC67	32,7	3,1	115,9
Grupo con administración de LC5+LC68	36,8	5,6	105,4
Grupo con administración de LC27+LC67	30,5	2,3	121,2
Grupo con administración de LC27+LC68	35,4	3,2	112,8
Grupo con administración de LC28+LC67	32,5	2,8	128,2
Grupo con administración de silimarina	52,9	5,9	93,8

En la Tabla 17 anterior, "LC5" indica *Lactobacillus plantarum* LC5; "LC15" indica *Lactobacillus plantarum* LC15; "LC17" indica *Lactobacillus plantarum* LC17; "LC25" indica *Lactobacillus plantarum* LC25; "LC27" indica *Lactobacillus plantarum* LC27; "LC28" indica *Lactobacillus plantarum* LC28; "LC55" indica *Bifidobacterium longum* LC55; "LC65" indica *Bifidobacterium longum* LC65; "LC67" indica *Bifidobacterium longum* LC67; "LC68" indica *Bifidobacterium longum* LC68; "LC5+LC67" indica una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Lactobacillus plantarum* LC5 y *Bifidobacterium longum* LC67 en la misma cantidad; "LC5+LC68" indica una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Lactobacillus plantarum* LC5 y *Bifidobacterium longum* LC68 en la misma cantidad; "LC27+LC67" indica una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Lactobacillus plantarum* LC27 y *Bifidobacterium longum* LC67 en la misma cantidad; "LC27+LC68" indica una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Lactobacillus plantarum* LC27 y *Bifidobacterium longum* LC67 en la misma cantidad; y "LC28+LC67" indica una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Lactobacillus plantarum* LC28 y *Bifidobacterium longum* LC67 en la misma cantidad. En las siguientes tablas que muestran los resultados experimentales, se utilizan los mismos símbolos para bacterias del ácido láctico individuales o para mezclas de bacterias del ácido láctico.

4. Evaluación del efecto de las bacterias del ácido láctico en el alivio de la alergia

(1) Medición de la inhibición de la desgranulación por bacterias del ácido láctico

La línea celular RBL-2H3 (línea de mastocitos de rata, Banco Coreano de Líneas Celulares, No. de cat. 22256) se cultivaron con DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma, 22256) que contenía un 10 % de FBS (suero fetal bovino) y L-glutamina en un incubador humidificado con un 5 % de CO₂ a 37 °C. Las células contenidas en el medio de cultivo se hicieron flotar con disolución de tripsina-EDTA, y las células flotadas se aislaron, recolectaron y utilizaron en el experimento. Las células RBL-2H3 recolectadas se dispensaron en una placa de 24 pozos a una densidad de 5×10⁵ células/pozo y se sensibilizaron mediante incubación con 0,5 ug/ml de IgE monoclonal de ratón durante 12 horas. Las células sensibilizadas se lavaron con 0,5 ml de disolución amortiguadora de Siraganian (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7,2), y después se incubaron con 0,16 ml de disolución amortiguadora de Siraganian (suplementada con 5,6 mM glucosa, 1mM CaCl₂, 0,1 % de BSA) a 37 °C durante 10 minutos. A continuación, se añadieron bacterias del ácido láctico como un fármaco de prueba al cultivo celular a una concentración de 1×10⁴ UFC/ml, o se añadieron 0,04 ml de DSCG (cromoglicato disódico) como fármaco de control al cultivo celular y, tras 20 minutos, se activaron las células con 0,02 ml de antígeno (1 ug/ml DNP-BSA) a 37 °C durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó el cultivo celular a 2000 rpm durante 10 minutos y se recolectó el sobrenadante. Se transfirieron 0,025 ml del sobrenadante recolectado a una placa de 96 pozos, a continuación, se añadieron 0,025 ml de p-NAG 1mM (una disolución de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamida en disolución amortiguadora de citrato 0,1M, pH 4,5) y la mezcla se dejó reaccionar a 37 °C durante 60 minutos. A continuación, se detuvo la reacción añadiendo 0,2 ml de Na₂CO₃/NaHCO₃, 1M, y se midió la absorbancia a 405 nm con un analizador ELISA.

(2) Resultados experimentales

La Tabla 18 muestra los resultados de la medición de la inhibición (%) de la degranulación por bacterias del ácido láctico. Como se muestra en la Tabla 18, *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Lactobacillus plantarum* LC28, *Bifidobacterium longum* LC67, *Bifidobacterium longum* LC68 y las mezclas de las mismas inhibieron eficazmente la degranulación de los basófilos. Por lo tanto, estas bacterias lácticas o sus mezclas

pueden aliviar muy eficazmente la atopía alérgica, asma, faringitis, dermatitis crónica o similares.

Tabla 18

Fármaco	Inhibición de la desgranulación (%)
Ninguno	0
LC5	65
LC15	45
LC17	43
LC25	48
LC27	52
LC28	54
LC55	38
LC65	42
LC67	65
LC68	61
LC5+LC67	65
LC5+LC68	60
LC27+LC67	65
LC27+LC68	59
LC28+LC67	62
DSCG (cromoglicato disódico)	62

5. Evaluación *in vitro* de los efectos antiinflamatorios e inmunorreguladores de las bacterias del ácido láctico

(1) Aislamiento de macrófagos y medición del marcador inflamatorio

Se adquirieron ratones machos C57BL/6J de 6 semanas de edad (20-23 g) en RaonBio Co., Ltd. se administraron 2 ml de tioglicolato estéril al 4 % en la cavidad abdominal de cada ratón y, tras 96 horas, se anestesiaron los ratones y se administraron 8 ml de medio RPMI 1640 en la cavidad abdominal de cada ratón. Después de 5-10 minutos, se extrajo el medio RPMI (incluyendo los macrófagos) de la cavidad abdominal de los ratones, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y se lavó dos veces con medio RPMI 1640. Los macrófagos se sembraron en una placa de 24 pozos a una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/pozo y se trataron con la sustancia de prueba bacterias del ácido láctico y el inductor de la inflamación LPS (lipopolisacárido) durante 2 horas o 24 horas, y después se recolectaron el sobrenadante y las células. En este caso, las bacterias del ácido láctico se utilizaron a una concentración de 1×10^4 UFC/ml para el tratamiento de las células. Las células recolectadas se homogeneizaron en amortiguador (Gibco). Utilizando el sobrenadante recolectado, se midieron los niveles de expresión de citocinas como el TNF- α mediante un kit ELISA. Además, utilizando las células recogidas, se midieron los niveles de expresión de p65 (NF-kappa B), p-p65 (fósforo-NF-kappa B) y β -actina mediante un método de inmunotransferencia. Específicamente, se tomaron 50 μ g del sobrenadante y se electroforizaron en gel de poliacrilamida SDS 10 % (p/v) durante 1 hora y 30 minutos. La muestra electroforizada se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en condiciones de 100 V y 400 mA durante 1 hora y 10 minutos. La membrana de nitrocelulosa transferida a la muestra se bloqueó con leche desnatada al 5 % durante 30 minutos, y después se lavó tres veces con PBS-Tween durante 5 minutos cada vez, y se incubó con una dilución 1:100 de anticuerpo primario (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) durante toda la noche. A continuación, se lavó la membrana tres veces durante 10 minutos cada vez y se incubó con una dilución 1:1000 de anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) durante 1 hora y 20 minutos. A continuación, se lavó la membrana tres veces durante 15 minutos cada vez, se reveló por fluorescencia y se visualizó. Se midió la intensidad de la banda desarrollada y, a continuación, se calculó la inhibición (%) mediante la siguiente ecuación. En la siguiente ecuación, el grupo normal indica un grupo en el que los macrófagos fueron tratados únicamente con disolución salina; el grupo tratado con LPS indica un grupo en el que los macrófagos fueron tratados únicamente con LPS; y el grupo tratado con bacterias del ácido láctico indica un grupo en el que los macrófagos fueron tratados tanto con bacterias del ácido láctico como con LPS.

Inhibición (%) = (nivel de expresión en el grupo tratado con LPS - nivel de expresión en el grupo tratado con bacterias del ácido láctico / nivel de expresión en el grupo tratado con LPS - nivel de expresión en el grupo normal)

La Tabla 19 muestra la inhibición de la activación de NF-kappa B y la inhibición de la expresión de TNF- α cuando los macrófagos con inflamación inducida por LPS (lipopolisacáridos) fueron tratados con las bacterias del ácido láctico. Como se muestra a continuación en la Tabla 19, *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Lactobacillus plantarum* LC28, *Bifidobacterium longum* LC67, *Bifidobacterium longum* LC68 y las mezclas de las mismas inhibieron eficazmente la inflamación inducida por LPS (lipopolisacárido).

Tabla 19

Bacterias del ácido láctico utilizadas para el tratamiento	Inhibición (%) de la expresión de TNF- α	Inhibición (%) de la activación de p-p65/p65
LC5	71	73
LC15	54	55
LC17	61	55
LC25	52	65
LC27	70	72
LC28	74	71
LC55	63	62
LC65	65	68
LC67	76	77
LC68	75	71
LC5+LC67	78	72
LC5+LC68	76	72
LC27+LC67	81	75
LC27+LC68	77	73
LC28+LC67	77	73

(2) Aislamiento de células T del bazo y medición de la diferenciación en células Th17 o células Treg

Se separó el bazo de ratones C56BL/6J, se trituró adecuadamente y se suspendió en medio RPMI 1640 con un 10 % de FCS, y se aislaron de él células T CD4 utilizando un kit de aislamiento de células T CD4 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Las células T CD4 aisladas se sembraron en una placa de 12 pozos a una densidad de 5×10^5 células/pozo, y se les añadió anti-CD3 (1 ug/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y anti-CD28 (1 ug/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania), o bien anti-CD3 (1 ug/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania), anti-CD28 (1 ug/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania), IL-6 recombinante (20 ng/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y factor de crecimiento transformante beta recombinante (1 ng/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Mientras se cultivaban las células, se les añadieron 1×10^3 o 1×10^5 UFC de las bacterias del ácido láctico, y las células se cultivaron durante 4 días. A continuación, las células del cultivo se tiñeron con anticuerpos anti-FoxP3 o anti-IL-17A, y se analizó la distribución de células Th17 y células Treg mediante un sistema FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) (Sistema C6 FlowCytometer®, San Jose, CA, EE. UU.).

La Tabla 20 muestra el nivel de diferenciación de las células T (aisladas del bazo) en células Th17 cuando las células T se trataron con anti-CD3, anti-CD28, IL-6 y TGF- β , y la Tabla 21 muestra el nivel de diferenciación de las células T (aisladas del bazo) en células Treg cuando las células T se trataron con anti-CD3 y anti-CD28. En las Tablas 20 y 21, las bacterias *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Lactobacillus plantarum* LC28, *Bifidobacterium longum* LC67, *Bifidobacterium longum* LC68 y mezclas de las mismas inhibieron la diferenciación de las células T en células Th17 (células T helper 17) y promovieron la diferenciación de las células T en células Treg. Estos resultados sugieren que las bacterias del ácido láctico o mezclas de las mismas pueden aliviar eficazmente enfermedades inflamatorias, tales como la colitis o la artritis.

Tabla 20

Método de tratamiento de células T		Diferenciación (%) en células Th17
Tratamiento con anti-CD3, anti-CD28, IL-6 y TGF- β	Tratamiento con bacterias del ácido láctico	
No tratadas	No tratadas	12,2

Método de tratamiento de células T		Diferenciación (%) en células Th17
Tratamiento con anti-CD3, anti-CD28, IL-6 y TGF- β	Tratamiento con bacterias del ácido láctico	
Tratadas	No tratadas	25,6
Tratadas	Tratadas con LC5	14,2
Tratadas	Tratadas con LC15	19,6
Tratadas	Tratadas con LC17	17,9
Tratadas	Tratadas con LC25	18,2
Tratadas	Tratadas con LC27	15,1
Tratadas	Tratadas con LC28	14,9
Tratadas	Tratadas con LC55	18,8
Tratadas	Tratadas con LC65	17,9
Tratadas	Tratadas con LC67	15,9
Tratadas	Tratadas con LC68	15,7
Tratadas	Tratadas con LC5+LC67	14,2
Tratadas	Tratadas con LC5+LC68	14,5
Tratadas	Tratadas con LC27+LC67	13,9
Tratadas	Tratadas con LC27+LC68	14,4
Tratadas	Tratadas con LC28+LC67	14,1

Tabla 21

Método de tratamiento de células T		Diferenciación (%) en células Treg
Tratamiento con anti-CD3 y anti-CD28	Tratamiento con bacterias del ácido láctico	
No tratadas	No tratadas	9,1
Tratadas	No tratadas	11,4
Tratadas	Tratadas con LC5	22,9
Tratadas	Tratadas con LC15	15,8
Tratadas	Tratadas con LC17	16,9
Tratadas	Tratadas con LC25	18,4
Tratadas	Tratadas con LC27	21,8
Tratadas	Tratadas con LC28	21,4
Tratadas	Tratadas con LC55	19,5
Tratadas	Tratadas con LC65	19,2
Tratadas	Tratadas con LC67	21,6
Tratadas	Tratadas con LC68	20,5
Tratadas	Tratadas con LC5+LC67	21,8
Tratadas	Tratadas con LC5+LC68	21,8
Tratadas	Tratadas con LC27+LC67	22,0
Tratadas	Tratadas con LC27+LC68	21,5
Tratadas	Tratadas con LC28+LC67	21,9

6. Evaluación *in vivo* de los efectos antiinflamatorios y calmantes de la colitis de las bacterias del ácido láctico

(1) Animales de prueba

Los ratones macho C57BL/6 de 5 semanas de edad (24-27 g) se adquirieron en OrientBio y se alojaron en condiciones ambientales controladas (humedad: 50 ± 10 %, temperatura: 25 ± 2 °C, ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad), y luego se utilizaron en el experimento. Como alimento, se utilizó alimento experimental estándar (Samyang, Corea), y los animales tuvieron acceso a agua potable *ad libitum*. En todos los experimentos, un grupo consistía en 6 animales.

(2) Inducción de colitis por TNBS y administración de muestras

Un grupo de los animales de prueba se utilizó como grupo normal y los animales de prueba de los otros grupos se trataron con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) para inducir una colitis aguda. Específicamente, se anestesió ligeramente a los animales de prueba con éter y, a continuación, se administró una disolución de mezcla de 2,5 g de TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico) y 100 ml de etanol al 50 % en el colon a través del ano en una cantidad de 0,1 ml cada vez mediante el uso de una jeringa de punta redonda de 1 ml, y se levantó a los ratones verticalmente y se mantuvo durante 30 segundos, induciendo así la inflamación. Por otro lado, al grupo normal se le administró por vía oral 0,1 ml de disolución salina. Al día siguiente, las bacterias del ácido láctico o la mezcla de bacterias del ácido láctico como una muestra de prueba se suspendieron en disolución salina y se administraron por vía oral a cada ratón en una cantidad de $2,0 \times 10^9$ UFC. Al día siguiente del final de la administración de la muestra, se sacrificó a los animales con dióxido de carbono y se diseccionó y utilizó una porción de colon que abarcaba desde el ciego hasta el lugar situado justo antes del ano. Mientras tanto, a los animales de prueba del grupo normal se les administró por vía oral disolución salina sola en lugar de las bacterias del ácido láctico. Además, a los animales de prueba del grupo de control negativo se les administró por vía oral disolución salina sola en lugar de las bacterias del ácido láctico tras la inducción de colitis por TNBS. Además, a los animales de prueba del grupo de control positivo se les administró por vía oral 50 mg/kg de sulfasalazina, que es un fármaco para tratar la colitis, en lugar de las bacterias del ácido láctico.

(3) Análisis macroscópico del colon

Se observaron la longitud y la apariencia del colon disecado, y se analizó la apariencia puntuando según los criterios (Hollenbach et al., 2005, Criteria for Degree of Colitis) que se muestran a continuación en la Tabla 22. Tras la eliminación completa del contenido del colon, el tejido del colon se lavó con disolución salina. Una parte del tejido de colon lavado se fijó con una disolución de formaldehído al 4 % para utilizarla como muestra de tejido patológico, y el resto se utilizó para el análisis biológico molecular mientras se congelaba a -80 °C.

Tabla 22

Puntaje macroscópico	Criterio
0	Se encuentra cualquier úlcera e inflamación.
1	Se detecta congestión sin hemorragia.
2	Se encuentra una úlcera con congestión.
3	Se encuentra inflamación en un solo sitio.
4	Se encuentran úlcera e inflamación en dos o más sitios.
5	La úlcera ha aumentado de tamaño 2 cm o más.

(4) Medición de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO)

Se homogeneizaron 100 mg de tejido de colon en 200 μ l de disolución amortiguadora de fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0) que contenía 0,5 % de bromuro de hexadecil trimetilamonio. El tejido homogeneizado se centrifugó a $10,000 \times g$ y 4 °C durante 10 minutos, y se recolectó el sobrenadante. Se añadieron 50 μ l del sobrenadante a 0,95 ml de una disolución de reacción (que contenía 1,6 mM de tetrametilbencidina y 0,1 mM de H_2O_2) y se dejaron reaccionar a 37 °C, y se midió la absorbancia a 650 nm en varios puntos temporales durante la reacción. Para calcular la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), se utilizó 1 μ mol/ml de peróxido producido por la reacción como 1 unidad.

(5) Medición del marcador inflamatorio

Mediante un método de inmunotransferencia tipo Western, se midieron marcadores inflamatorios, tales como p-p65, p65, iNOS, COX-2 y β -actina. Específicamente, de acuerdo con el mismo método que el experimento de medición de la actividad mieloperoxidasa (MPO), se obtuvo un sobrenadante. Se tomaron 50 μ g del sobrenadante y se electroforizaron en gel de poliacrilamida SDS 10 % (p/v) durante 1 hora y 30 minutos. La muestra electroforizada se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en condiciones de 100 V y 400 mA durante 1 hora y 10 minutos. La membrana de nitrocelulosa transferida a la muestra se bloqueó con leche desnatada al 5 % durante

30 minutos, y después se lavó tres veces con PBS-Tween durante 5 minutos cada vez, y se incubó con una dilución 1:100 de anticuerpo primario (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) durante toda la noche. A continuación, se lavó la membrana tres veces durante 10 minutos cada vez y se incubó con una dilución 1:1000 de anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) durante 1 hora y 20 minutos. A continuación, se lavó la membrana tres veces durante 15 minutos cada vez, se reveló por fluorescencia y se visualizó.

Además, se midieron las citocinas relacionadas con la inflamación, tales como TNF- α , IL-17, IL-10 y similares, mediante un kit ELISA.

(6) Análisis de marcadores inmunorreguladores

El colon diseccionado se lavó dos veces con 2,5 mM disolución de EDTA. El colon lavado se agitó en medio RPMI con 1 mg/ml de colagenasa tipo VIII (Sigma) a 30 °C durante 20 minutos y se filtró para separar la lámina propia. A continuación, la lámina propia se trató con una disolución de percoll al 30-100 % y se centrifugó para separar las células T. Las células T separadas se tiñeron con anticuerpos anti-FoxP3 o anti-IL-17A, y se analizó la distribución de células Th17 y Treg mediante un sistema FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) (Sistema C6 FlowCytometer®, San Jose, CA, EE. UU.).

(7) Resultados experimentales

La Tabla 23 muestra los efectos de las bacterias del ácido láctico sobre el peso del colon, la apariencia del colon, la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) y el contenido de citocinas relacionadas con la inflamación, cuando se administraron las bacterias del ácido láctico a los animales modelo que padecían colitis aguda inducida por TNBS. Como se muestra en la Tabla 23, los animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS mostraron una reducción de peso, un menor puntaje macroscópico del colon, una reducción de la longitud del colon y un aumento de la actividad de MPO. Sin embargo, cuando se administraron las bacterias del ácido láctico a los animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, todos estos marcadores mejoraron. En particular, la administración de *Bifidobacterium longum* LC67 sola o la administración de una mezcla de *Bifidobacterium longum* LC67 y *Lactobacillus plantarum* LC5 mostró un efecto muy excelente en el alivio de la colitis. Además, los animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS mostraron un aumento de los niveles de TNF- α e IL-17 y una disminución de los niveles de IL-10. Sin embargo, cuando se administraron las bacterias del ácido láctico a los animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, todos estos marcadores mejoraron. En particular, cuando se administró *Bifidobacterium longum* LC67 sola o una mezcla de *Bifidobacterium longum* LC67 y *Lactobacillus plantarum* LC5, los niveles de TNF- α e IL-17 disminuyeron en gran medida y los niveles de IL-10 aumentaron considerablemente.

Tabla 23

Grupos de prueba	Aumento de peso (g)	Puntaje macroscópico	Longitud del colon (cm)	Actividad MPO (μ U/mg)	TNF- α (pg/mg)	IL-17 (pg/mg)	IL-10 (pg/mg)
Grupo normal	0,64	5,9	0,14	0,42	35,1	18,4	61,2
Grupo de control negativo	-2,46	4,2	2,32	1,54	95,5	65,2	30,7
Grupo con administración de LC5	-1,90	4,65	1,30	0,91	75,5	52,8	43,9
Grupo con administración de LC27	-1,0	4,56	1,08	0,82	67,2	50,4	44,0
Grupo con administración de LC67	-0,28	4,92	0,50	0,43	48,5	38,5	54,6
Grupo con administración de LC 68	-1,02	4,5	1,34	1,04	54,4	50,5	48,1
Grupo con administración de LC5+LC67	-0,3	5,08	0,84	0,42	45,1	37,3	55,3
Grupo con administración de LC27+LC68	-1,15	4,8	1,17	0,78	59,8	45,0	50,0
Grupo de control positivo	-0,91	4,58	1,43	0,95	58,2	48,5	45,5

La FIG. 22 muestra los patrones de diferenciación de las células T en células Th17, que indican el efecto de las

bacterias del ácido láctico en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS; y la FIG. 23 muestra los patrones de diferenciación de las células T en células Treg, que indican el efecto de las bacterias del ácido láctico en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS. En las Figuras 22 y 23, "NOR" indica un grupo normal; "TNBS" indica un grupo de control negativo; "LC5" indica un grupo con administración de *Lactobacillus plantarum* LC5; "LC27" indica un grupo con administración de *Lactobacillus plantarum* LC27; "LC67" indica un grupo con administración de *Bifidobacterium longum* LC67; "LC68" indica un grupo con administración de *Bifidobacterium longum* LC68; "LC5+LC67" indica un grupo con administración de una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Lactobacillus plantarum* LC5 y *Bifidobacterium longum* LC67 en la misma cantidad; "LC27+LC68" indica un grupo con administración de una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Lactobacillus plantarum* LC27 y *Bifidobacterium longum* LC68 en la misma cantidad; y "SS" indica un grupo con administración de sulfasalazina. Como se muestra en la FIGS. 22 y 23, en el caso de los animales con colitis aguda inducida por TNBS, se promovió la diferenciación de las células T en células Th17 y se inhibió la diferenciación de las células T en células Treg. Sin embargo, cuando se administraron las bacterias del ácido láctico a los animales con colitis aguda inducida por TNBS, se inhibió la diferenciación de las células T en células Th17 y se promovió la diferenciación de las células T en células Treg. En particular, cuando se administró *Bifidobacterium longum* LC67 sola o una mezcla de *Bifidobacterium longum* LC67 y *Lactobacillus plantarum* LC5, se inhibió significativamente la diferenciación de las células T en células Th17 y se promovió significativamente la diferenciación de las células T en células Treg.

La FIG. 24 muestra marcadores de respuesta inflamatoria que indican el efecto de las bacterias del ácido láctico en animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS. En la FIG. 24, "Nor" indica un grupo normal; "T" indica un grupo de control negativo; "LC5" indica un grupo con administración de *Lactobacillus plantarum* LC5; "LC27" indica un grupo con administración de *Lactobacillus plantarum* LC27; "LC67" indica un grupo con administración de *Bifidobacterium longum* LC67; "LC68" indica un grupo con administración de *Bifidobacterium longum* LC68; "LC5+LC67" indica un grupo con administración de una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Lactobacillus plantarum* LC5 y *Bifidobacterium longum* LC67 en la misma cantidad; "LC27+LC68" indica un grupo con administración de una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Lactobacillus plantarum* LC27 y *Bifidobacterium longum* LC68 en la misma cantidad, y "SS" indica un grupo con administración de sulfasalazina. Como se muestra en la FIG. 24, en el caso de los animales modelo con colitis aguda inducida por TNBS, se activó el NF- κ B (p-p65) y aumentaron los niveles de expresión de COX-2 e iNOS. Sin embargo, cuando se administraron las bacterias del ácido láctico, se inhibió la activación de NF- κ B (p-p65) y también disminuyeron los niveles de expresión de COX-2 e iNOS. En particular, la administración de *Bifidobacterium longum* LC67 sola o la administración de una mezcla de *Bifidobacterium longum* LC67 y *Lactobacillus plantarum* LC5 mostraron excelentes efectos sobre la inhibición de la activación de NF- κ B (p-p65) y sobre la inhibición de la expresión de COX-2 e iNOS.

7. Evaluación *in vivo* del efecto de las bacterias del ácido láctico en el alivio de la úlcera gástrica inducida por alcohol

(1) Animales de prueba

Los ratones macho C57BL/6 de 5 semanas de edad (24-27 g) se adquirieron en OrientBio y se alojaron en condiciones ambientales controladas (humedad: 50 $\pm$ 10 %, temperatura: 25 $\pm$ 2 °C, ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad), y luego se utilizaron en el experimento. Como alimento, se utilizó alimento experimental estándar (Samyang, Corea), y los animales tuvieron acceso a agua potable *ad libitum*. En todos los experimentos, un grupo consistía en 6 animales.

(2) Inducción de úlcera gástrica por alcohol y administración de muestra

A un grupo de prueba se le administraron por vía oral 1 $\times$ 10⁹ UFC de *Lactobacillus plantarum* LC27 suspendidas en disolución salina una vez al día durante 3 días. A otro grupo de prueba se le administraron por vía oral 1 $\times$ 10⁹ UFC de *Bifidobacterium longum* LC67 suspendidas en disolución salina una vez al día durante 3 días. A otro grupo de prueba se le administraron por vía oral 1 $\times$ 10⁹ UFC de una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Lactobacillus plantarum* LC27 y *Bifidobacterium longum* LC67 en la misma cantidad, una vez al día durante 3 días, después de suspenderla en disolución salina. Además, a un grupo normal y a un grupo de control negativo se les administró por vía oral 0,2 ml de disolución salina una vez al día durante 3 días. Después de administrar la muestra por vía oral durante 3 días, se ayunó a los ratones de prueba y se les privó de agua durante 18 horas. El día 4 del experimento, 1 hora después de la administración de la disolución salina, se administraron por vía oral 0,2 ml de etanol puro al 99 % a los ratones de todos los grupos de prueba distintos del grupo normal para inducirles una úlcera gástrica. Además, al grupo normal se le administraron 0,2 ml de disolución salina en lugar de etanol.

(3) Medición del marcador macroscópico relacionado con la lesión gástrica

3 horas después de la administración de etanol, se sacrificaron los ratones de prueba y se disecó el tejido gástrico, se dividió longitudinalmente y se lavó con disolución PBS (disolución salina amortiguada con fosfato) y, a

continuación, se observó visual o microscópicamente y se puntuó el grado de lesión gástrica (véase Park, S.W., Oh, T.Y., Kim, Y.S., Sim, H., et al., *Artemisia asiatica extracts protect against ethanol-induced injury in gastric mucosa of rats*. J. Gastroenterol. Hepatol. 2008, 23, 976-984).

5 (4) Medición de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO)

Se homogeneizaron 100 mg de gástrico en 200 µl de disolución amortiguadora de fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0) que contenía 0,5 % de bromuro de hexadecil trimetilamonio. A continuación, se centrifugó la disolución tisular a 10,000×g y 4 °C durante 10 minutos, y se recolectó el sobrenadante. Se añadieron 50 µl del sobrenadante a 0,95 ml de una disolución de reacción (que contenía 1,6 mM de tetrametilbencidina y 0,1 mM de H₂O₂) y se dejaron reaccionar a 37 °C, y se midió la absorbancia a 650 nm en varios puntos temporales durante la reacción. Para calcular la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), se utilizó 1 µmol/ml de peróxido producido por la reacción como 1 unidad.

15 (5) Medición de marcadores inflamatorios

Se aislaron 2 µg de ARNm del tejido gástrico mediante un miniequipo RNeasy de Qiagen y se sintetizaron en ADNc utilizando la Rtas Prime Script de Takara. A continuación, mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (termociclador Qiagen, agente premezclador Takara SYBER, condiciones de termociclado: activación de la ADN polimerasa durante 5 min a 95°, seguida de 40 ciclos de amplificación durante 10 s a 95 °C y durante 45 s a 60 °C), se midieron los niveles de expresión de CXCL4 [ligando 4 de la quimiocina (motivo C-X-C)] y TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa). La Tabla 24 muestra las secuencias cebadoras utilizadas para analizar cada citocina en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.

25 Tabla 24

Citocina a analizar	Tipo de cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador
TNF-α	Directo	5'-CTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'
	Inverso	5'-TTGAGATCCATGCCGTTG-3'
CXCL4	Directo	5'-AGTCCTGAGCTGCTGCTTCT-3'
	Inverso	5'-GATCTCCATCGCTTTCTTCG-3'

(6) Resultados experimentales

La FIG. 25 representa imágenes que muestran el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa estomacal de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en el segundo experimento de la presente invención; la FIG. 26 muestra el puntaje bruto de la lesión gástrica que indica el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa del estómago de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en el segundo experimento de la presente invención; la FIG. 27 muestra el índice de úlcera que indica el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa del estómago de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en el segundo experimento de la presente invención; y la FIG. 28 muestra el índice de actividad histológica que indica el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa estomacal de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en el segundo experimento de la presente invención. Además, la FIG. 29 muestra la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) que indica el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa del estómago de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en el segundo experimento de la presente invención. Adicionalmente, la FIG. 30 muestra los niveles de expresión de CXCL4 que indican el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa estomacal de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en el segundo experimento de la presente invención; y la FIG. 31 muestra los niveles de expresión de TNF-α que indican el efecto de las bacterias del ácido láctico en la mucosa estomacal de ratones con úlcera gástrica inducida por etanol, en el segundo experimento de la presente invención. En las Figuras 30 y 31, los niveles de expresión de CXCL4 y los niveles de expresión de TNF-α en los grupos de prueba distintos del grupo normal se expresan en cambios múltiples en relación con los niveles de expresión del grupo normal. En las Figuras 25 a 31, "Nor" indica un grupo normal; "Etanol" indica un grupo de control negativo con úlcera gástrica inducida por etanol y con administración de disolución salina como muestra; "Etanol+Ranitidina" indica un grupo de prueba con úlcera gástrica inducida por etanol y con administración de Ranitidina como muestra; "Etanol+LC27" indica un grupo de prueba con úlcera gástrica inducida por etanol y con administración de *Lactobacillus plantarum* LC27 como muestra; "Etanol+LC67" indica un grupo de prueba con úlcera gástrica inducida por etanol y con administración de *Bifidobacterium longum* LC67 como muestra; y "Etanol+LC27/LC67" indica un grupo de prueba con úlcera gástrica inducida por etanol y con administración de una mezcla de bacterias del ácido láctico, preparada mezclando *Lactobacillus plantarum* LC27 y *Bifidobacterium longum* LC67 en la misma cantidad, como muestra. Como se muestra en las FIGS. 25 a 29, *Bifidobacterium longum* LC67, *Lactobacillus plantarum* LC27 o una mezcla de las mismas aliviaron eficazmente la lesión gástrica o la úlcera gástrica inducida por el etanol. Además, como se muestra en las FIGS. 30 y 31, *Bifidobacterium longum* LC67, *Lactobacillus plantarum* LC27 o una mezcla de las mismas redujeron en gran medida los niveles de marcadores inflamatorios en los ratones que presentaban lesión gástrica o úlcera gástrica inducida por etanol.

8. Evaluación *in vivo* del efecto de las bacterias del ácido láctico en la atenuación de las lesiones hepáticas inducidas por alcohol

5 (1) Animales de prueba

Los ratones macho C57BL/6 de 5 semanas de edad (24-27 g) se adquirieron en OrientBio y se alojaron en condiciones ambientales controladas (humedad: 50±10 %, temperatura: 25±2 °C, ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad), y luego se utilizaron en el experimento. Como alimento, se utilizó alimento experimental estándar (Samyang, Corea), y los animales tuvieron acceso a agua potable *ad libitum*. En todos los experimentos, un grupo consistía en 6 animales.

(2) Inducción de lesiones hepáticas por alcohol y administración de muestra

A un grupo de prueba se le administraron por vía oral 1×10^9 UFC de *Lactobacillus plantarum* LC27 suspendidas en disolución salina una vez al día durante 3 días. A otro grupo de prueba se le administraron por vía oral 1×10^9 UFC de *Bifidobacterium longum* LC67 suspendidas en disolución salina una vez al día durante 3 días. A otro grupo de prueba se le administraron por vía oral 1×10^9 UFC de una mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando *Lactobacillus plantarum* LC27 y *Bifidobacterium longum* LC67 en la misma cantidad, una vez al día durante 3 días, después de suspenderla en disolución salina. A un grupo de control positivo se le administró por vía oral silimarina, un agente comercial para el tratamiento de lesiones hepáticas, una vez al día durante 3 días en una cantidad de 50 mg/kg. Además, a un grupo normal y a un grupo de control negativo se les administró por vía oral 0,1 ml de disolución salina una vez al día durante 3 días. 3 horas después de la administración oral de la muestra o de disolución salina, se administró etanol por vía intraperitoneal a los ratones de todos los grupos de prueba distintos del grupo normal en una cantidad de 6 mg/kg para inducir la lesión hepática. Además, al grupo normal se le administró por vía intraperitoneal disolución salina en lugar de etanol en una cantidad de 6 mg/kg. A continuación, se sometió a los ratones de prueba a ayuno y se les privó de agua durante 12 horas, después se sacrificaron y se extrajo sangre del corazón.

(3) Medición de los marcadores de la función hepática y resultados

La sangre extraída se dejó reposar a temperatura ambiente durante 60 minutos y se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos para separar el suero. Los niveles de GPT (transaminasa glutámica pirúvica) y GOT (transaminasa glutámica oxalacética) en el suero separado se midieron con un kit de ensayo sanguíneo (kit de medición de ALT y AST; Asan Pharm. Co., Corea), y los resultados de la medición se muestran a continuación en la Tabla 25. Como se muestra a continuación en la Tabla 25, *Bifidobacterium longum* LC67, *Lactobacillus plantarum* LC27 o una mezcla de las mismas aliviaron eficazmente la lesión hepática inducida por el etanol. En particular, *Bifidobacterium longum* LC67 mostró un mejor efecto que la silimarina, que es un agente comercial para el tratamiento de las lesiones hepáticas.

Tabla 25

Grupos de prueba	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)
Grupo normal	52,1	42,2
Grupo de control negativo	107,7	156,3
Grupo con administración de etanol y LC27	82,3	95,4
Grupo con administración de etanol y LC67	62,5	65,8
Grupo con administración de etanol y LC27/LC67	71,4	78,3
Grupo con administración de etanol y silimarina	79,5	87,5
* LC27: <i>Lactobacillus plantarum</i> LC27 * LC67: <i>Bifidobacterium longum</i> LC67 * LC27/LC67: mezcla de bacterias del ácido láctico preparada mezclando <i>Lactobacillus plantarum</i> LC27 y <i>Bifidobacterium longum</i> LC67 en la misma cantidad.		

Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente con referencia a los ejemplos, el alcance de la presente invención no se limita a estos ejemplos. Por lo tanto, el ámbito de protección de la presente invención debe interpretarse de forma que incluya todas las realizaciones comprendidas en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. *Lactobacillus plantarum* LC27 (número de acceso: KCCM 11801P).
- 5 2. Una composición que comprende *Lactobacillus plantarum* LC27 (número de acceso: KCCM 11801P) o un cultivo de *Lactobacillus plantarum* LC27 para su uso en la prevención o el tratamiento de una o más enfermedades seleccionadas de un grupo que consiste en daños intestinales, lesiones hepáticas, enfermedades alérgicas y enfermedades inflamatorias.
- 10 3. La composición para su uso de conformidad con la reivindicación 2, en donde la composición comprende además una o más bacterias del ácido láctico seleccionadas de un grupo formado por *Lactobacillus brevis* CH23 (número de acceso: KCCM 11762P), *Bifidobacterium longum* CH57 (número de acceso: KCCM 11764P), *Lactobacillus plantarum* LC5 (número de acceso: KCCM 11800P) y *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P).
- 15 4. La composición de uso de conformidad con la reivindicación 2, en donde la composición comprende además *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P), un cultivo de *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P), un lisado de *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P) o un extracto de *Bifidobacterium longum* LC67 (número de acceso: KCCM 11802P) para su uso en la
- 20 prevención o el tratamiento de una o más enfermedades seleccionadas de un grupo que consiste en lesiones hepáticas, enfermedades alérgicas y enfermedades inflamatorias.
- 5 5. La composición de uso de conformidad con la reivindicación 2, en donde el daño intestinal es el síndrome de permeabilidad intestinal.
- 25 6. La composición de uso de conformidad con la reivindicación 2, en donde la lesión hepática se selecciona del grupo que consiste en hepatitis, hígado graso y cirrosis hepática.
- 30 7. La composición de uso de conformidad con la reivindicación 2, en donde la enfermedad alérgica se selecciona del grupo que consiste en dermatitis atópica, asma, faringitis y dermatitis crónica.
8. La composición de uso de conformidad con la reivindicación 2, en donde la enfermedad inflamatoria se selecciona de un grupo que consiste en gastritis, úlcera gástrica, colitis y artritis.

DIBUJOS

Figura 1

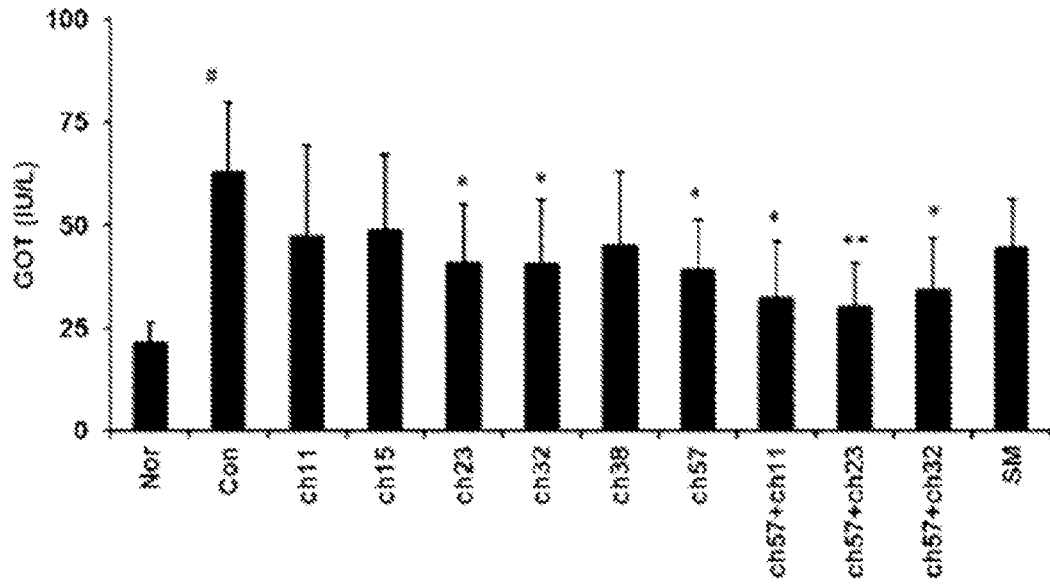


Figura 2

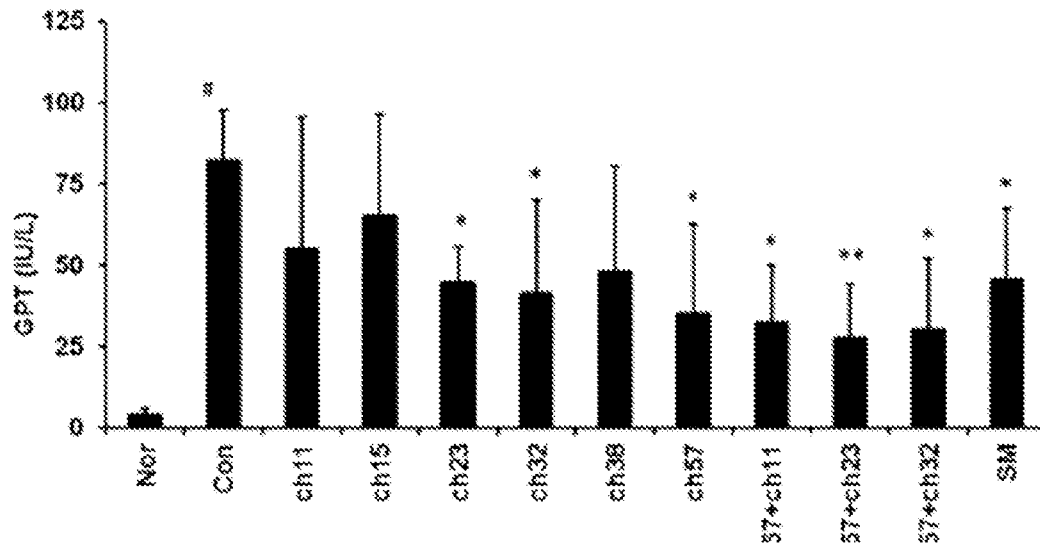


Figura 3

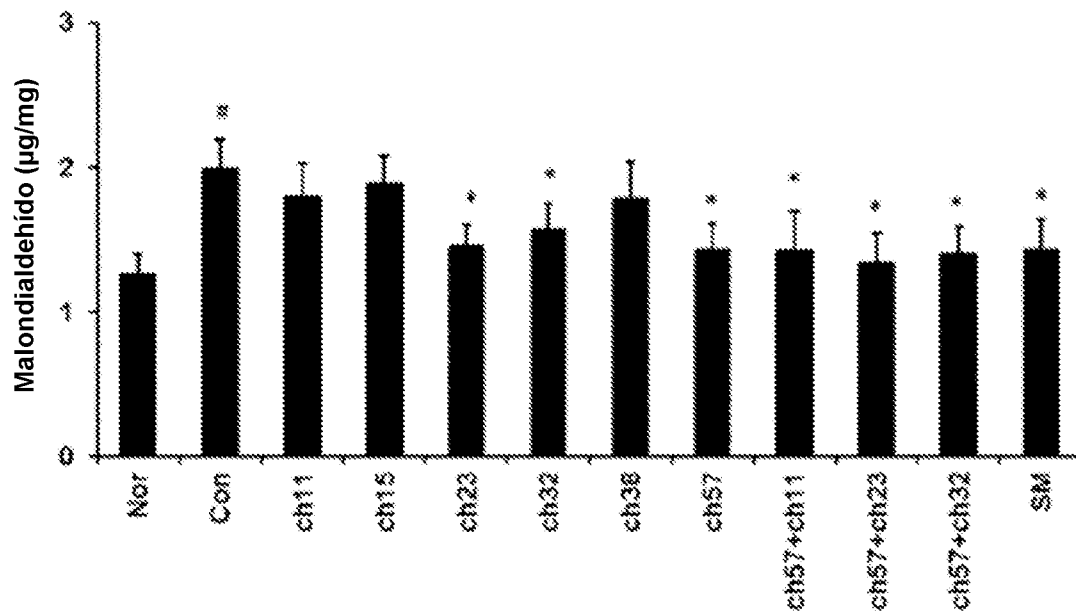


Figura 4

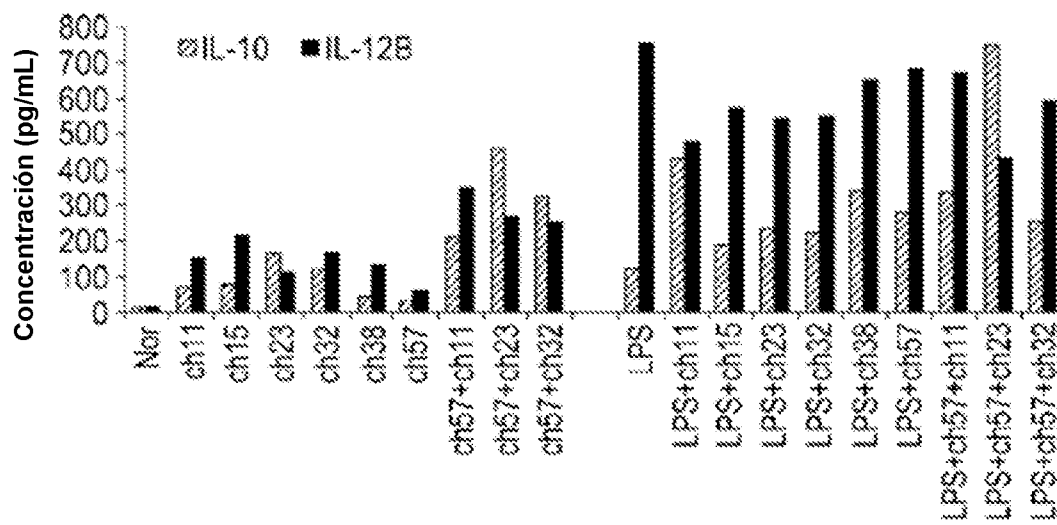


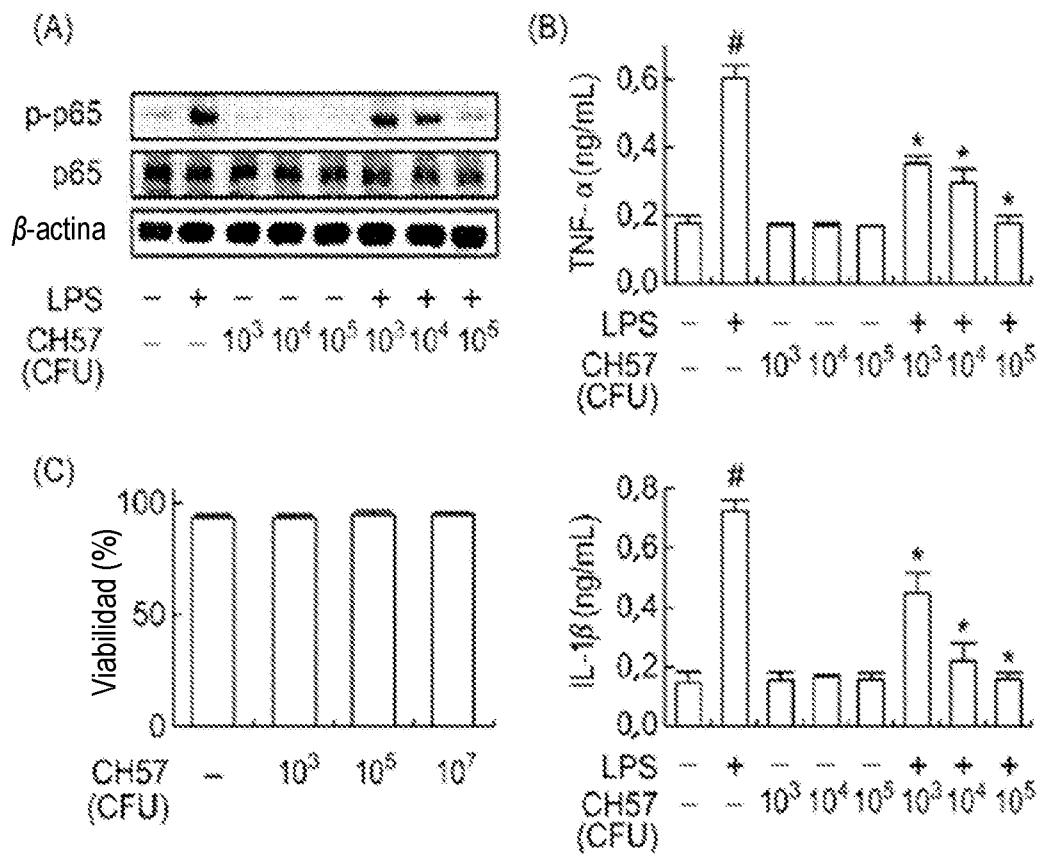
Figura 5

Figura 6

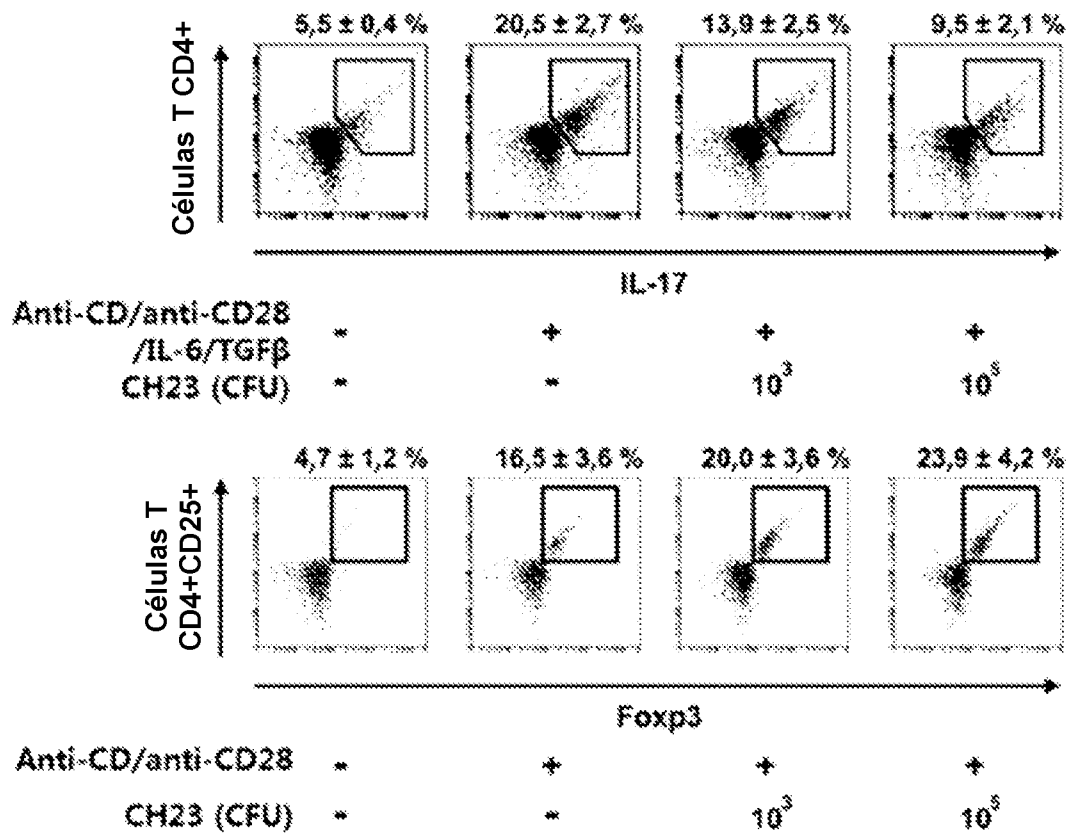


Figura 7

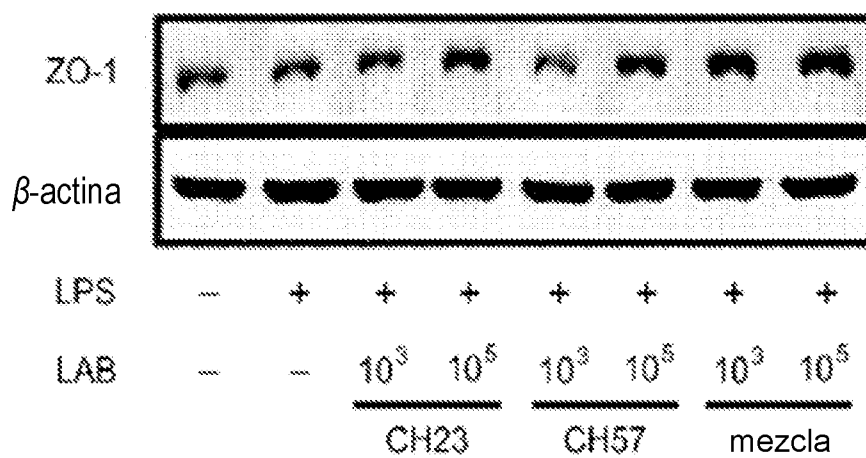


Figura 8

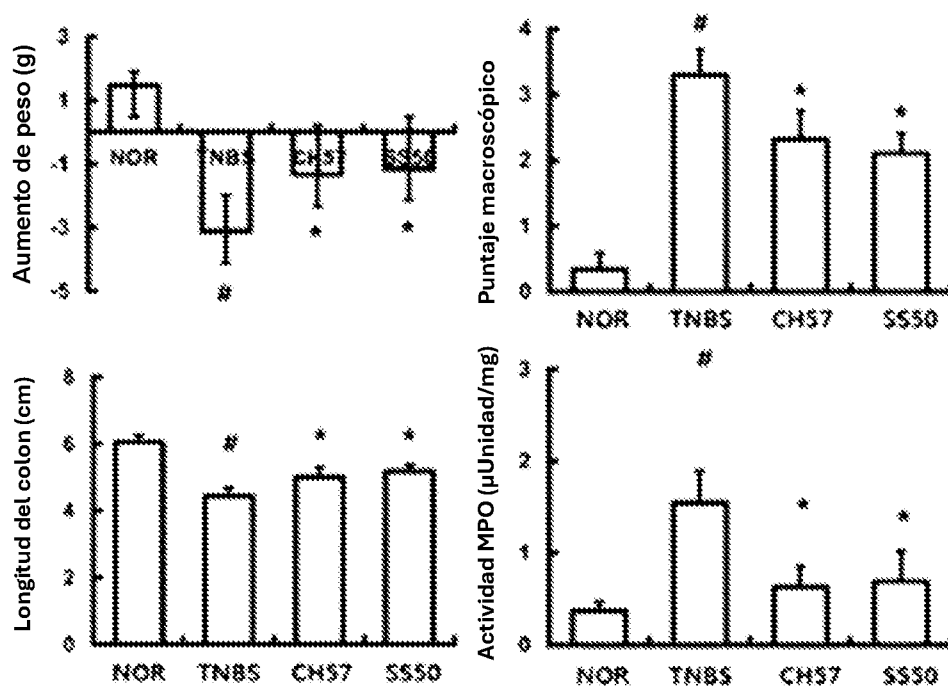


Figura 9

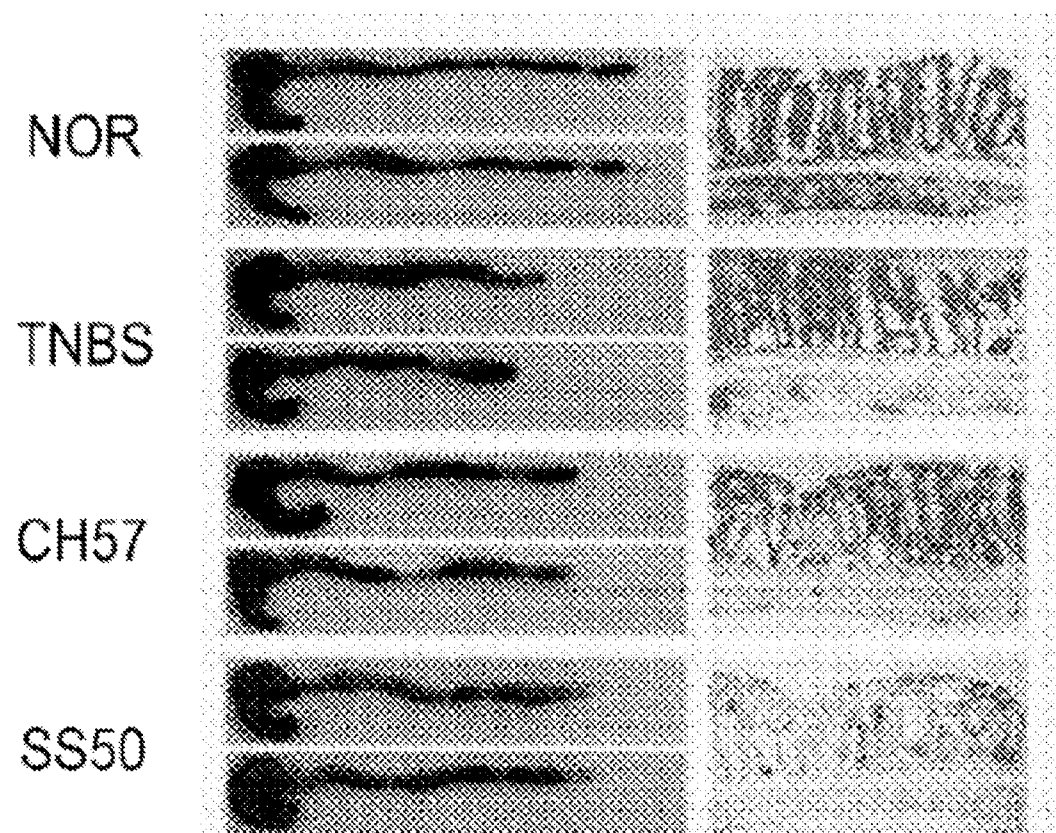


Figura 10

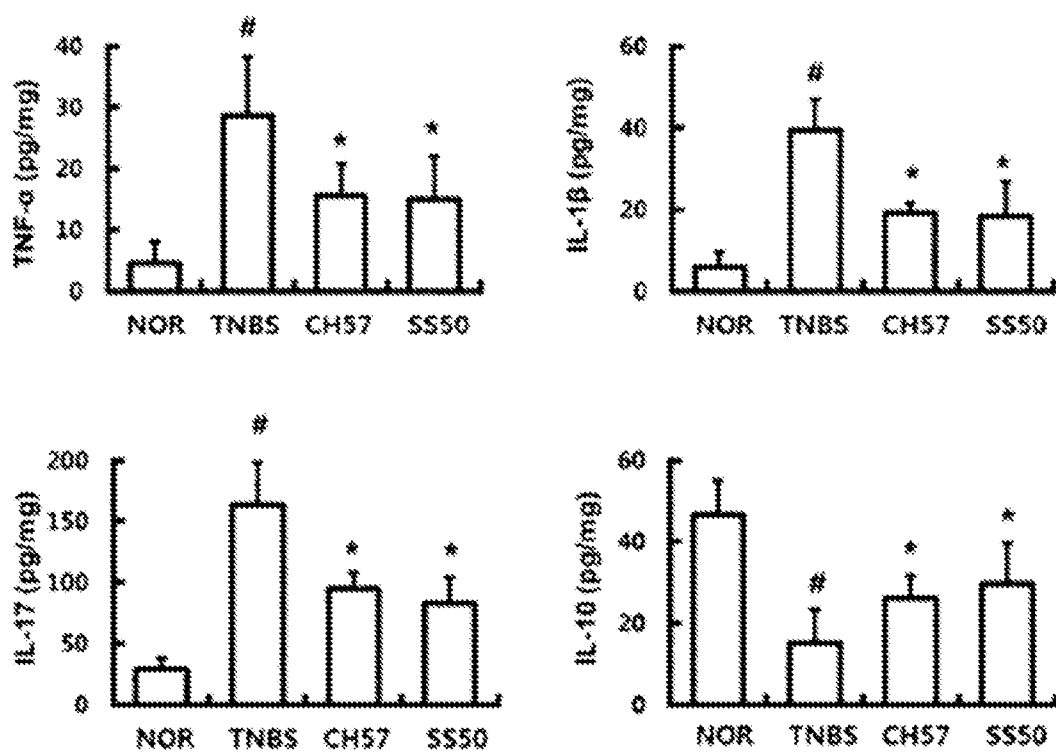


Figura 11

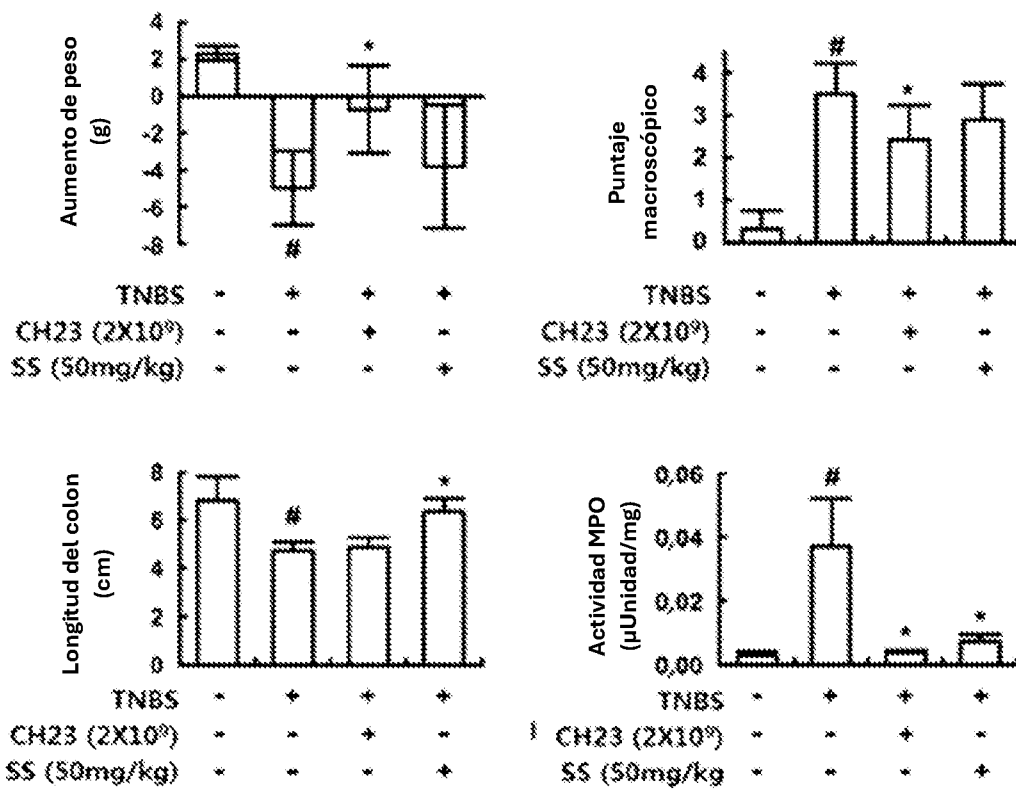


Figura 12

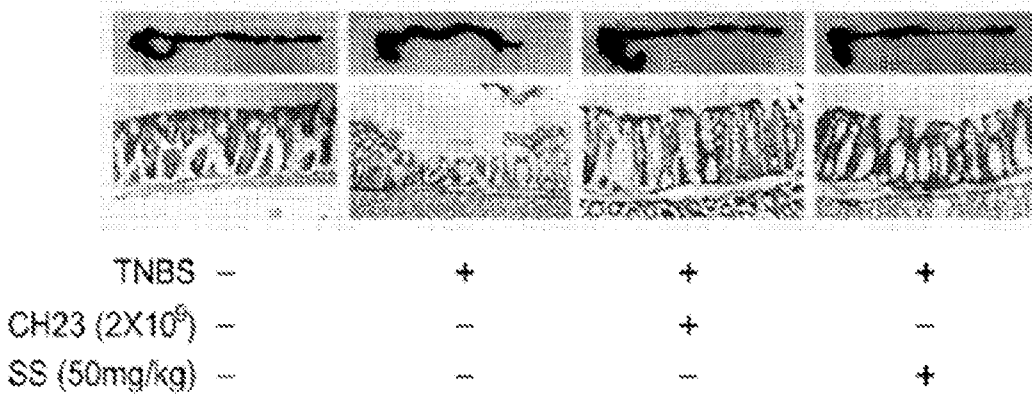


Figura 13

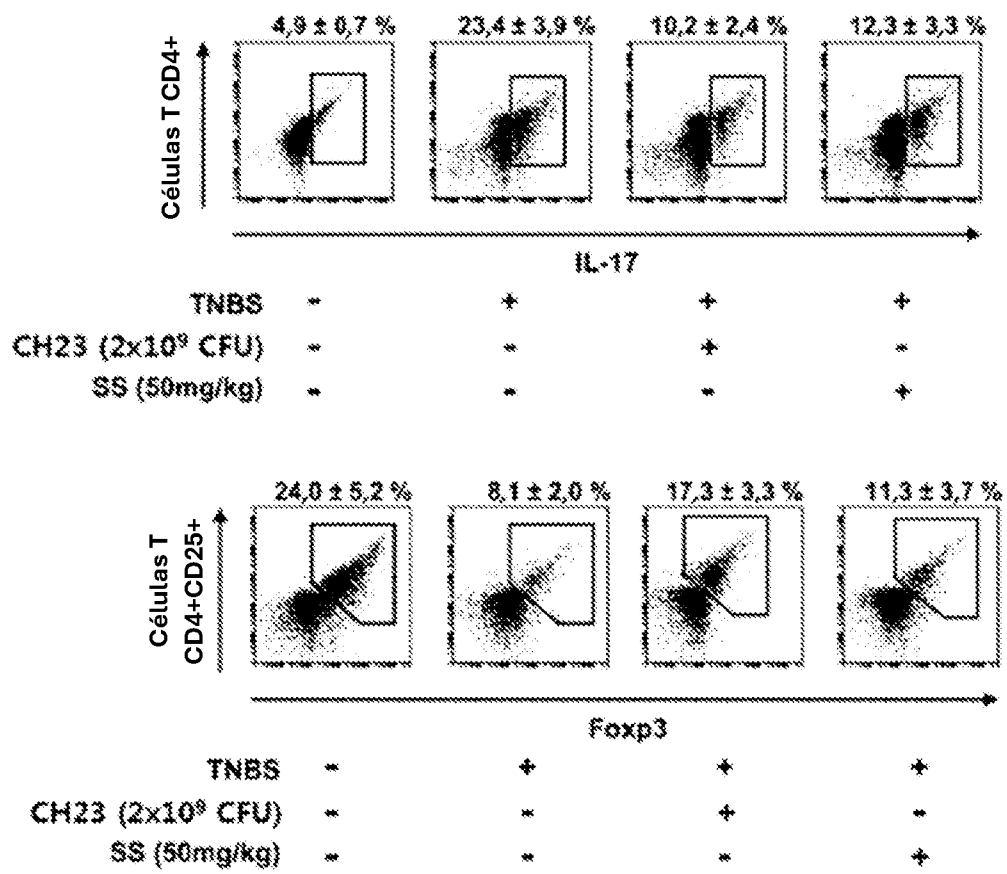


Figura 14

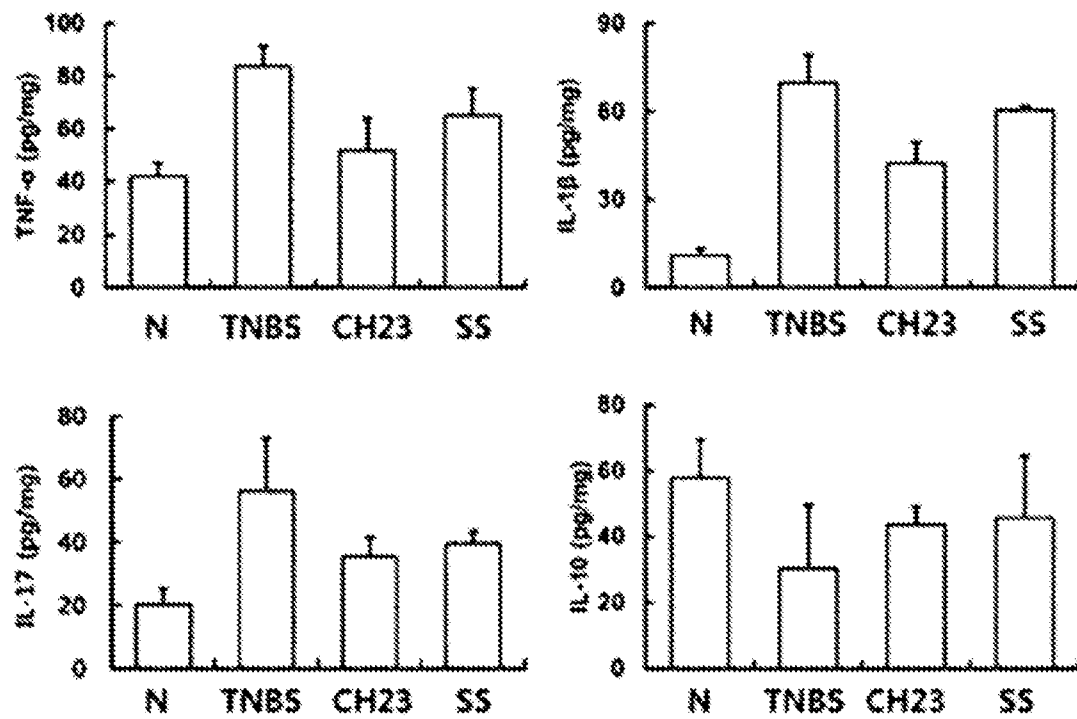


Figura 15

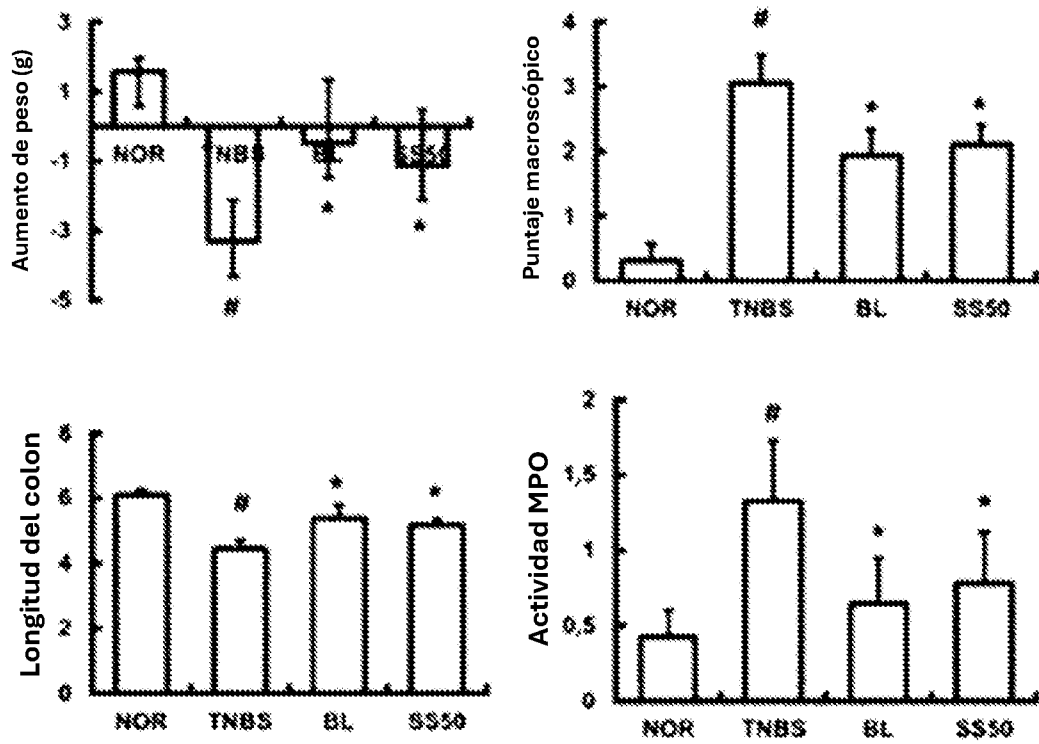


Figura 16

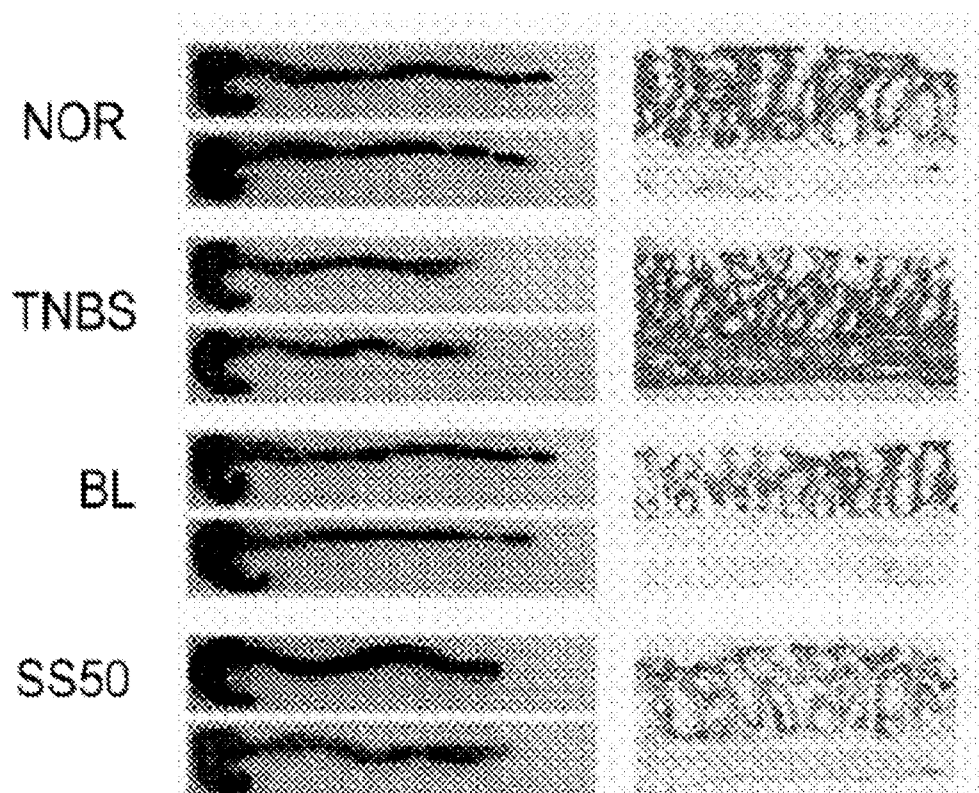


Figura 17

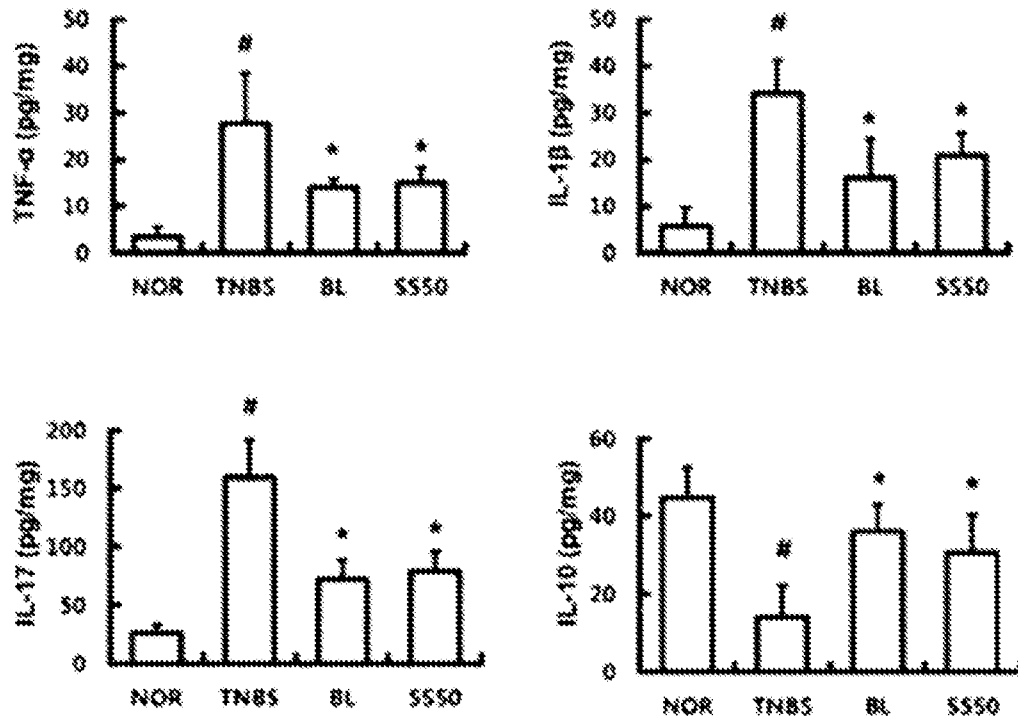


Figura 18

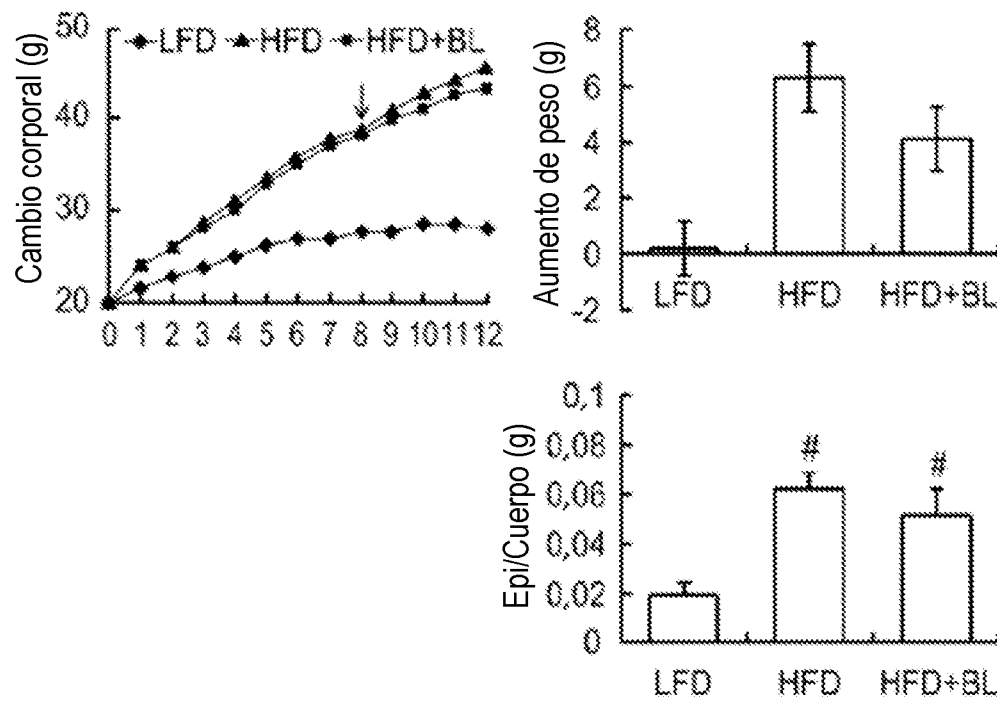


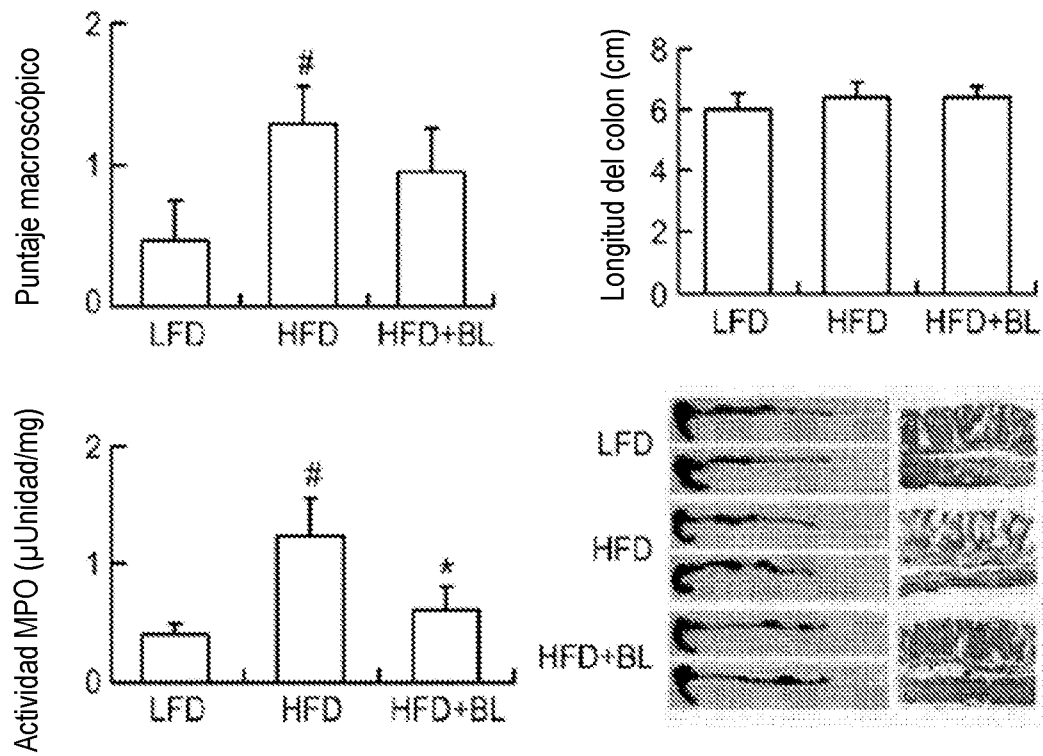
Figura 19

Figura 20

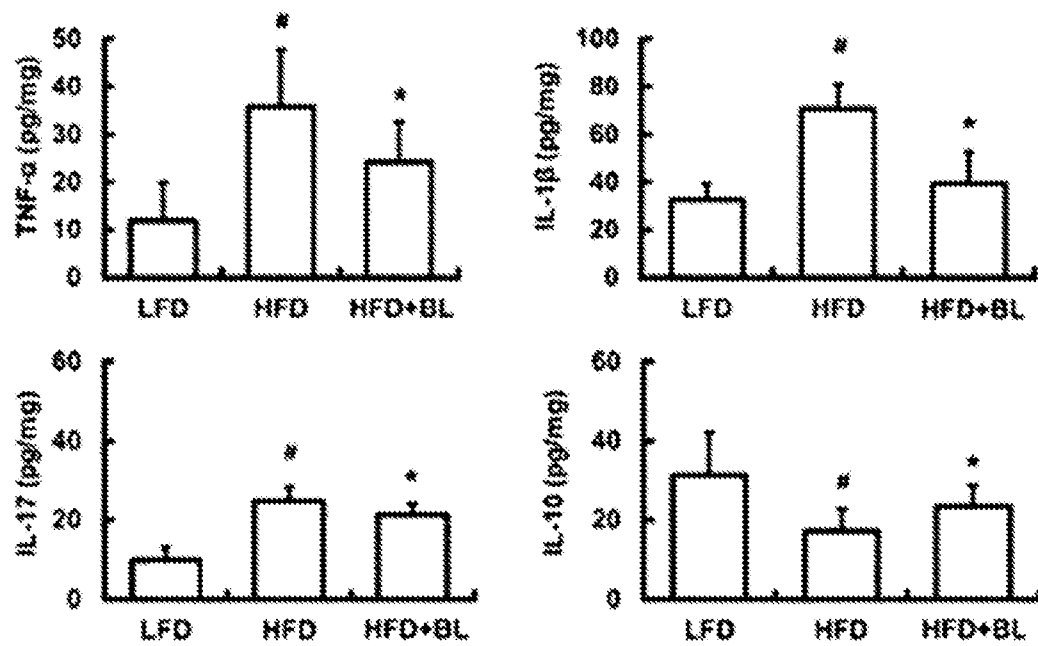


Figura 21

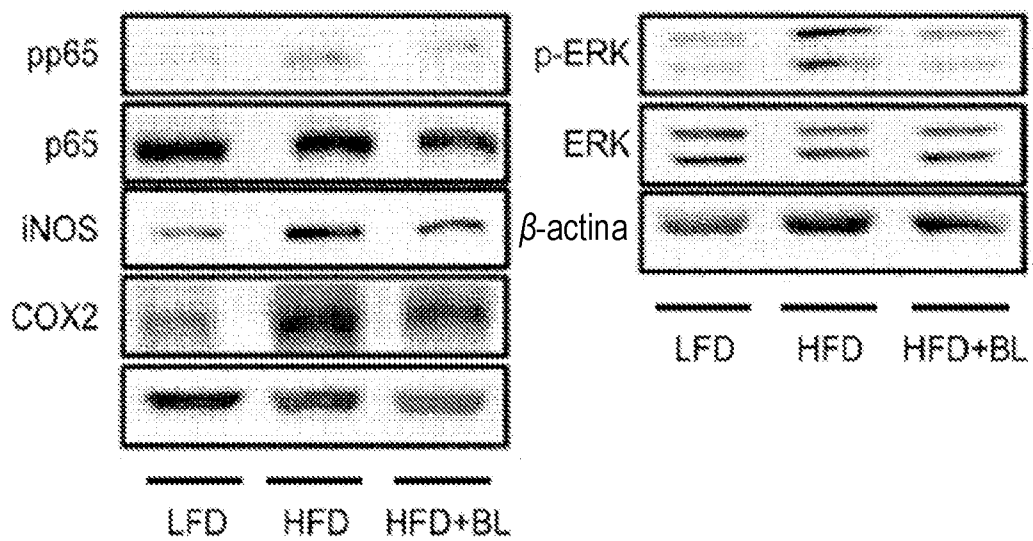


Figura 22

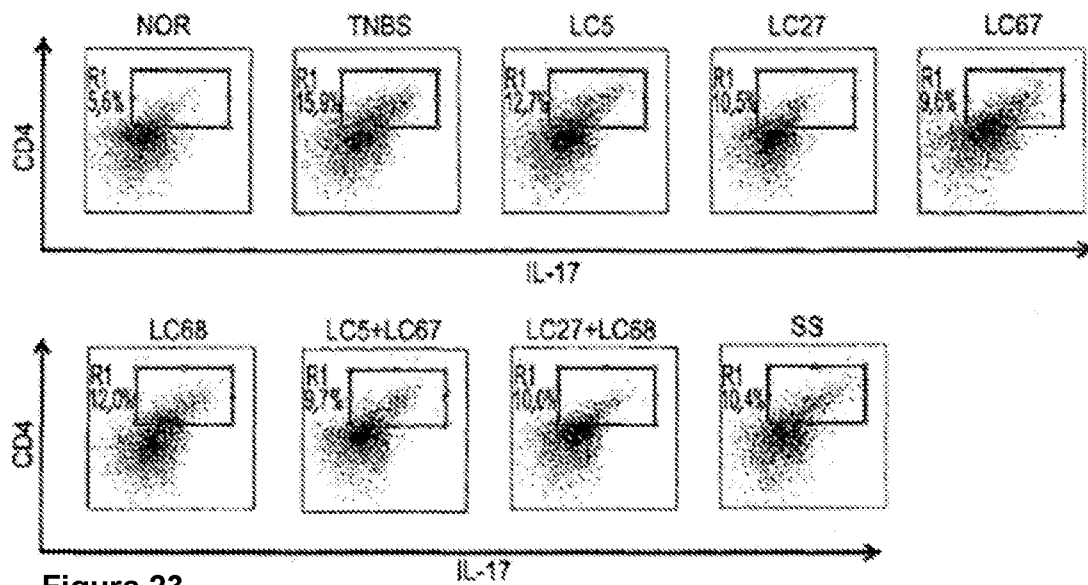


Figura 23

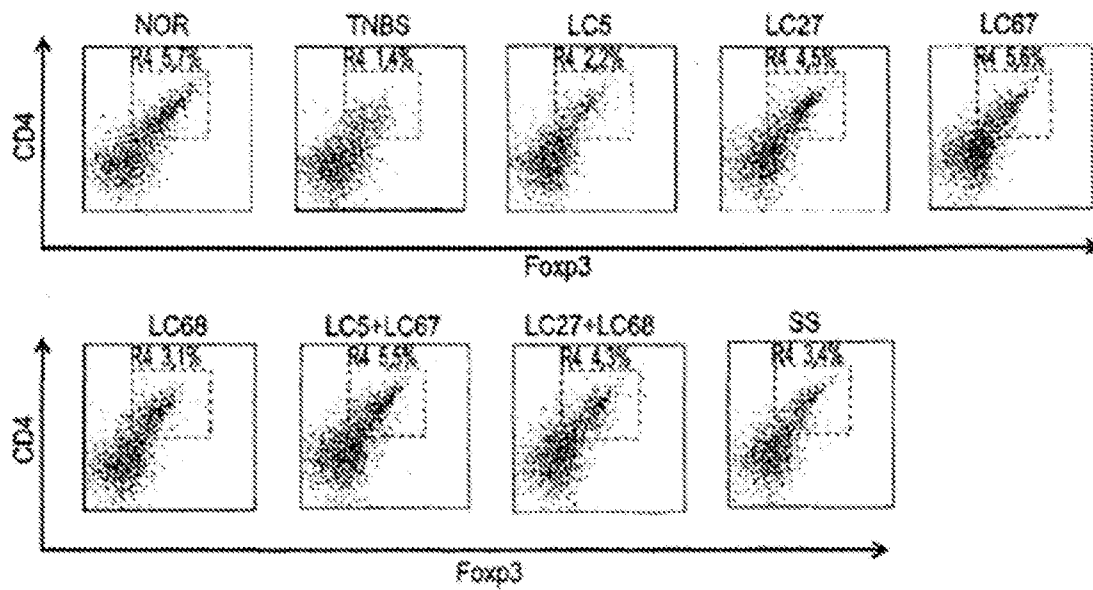


Figura 24

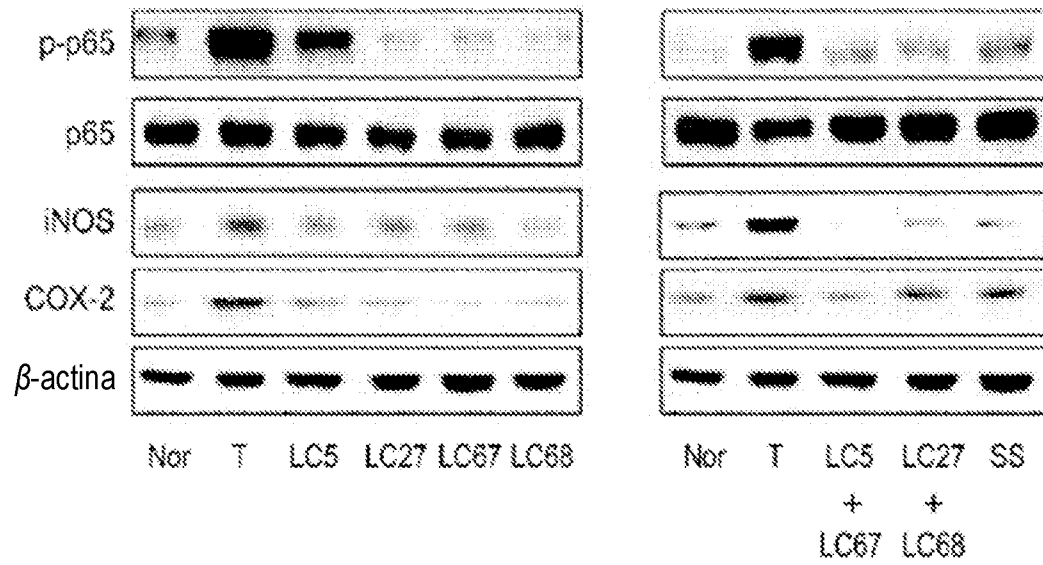


Figura 25

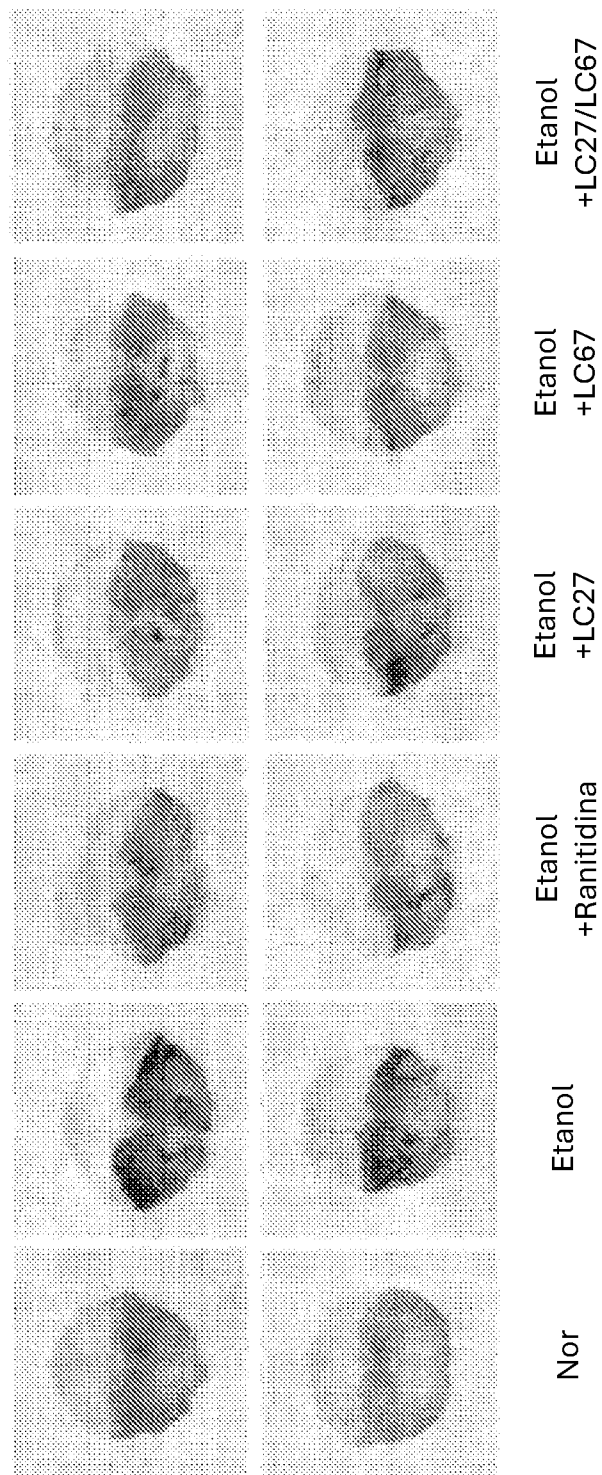


Figura 26

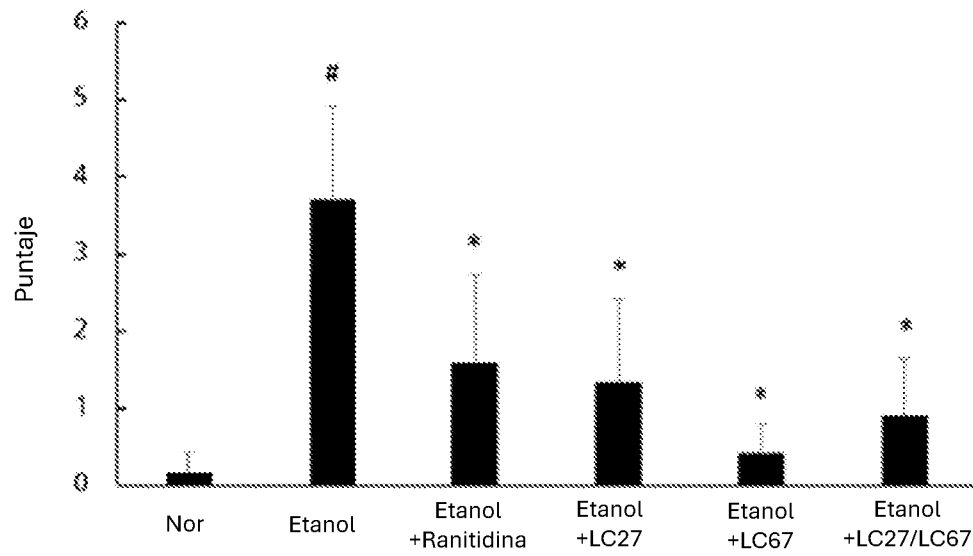


Figura 27

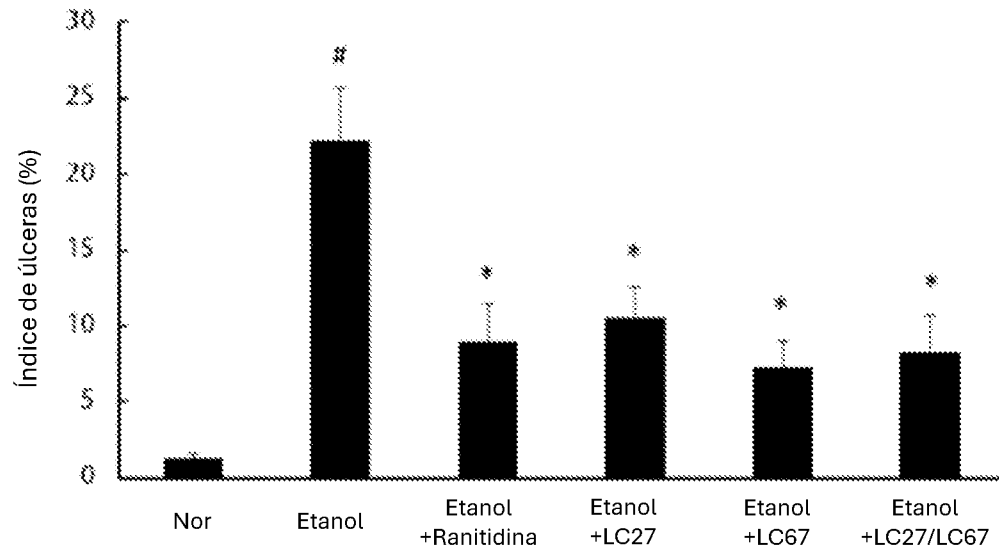


Figura 28

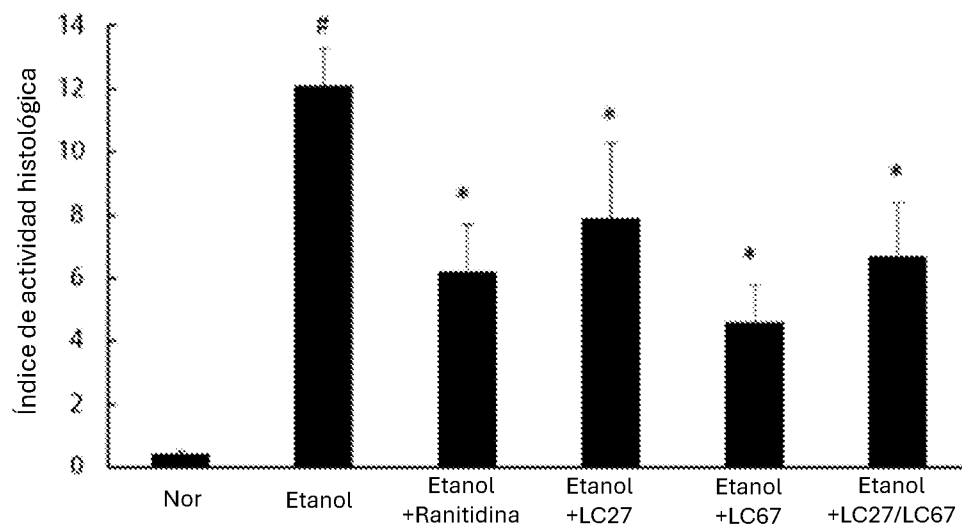


Figura 29

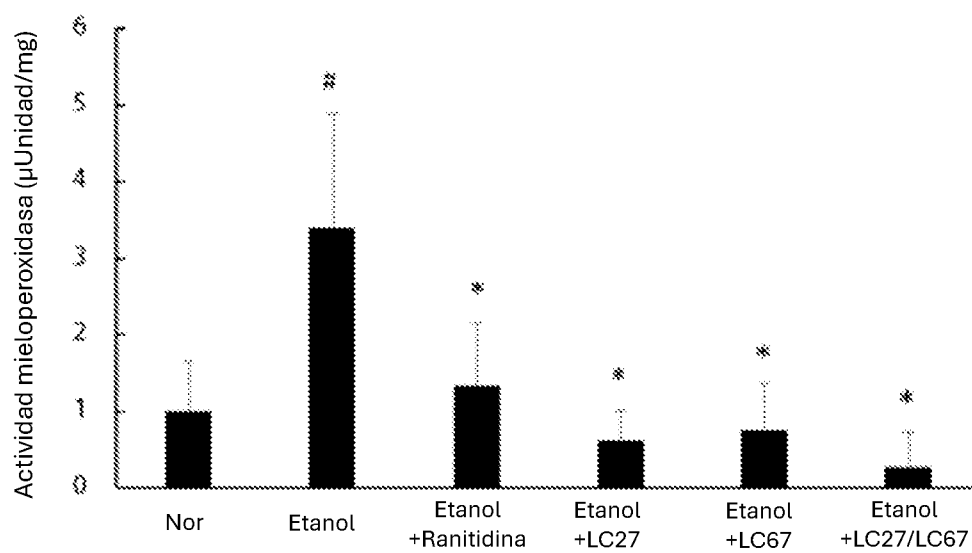


Figura 30

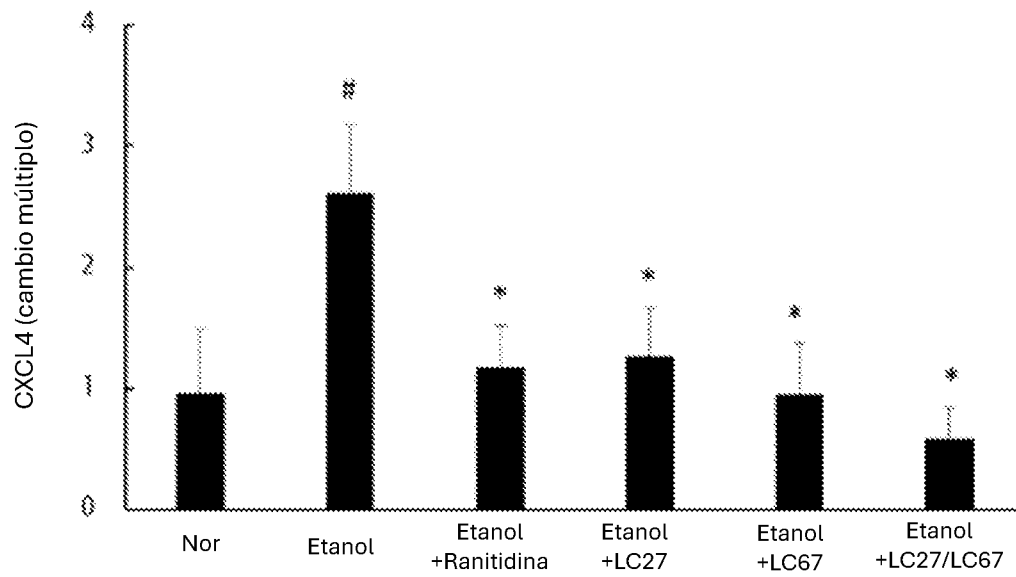


Figura 31

