



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **PI0615785-8 A2**

(22) Data de Depósito: 07/09/2006
(43) Data da Publicação: 24/05/2011
(RPI 2107)



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

(54) Título: **INIBIDOR DA ABSORÇÃO DE COLESTEROL**

(30) Prioridade Unionista: 08/09/2005 JP 2005-260401

(73) Titular(es): KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA

(72) Inventor(es): FUMIYASU ISHIKAWA, HIROKO HAYAKAWA, TOHRU IINO

(74) Procurador(es): NELLIE ANNE DANIEL SHORES

(86) Pedido Internacional: PCT JP2006317748 de 07/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/029773 de 15/03/2007

(57) Resumo: INIBIDOR DA ABSORÇÃO DE COLESTEROL. É relatado uma bactéria pertencente ao gênero Bifidobacterium que apresenta uma excelente habilidade de sobreviver em trato digestivo, tem um efeito de inibir a absorção de colesterol no trato intestinal, é excelente na melhora do metabolismo de lipídio (por exemplo, um efeito de reduzir o nível de colesterol no sangue) e apresenta uma alta taxa de sobrevivência após armazenamento. Também é relatado um inibidor de absorção de colesterol usando a bactéria. O inibidor de absorção de colesterol compreende, como um ingrediente ativo, pelo menos um microorganismo selecionado de Bifidobacterium animalis subsp. animalis YIT 10394, Bifidobacterium animalis subsp. lactis JCM 1253, Bifidobacterium animalis subsp. lactis JCM 7117 e Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum.

"INIBIDOR DA ABSORÇÃO DE COLESTEROL"

Campo técnica

A presente invenção se relaciona a bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* que tem um excelente efeito de inibir a absorção de colesterol, e um inibidor da absorção de colesterol contendo estas bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* como um ingrediente ativo.

Antecedentes da Área

Colesterol existe em muitas células e primariamente desempenha papéis fisiológicos de manutenção das funções celulares como componentes das lipoproteínas ou membranas biológicas, servindo como matéria bruta para o ácido biliar e vários hormônios, e equivalente. Entretanto, sabe-se que os níveis de colesterol séricos aumentados resultantes da ingestão excessiva de alimentos com alto teor de colesterol leva a arteriosclerose. Nos hábitos alimentares modernos com muitas oportunidades de ingerir colesterol, é necessário suprimir a concentração de colesterol no corpo.

Além disso, foi relatada que as células bacterianas de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium longum* tem efeitos de melhora no lipídio sanguíneo (Documento de patente 1). Em particular, *Bifidobacterium longum* foi bem estudado, e relatos mostraram que *Bifidobacterium longum* SBT 2933R (FERM P-8743) tem efeitos excelentes (Documento não patente 1), e o uso das células desta bactéria ou sua cultura como um inibidor da elevação do colesterol sérico foi proposto (Documento patente 2). De maneira

geral, entretanto, bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* não são resistentes ao oxigênio assim como ao ácido gástrico e ácido biliar no organismo. Portanto, existe um problema que, quando as células desta bactéria ou sua
5 cultura é administrada oralmente, as células tem pouca habilidade de sobrevivência no trato gastrointestinal e mostram efeitos inadequados em muitos casos. De fato, bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* que tem excelente habilidade de sobrevivência e um efeito de inibição da elevação
10 do colesterol sérico têm sido desejadas.

Entretanto, só se sabe das bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* com excelente habilidade de sobrevivência que *Bifidobacterium longum* SBT 10254 (FERM P-14820) (documento de patente 3) e *Bifidobacterium longum* (FERM BP-
15 7787) (documento patente 4) tem uma excelente capacidade de sobrevivência e apresentam um efeito de inibição da elevação do colesterol sérico, que *Bifidobacterium longum* BB536, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 e *Bifidobacterium animalis* ATCC 25527 (documento não patente 2) mostram um efeito de
20 sedimentação de colesterol, e equivalente. Na situação atual, existem poucas opções de microorganismos que possuem uma excelente capacidade de sobrevivência e um efeito de inibição de colesterol.

Além disso, como frequentemente é inevitável armazenar drogas ou alimentos usando estes microorganismos por
25 um período longo, se faz necessário alta estabilidade de armazenamento. Entretanto, microorganismos conhecidos tem pouca habilidade de sobrevivência após longos períodos de arma-

zenamento, e muitos deles tem pouca habilidade de sobrevivência, particularmente, sob uma condição não anaeróbica.

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

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

5 [Documento de patente 3] JP-B-3384907

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

[Documento não patente 1] The 6th Japan Bifidus Foundation, Annual Meeting Proceedings, p.18, 1987

10 [Documento não patente 2] Letters in Applied Microbiology, Vol.21, 149-151, 1995

Relato da Invenção

Problemas a serem resolvidos na Invenção

De fato, um objeto da presente invenção é fornecer uma bactéria pertencente ao gênero *Bifidobacterium* que mostra uma excelente habilidade de sobrevivência no trato gastrointestinal, tem efeitos da inibição da absorção de colesterol no trato intestinal, é excelente nos efeitos de melhora do metabolismo de lipídio incluindo a redução do nível de colesterol do sangue, e mostra uma alta taxa de sobrevivência após armazenamento, e um inibidor da absorção de colesterol usando o mesmo.

15 20

Meios para resolver os problemas

Os inventores da presente invenção conduzido por vários pesquisadores para obter o objeto citado. Como um resultado, eles surpreendentemente descobriram que *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 e *Bifidobacterium pseudolongum subsp.*

25

Globosum são excelentes nos efeitos de eliminação de colesterol, tem tolerância ao ácido potente e tolerância ao ácido biliar, além disso, tem um excelente efeito de inibição da absorção de colesterol nos intestinos, e mostram uma alta habilidade de sobrevivência após armazenamento, em particular, uma alta taxa de sobrevivência após armazenamento mesmo sob uma condição não anaeróbica. Portanto, a presente invenção conseguiu. Dos microorganismos usados na presente invenção, *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. Globosum* YIT 10393 são microorganismos recém descobertos pelos inventores da presente invenção.

Especificamente, a presente invenção fornece um inibidor da absorção de colesterol compreendendo, como um ingrediente ativo, pelo menos um microorganismo selecionado de *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. Globosum*.

Além disso, a presente invenção fornece um inibidor da absorção de colesterol compreendendo, como um ingrediente ativo, pelo menos um microorganismo selecionado de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253 e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117.

Além disso, a presente invenção fornece um inibidor da absorção de colesterol compreendendo, como um ingrediente ativo, pelo menos um microorganismo selecionado de

Bifidobacterium animalis subsp. animalis YIT 10394, e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. Globosum* YIT 10393.

Além disso, a presente invenção fornece novos microorganismos, *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394 (FERM ABP-10662), *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 (FERM ABP-10660) e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 (FERM ABP-10661).

Uma vez que *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253 e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* da presente invenção não apenas têm um efeito de eliminação de colesterol excelente mas também são excelentes na tolerância ao ácido e tolerância ao ácido biliar, eles também demonstram um excelente efeito de inibição da absorção de colesterol nos intestinos e podem ser utilizados para o fim de melhorar o metabolismo de lipídio, por exemplo, diminuir o nível de colesterol do sangue. Além disso, uma vez que estes microorganismos tenham uma alta taxa de sobrevivência após o armazenamento, em particular, uma alta taxa de sobrevivência mesmo após armazenamento sob condições não anaeróbicas, o inibidor da absorção de colesterol da presente invenção pode ser armazenado por um longo período assim como sob uma condição não anaeróbica.

Melhor Maneira de Usar a Invenção

Exemplos de *Bifidobacterium pseudolongum subsp. Globosum* usados na presente invenção incluem *Bifidobacterium*

pseudolongum subsp. *Globosum* YIT 10392 e *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* YIT 10393.

Estes *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *Globosum* YIT 10392 e *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* YIT 10393 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* YIT 10394, microorganismos usados na presente invenção, são novas linhagens bacterianas isoladas pelos inventores como linhagens bacterianas possuindo propriedades como a atividade de eliminação de colesterol de 70% ou mais, uma taxa de sobrevivência de 20% ou mais em um suco gástrico artificial e uma taxa de proliferação de 100 ou mais como um valor Klett (turbidez da célula bacteriana), em um meio contendo ácido biliar. Estas linhagens bacterianas tem as seguintes propriedades microbianas. Especificamente, todas estas linhagens bacterianas são bacilos polimórficos Gram positivos que não são formadores de esporos, não tem mobilidade e são anaeróbicos estritos, podem crescer em 37°C, e mostram propriedades de *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *Globosum* e *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*, respectivamente, nesta ordem, a parte da atividade de eliminação de colesterol, a taxa de sobrevivência em um suco gástrico artificial, e a taxa de proliferação em um meio contendo ácido biliar mostrado acima.

As espécies destas novas linhagens bacterianas foram identificadas com base nas descobertas na identificação de espécies bacterianas usando a sequência de nucleotídeo rDNA 16S, já que a sequência de nucleotídeo rDNA 16S de YIT 10392 mostra homologia de 99,6% com a sequência de *Bifido-*

bacterium pseudolongum subsp. globosum (No de acesso D86194), e a sequência de nucleotídeo rDNA 16S de YIT 10393 mostra homologia de 99,6% com a sequência de *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* (No de acesso D86194) e a sequência de nucleotídeo rDNA 16S de YIT 10392 mostra homologia de 99,7% com a sequência de *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* (No de acesso D86185). Aqui, a identificação de espécies bacterianas usando a sequência de nucleotídeo rDNA 16S foi feita amplificando o comprimento total de uma sequência de rDNA 16S por PCR usando, como um molde, DNA extraído de células bacterianas obtidas por lavagem centrífuga da solução bacteriana cultivada anaerobicamente (substituição do dióxido de carbono) usando um meio GAM com adição de glicose 0,5% à 37°C por 24 horas, determinando a sequência de nucleotídeo do produto de amplificação pelo método de "dye terminator", e procurando a sequência de nucleotídeo em um banco de dados. Além disso, estas linhagens bacterianas foram determinadas como novas baseado nas descobertas que suas sequências e nucleotídeos rDNA 16S eram diferentes daquelas das linhagens tipo, e os resultados da análise de polimorfismo de DNA de cromossomo pelo método Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) foram diferentes.

Bifidobacterium animalis subsp. animalis YIT 10394,

Bifidobacterium pseudolongum subsp. Globosum YIT 10392 e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 foram transferidos com os N^{os} de acesso FERM ABP-10662, FERM ABP ABP-10660 e FERM ABP-10661, respectivamente,

para International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science e Technology em 14 de agosto de 2006. Estes microorganismos foram arquivados na mesma organização em 18 de agosto de 2005 antes da transferência. O endereço postal deste depósito é o código postal 305-8566, Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi Tsukuba Tharaki, Japão.

Além disso, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253 e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 usados na presente invenção podem ser adquiridos de Japan Collection of Microorganisms (JCM) e American Type Culture Collection (ATCC) e os números de acesso ATCC são ATCC 27536 e ATCC 27674, respectivamente.

Destes, um microorganismo cuja taxa de sobrevivência seja 50% ou maior quando um alimento ou bebida de leite fermentado produzido usando o microorganismo é armazenado à 10°C por 21 dias sob uma condição não anaeróbica (aeróbica) é preferida como o microorganismo usado na presente invenção.

Além disso, como os microorganismos da presente invenção, bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* com uma atividade de eliminação de colesterol de 70% ou superior são preferidas e, bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* com uma atividade de eliminação de colesterol de 70% ou superior, uma taxa de sobrevivência de 20% ou superior em um suco gástrico artificial, como o valor Klett (turbidez da célula bacteriana), em um meio contendo ácido biliar é ainda mais preferida. Bactérias comuns pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, tem uma taxa de sobrevivência de

cerca de 0 a vários por cento em um suco gástrico artificial. Muitas células de bactéria tendo alta tolerância ao ácido e tolerância ao ácido biliar que são selecionadas com base no valor mencionado acima podem alcançar os intestinos em um estado viável.

Aqui, a atividade de eliminação de colesterol pode ser calculada, por exemplo, medindo o nível de colesterol no sobrenadante de acordo com um método comum após as células do microorganismos serem deixadas juntas com micelas lipídicas artificiais, comparando com o nível de colesterol em um sobrenadante não contendo células bacterianas e inserindo os valores na equação seguinte.

$$\text{Atividade de eliminação de colesterol (\%)} = 100 - \frac{(\text{nível de colesterol no sobrenadante contendo células bacterianas})}{(\text{nível de colesterol no sobrenadante não contendo células bacterianas})} \times 100$$

Além disso, a taxa de sobrevivência em um suco gástrico artificial pode ser definido como, por exemplo, a taxa de sobrevivência após armazenamento em um suco gástrico artificial de pH 3,0 à 37°C por 1 hora. Quando este valor é alto, significa que a taxa de sobrevivência no trato gástrico é alta.

Além disso, a taxa de proliferação em um meio contendo ácido biliar pode ser definida como, por exemplo, turbidez na cultura em um meio contendo 0,2% de ácido biliar à 37°C por 24 horas expressas com um valor Klett (Klett-Summerson Colorimeter, filtro No. 66). Quando este valor é alto, a taxa de sobrevivência e a taxa de proliferação no

trato gastrointestinal são altas.

Uma vez que o nome de gênero, espécie e linhagem de um microorganismo variam dependendo da pessoa que nomeou o microorganismo e também são incertos devido a reclassificação das bactérias ou equivalente, microorganismos que são substancialmente idênticos estão incluídos nos microorganismos da presente invenção mesmo eles tendo nomes diferentes de gênero espécie ou linhagem bacteriana. Especificamente, por exemplo, embora *Bifidobacterium animalis* e *Bifidobacterium lactis* foram considerados como espécies separadas, Masco et al. Classificaram coletivamente estes microorganismos como *Bifidobacterium animalis*, que é dividido em duas subespécies, *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, como subclasses (Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 1137-1143, 2004). Esta classificação se mantém atualizada. Portanto, as bactérias usadas sendo referidas como *Bifidobacterium animalis* e *Bifidobacterium lactis* também entram no escopo de *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, respectivamente, na presente invenção.

Além disso, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* ATCC 27536 é idêntico ao e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, JCM 1253 e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* ATCC 27674 é idêntica ao *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117. Todos estes estão incluídos nos microorganismos da presente invenção. Todas estas linhagens bacterianas são classificadas como *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* em JCM e ATCC. Entretanto, uma vez que as seqüên-

cias de nucleotídeos rDNA 16S destas duas linhagens bacterianas combina 100% com a de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (No. de acesso X89513), estas linhagens são classificadas como *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* na presente invenção.

Uma vez que os microorganismos da presente invenção tem atividade de eliminação de colesterol e diminui o nível de colesterol, em particular, o nível de colesterol no sangue conforme mostrado nos exemplos descritos abaixo, agentes contendo estes microorganismos em uma quantidade efetiva são úteis como inibidores da absorção de colesterol, em particular, como inibidores da absorção de colesterol do trato intestinal. Espera-se que o inibidor da absorção de colesterol da presente invenção pode ser usada para reduzir os níveis de colesterol, triglicerídeo e colesterol VLDL e LDL no sangue e o índice de arterioesclerose, melhorando o metabolismo de lipídio incluindo colesterol HDL elevado, melhora hiperlipemia, que frequentemente se desenvolve devido a falta de hormônios sexuais femininos pós menopausa, e diminui um risco de desenvolver arteriosclerose.

Além disso, uma vez que os microorganismos da presente invenção apresentam tolerância ao ácido e tolerância ao ácido biliar conforme mostrado nos exemplos descritos abaixo, agentes contendo estes microorganismos em uma quantidade efetiva podem ser usados como inibidores da absorção de colesterol para a administração oral.

Além disso, uma vez que os microorganismos da presente invenção apresentam alta habilidade de sobrevivên-

cia mesmo após armazenamento em um alimento ou bebida de leite fermentado sob condições aeróbicas (não anaeróbicas) conforme mostrado nos exemplos descritos abaixo, agentes contendo estes microorganismos em uma quantidade efetiva podem ser usados como inibidores da absorção de colesterol armazenados sob condições aeróbicas (não anaeróbicas). A temperatura de armazenamento pode ser determinada como sendo, por exemplo, de -80 a 10°C.

É suficiente que o inibidor da absorção de colesterol da presente invenção compreenda, como um ingrediente ativo, pelo menos um microorganismo selecionado de *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253 e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum*. Exemplos de uma combinação de microorganismos usados aqui incluem pelo menos uma combinação selecionada de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253 e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 e pelo menos uma combinação selecionada de *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392 e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393.

Além disso, o inibidor da absorção de colesterol da presente invenção usa *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum*. Isolado ou combinados ou pode usar estes microorganismos em combinação

com outros microorganismos. Exemplos de tais microorganismos incluem bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* como *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium asteróides*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium gallicum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *pseudolongum*, *Bifidobacterium suis* e *Bifidobacterium thermophilum*; bactérias pertencentes ao *Lactobacillus* como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus maltaromicus*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus pentosus*; bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* como *Streptococcus thermophilus*; bactérias pertencentes ao gênero *Lactococcus* como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; bactérias pertencentes ao gênero *Leuconostoc* como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*; bactérias pertencentes ao gênero *Pedococcus* como

Pedicoccus cerevisiae; bactéria pertencente ao gênero *Enterococcus* como *Enterococcus faecalis*; bactéria pertencente ao gênero *Acetobacter* como *Acetobacter aceti*; bactéria pertencente ao gênero *Gluconobacter* como *Gluconobacter oxydans*;
 5 bactéria pertencente ao gênero *Bacillus* como *Bacillus subtilis*; levedura pertencente ao gênero *Saccharomyces* como *Saccharomyces cerevisiae*; levedura pertencente ao gênero *Torulaspora* como *Torulaspora debueckii*; levedura pertencente ao gênero *Candida* como *Cândida kefir*; levedura pertencente ao
 10 gênero *Kluyveromyces* como *Kluyveromyces marxianus*; levedura pertencente ao gênero *Debaryomyces* como *Debaryomyces hansenii*; levedura pertencente ao gênero *Pichia* como *Pichia anomala*; levedura pertencente ao gênero *Zygosaccharomyces* como *Zygosaccharomyces rouxii*; fungo pertencente aos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Monascus*, *Penicillium*, *Rhizomucor* e *Rhizopus* como *Aspergillus oryzae*, *Mucor japonicus*, *Monascus purpureus*, *Penicillium camemberti*, *Rhizomucor pusillus* e *Rhizopus asshizus*.

Além disso, os microorganismos contidos no inibidor da absorção de colesterol da presente invenção pode ser
 20 liofilizado ou utilizado como uma cultura contendo estes microorganismos. De qualquer forma, é preferível que os microorganismos estejam no estado de células viáveis.

O inibidor da absorção de colesterol da presente
 25 invenção pode ser administrado na forma de uma formulação de droga normalmente usada misturando os microorganismos mencionados acima com veículos farmacêuticos não tóxicos sólidos ou líquidos. Exemplos de tais formulações incluem formu-

lações sólidas como tabletes, grânulos, pó e cápsula, formulações líquidas como soluções, suspensões e emulsões, formulações liofilizadas. Estas formulações podem ser preparadas por medidas comuns para a produção de formulações. Exemplos

5 de veículos farmacêuticos não tóxicos incluindo glicose, lactose, sacarose, amido, manitol, dextrina, ácido graxo, glicerídeo, polietilenoglicol, ésteres de ácido graxo polioxietileno sorbitam, aminoácidos, gelatina, albumina, água, salina fisiológica. Além disso, aditivos usados normalmente

10 como estabilizantes, agentes umectantes, emulsificantes, ligantes e agentes isotonizantes podem ser adicionados adequadamente conforme necessário.

Além disso, o inibidor da absorção de colesterol da presente invenção pode ser usados como os microorganismos

15 mencionados acima são, adicionando-os diretamente a uma comida, ou na forma de um alimento ou bebida. Exemplos preferidos de comida e bebida incluem leite fermentado, leite de soja fermentado, suco de fruta fermentado, suco de planta fermentado, suco de arroz fermentado, líquido da cevada fermentado e alimentos e bebidas fermentadas usando materiais

20 derivados de animais e plantas (pickles, pasta de soja fermentada, molho de soja, chá fermentado, salsicha fermentada, maionese fermentada, queijo, entranhas de peixe salgada, etc.) que compreende os microorganismos da presente invenção

25 no estado de células viáveis. A comida ou bebida pode ser fabricada por um método comum. Por exemplo, quando o leite fermentado é fabricado, primeiro, um leite base fermentado é obtido inoculando e cultivando pelo menos um dos usa *Bifido-*

bacterium animalis subsp. animalis YIT 10394, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum*. Isolado ou combinados com outros microorganismos em um meio de leite esterelizado, e homogeneizando o meio. Então, uma solução xarope preparada separadamente é adicionada e misturada, e a mistura é homogeneizada com um homogeneizador ou equivalente, e um sabor é adicionado para completar um produto final. O leite fermentado da presente invenção obtido pode ser preparado como um produto em qualquer forma como um tipo integral, tipo leve, ou um tipo com sabor de fruta, em um estado sólido, líquido ou congelado ou equivalente. Alimentos de animais também estão incluídos em comida e bebida. O microorganismo da presente invenção no leite fermentado pode ser contido, por exemplo, em uma concentração de 10^3 a 10^{13} cfu/mL.

Neste caso, o inibidor de colesterol da presente invenção pode ser misturado com ingredientes alimentares normalmente usados em comidas e bebidas como, por exemplo, sacarídeos, proteínas, peptídeos, lipídios, vitaminas, minerais, componentes de planta como vegetais, grãos e frutas, componentes animais como sangue, leite, fígado, ossos e músculos, componentes de microorganismos como bactérias, fungos, leveduras e cogumelos, seus componentes de cultura, agentes gelatinizantes, agentes de fixação, agentes espessantes, sabor, agentes corantes, agentes promotores do crescimento da bactéria *Bifidobacterium*, agentes promotores do crescimento de ácido láctico. Seus exemplos específicos in-

cluem vários adoçantes como glicose, sacarose, frutose, maltose, isoglicose, xilose, palatinose, mel, xarope de maple e amazake, álcoois de açúcar como sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, palatinito, xarope de amido reduzido e xarope
5 de maltose reduzido, vários adoçantes muito doces como sucralose e aspartame, vários adoçantes naturais como licorice, stevia e glicosídeo ácido glicirrizínico, vários emulsificantes como estes de ácido graxo sacarose, ésteres de ácido graxo carboidrato glicerina e lecitina, e vários agentes
10 espessantes (estabilizante) como ágar, gelatina, carragena, goma de guar, goma arábica, goma xantana, pectina e goma locusta.

Além disso, exemplos de ingredientes de alimentos também incluem vários carboidratos como tagatose, lactose,
15 trealose, agaroligossacarídeo, nigeroligossacarídeo, galactooligossacarídeo, fructooligossacarídeo, xilooligossacarídeo, rafinose, amidose, lactulose, maltotriose, isomaltoligossacarídeo, ciclodextrina, glicosamina e N-acetilglicosamina, varias fibras dietéticas como ácido algi-
20 co, alginato de sódio, fucoido, sargasso, furcerano, funorano, porfirano, aminarano, Pullulan, taragoma, manan de konjak, inulina, chitina, chitosan, polidextrose, ácido hialurônico, condroitim sulfato, β -glucano, manan, galactano, fructano, xilano, arabiana, arabinogalactano, glucomana, galactoman,
25 lactoman, fibra de beterraba, fibra de aveia, fibra de trigo, fibra de soja, fibra de arroz, fibra de cevada, goma de xantan, fibra de milho, fibra de maçã, fibra cítrica, fibra Psyllium, fibra de pinha, fibra de ameixa, fibra de ervilha,

fibra de banana, ácido acético de celulose de bactéria, ácido
 láctico da parede celular de bactéria, parede celular de
 bactéria *Bifidobacterium*, parede celular de levedura, fruta-
 no natto, colágeno e ácido poliglutâmico natto ou vários hi-
 5 drolisados destas fibras dietéticas, e vários materiais con-
 tendo fibras dietética indigeríveis como farelo de trigo,
 farelo de cevada, farelo de arroz, farelo de *Avena fátua*,
 farelode aveia, farelo de centeio, *Psyllium*, pó de farelo de
 arroz, arroz marrom, chicória, resíduo de soja, polpa de ma-
 10 çã, amido resistente, malte de cevada, grão de milho, ácido
 láctico de células de bactéria, células de bactéria de *Bifi-*
dobacterium, células de levedura de cerveja, célula de leve-
 dura de vinho, sedimento de vinho, sedimento de sake, sedi-
 mento de molho de soja, sedimento de cerveja, arroz maltado,
 15 trigo maltado, grãos maltados, *Monascus pilosus*, *Aspergillus*
oryzae, substancia viscosa de soja fermentada, extrato de
 semente de uva, geléia real, própolis, clorela, espirulina,
 euglena, undaria, alga laminária, parreira, eisenia, *Eisenia*
bicyclis, *Porphyra tenera*, larva verde, hizika, ulvaceae e
 20 *Nemacystus decipiens*.

Além disso, exemplos de ingrediente de comida in-
 cluem vários minerais como cálcio, magnésio, zinco, ferro,
 manganês, iodo, selênio, cobre, cobalto e dolomita e vários
 sais destes minerais, vários ácidos como ácido cítrico, áci-
 25 do málico, ácido tartárico, ácido pirúvico, ácido gluconico,
 ácido succínico, ácido fumárico, ácido ascórbico, ácido lác-
 tico, ácido acético, ácido propionico, ácido butírico, ácido
 fosfórico e aminoácidos como creatinina, metionina, cisteína

e ácido glutâmico e vários sais destes ácidos, vários componentes como glutathione, fitina, ácido fitico, lignina, ácido poli- γ -glutâmico e seus produtos de degradação, saponina, ácido ferulico, ácido γ -aminobutírico, γ -orizanol, chalcona, flavonona, flavona, flavonol, isoflavona, antociana, catequina, proantocianidina, polifenol de folha de chá, curcumin, capsaicina, sesaminol, lignana de gergelim, teaflavina, β -dicetonas, carotenóides, compostos alil sulfato, isotiocianato, terpeno, clorofilas, esfingolipídios, gangliosídeo, ácidos graxos n-3 polinsaturados, ácidos graxos n-6 polinsaturados ácido linoleico conjugado, fosfolipídeos, esteróis de planta, várias proteínas como proteínas da soja como glicinina e conglutinina, proteínas do ovo como ovalbumina e ovomucina, lactoproteínas e proteínas como caseína, lactoalbumina e lactoferrina, proteínas do arroz como fosfopeptídeo caseína e orizina, proteínas do trigo como glutelina e gliadina, e proteínas do peixe e peptídeos degradados por enzima e seus peptídeos degradados por ácido, várias vitaminas como vitamina A, família da vitamina B, vitamina C, família da vitamina D, vitamina E, família da vitamina K, β -caroteno, ácido retinóico e ácido fólico, vários extratos de cohosh preto, semente de abóbora, semente de pomegranato, erva de S. João, maracujá, valeriana, *Pueraria mirifica*, alecrim, hortelã, salsa, calendula, melissa, artemísia, açafrão, semente de rabanete japonês, pé de café, araliácea, porongo, casca de laranja, folha de ginkgo, jujuba, *Fructus lycii*, alcaçus, *Ganoderma lucidum*, ginseng, guaraná e equivalente, vários extratos de planta de chá verde, chá preto,

chá de oolong, chá de *Gymnema*, chá de goiaba, e equivalente, e várias especiarias como pimenta, *Zanthoxylum*, canela, cúrcuma, sálvia, tomilho, manjerição, pimenta vermelha e noz moscada.

5 Além disso, exemplos de ingredientes de alimentos incluem vários componentes em grãos como arroz, arroz marrom, centeio, trigo, cevada, trigo de verão, amaranto, *Setaria itálica*, *Panicum miliaceum*, trigo mourisco, *Sorghum bicolor* e milho e vários componentes mudas de semente destes
10 grãos, vários componentes vegetais como feijão fradinho, feijão branco, feijão comum, feijão rajado, *Pisum sativum*, feijão flor, grão de bico, soja preta, soja azul, feijão mungo, fava, feijão daifuku, *Angélica keiskei*, couve, cúrcuma, batata, batata doce, batata roxa, inhame japonês, abóbora,
15 ra, berinjela, tomate, melão-de-são-caetano, *Capsicum*, gengelim, repolho, brócolis, couve-flor, alface, soja verde, gengibre, bardana, aipo, rabanete japonês, raiz forte, abacate, cenoura, espinafre, cebola, alho, lírio, cebolinha, *Perilla frutescens crispa*, cebolinha, *Allium odurum*, pastinaca,
20 naca, *Pteridium aquilinum*, broto de bambu, cogumelo Shiitake e cogumelo, componentes frutas como limão, maçã, uva, morango, laranja, caqui, goiaba, banana, vacínio, amora-preta, oxicoco, framboesa, amora, pimenta da jamaica, goiabaserrana, tomateiro, acerola, lima, *Citrus depressa*, melão,
25 pêssego, manga, limão chinês, papaia, abacaxi, pêra, ameixa, toranja, marmelo, abricó, mandarina, romã, melancia, ameixa seca e kiwi, vários componentes nozes como amendoim, amêndoa, coco, castanha de caju, macadamia, cacau, castanha,

fruto de ginkgo e noz, vários produtos de uso diário como leite de vaca, leite desnatado, soro de leite, creme, leite fermentado, iogurte, lactoproteína, caseína e proteínas do soro do leite e seus componentes, licores fermentados como sake refinado, vinho, Shaoxing e cerveja, licores destilados como whiskey, brandy e vodca.

Para melhorar a habilidade de sobrevivência em alimentos ou bebidas de leite fermentado usando bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* durante armazenamento, recipientes feitos de material impermeável ao oxigênio como vidro e papel alumínio foram usados principalmente. Conforme mostrado nos exemplos abaixo, entretanto, os microorganismos da presente invenção tem alta tolerância ao oxigênio e não precisam de condições estritamente anaeróbicas. Portanto, materiais do recipiente para o inibidor de absorção de colesterol da presente invenção, resinas altamente permeáveis ao oxigênio (poliestireno, polietileno, polietileno tereftalato, etc.) também pode ser usado. Recipientes usando estas resinas são mais baratos e tem vantagens como o alto grau de liberdade na modelagem quando comparado com recipientes feito de materiais impermeáveis ao oxigênio.

Os microorganismos usados como ingrediente ativo do inibidor da absorção de colesterol da presente invenção mostra excelente tolerância ao ácido conforme mostrado nos exemplos abaixo. Portanto, o inibidor da absorção de colesterol da presente invenção pode ser feito ácido. Por exemplo, seu pH à 25°C pode ser de 2 a 7, em particular de 3 a 6.

As bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacteri-*

um usadas como um ingrediente ativo do inibidor da absorção de colesterol da presente invenção foram utilizados como alimento, e a segurança destas bactérias foi confirmada. Portanto, doses destas bactérias quando usadas como um inibidor da absorção de colesterol não são estritamente limitadas, mas são preferivelmente entre 10^5 a 10^{13} ufc, particularmente, preferivelmente entre 10^8 a 10^{12} ufc por dia na contagem de células viáveis.

Exemplos

A presente invenção será explicada mais especificamente com relação aos seguintes exemplos. Entretanto, o escopo da presente invenção não está limitada a estes exemplos.

Exemplo Teste 1

(1) Atividade de eliminação de colesterol

Células bacterianas foram cultivadas anaerobicamente em meio m-ILS (Int. J. Food Microbiol. 81. 131-136, 2003) à 37°C por 24 horas, o caldo da cultura foi centrifugado à 12000 rpm e 4°C por 15 minutos e as células bacterianas foram lavadas com tampão fosfato 150 mM (pH 5,5). A lavagem centrífuga foi repetida três vezes, e as células bacterianas foram ressuspensas em tampão fosfato 150 mM para dar turbidez (absorbância 660 nm) de 3 (contagem de células bacterianas de 10^8 a 10^8 ufc/mL) para preparar uma suspensão de célula bacteriana. A suspensão de célula bacteriana foi auto-clavada à 121°C por 15 minutos para preparar a suspensão de bactérias mortas.

2g de pó de bile bovina, 921 mg de colesterol, 135

mg de lisofosfatidilcolina, 90,2 mg de ácido monooleico e 702,2 mg de ácido oléico foram ressuspensos em tampão fosfato 150 mM (pH 7,0), a suspensão foi ultrasonificada por 12 minutos e então ultracentrifugada à 100.000 G e 25°C por 18 horas, e uma camada de micela foi coletada para preparar micelas de lipídeos artificiais. 150 µL de micelas de lipídios artificiais por mL de suspensão de célula bacteriana (contagem de célula bacteriana de 10^{58} a 10^9 ufc) foi adicionada, e a suspensão foi deixada descansar à 37°C. Após 18 horas, a suspensão foi centrifugada à 12000 rpm e 4°C por 15 minutos, e o colesterol no sobrenadante foi quantificado usando Determiner TC555 (Kyowa Medics Co., Ltd.). Um tampão fosfato não contendo células bacterianas foi tratado similarmente como um controle, e a atividade de eliminação de colesterol foi calculada pela equação abaixo. Além disso, a atividade de eliminação de colesterol foi calculada similarmente para a suspensão de bactérias mortas.

Atividade de eliminação de colesterol (%) = $100 - \frac{(\text{nível de colesterol no sobrenadante contendo células bacterianas})}{(\text{nível de colesterol no sobrenadante não contendo células bacterianas})} \times 100$

(2) Tolerância ácida

0,1 mL de solução bacteriana cultivada em meio GAM (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd) até a fase estacionária foi adicionada a 10 mL de solução Na_2HPO_4 50 mM ajustada para pH 3 com ácido clorídrico, e a mistura foi tratada à 37°C por 1 hora, e a taxa de sobrevivência foi calculada pela seguinte equação.

Taxa de sobrevivência (%) = (contagem de células viáveis após o tratamento com ácido) / (contagem de células viáveis antes do tratamento com ácido) x 100

(3) Tolerância ao ácido biliar

5 30 µL de solução bacteriana cultivada em meio GAM até a fase estacionária foi inoculada em 3 mL de meio GAM contendo 0,2% de ácido biliar e cultivado anaerobicamente à 37°C. Após 24 horas, a turbidez da célula bacteriana foi medida usando Klett-Summerson Colorimeter (Filtro No. 66).

10 Os resultados dos testes 1 a 3 acima são mostrados na tabela 1.

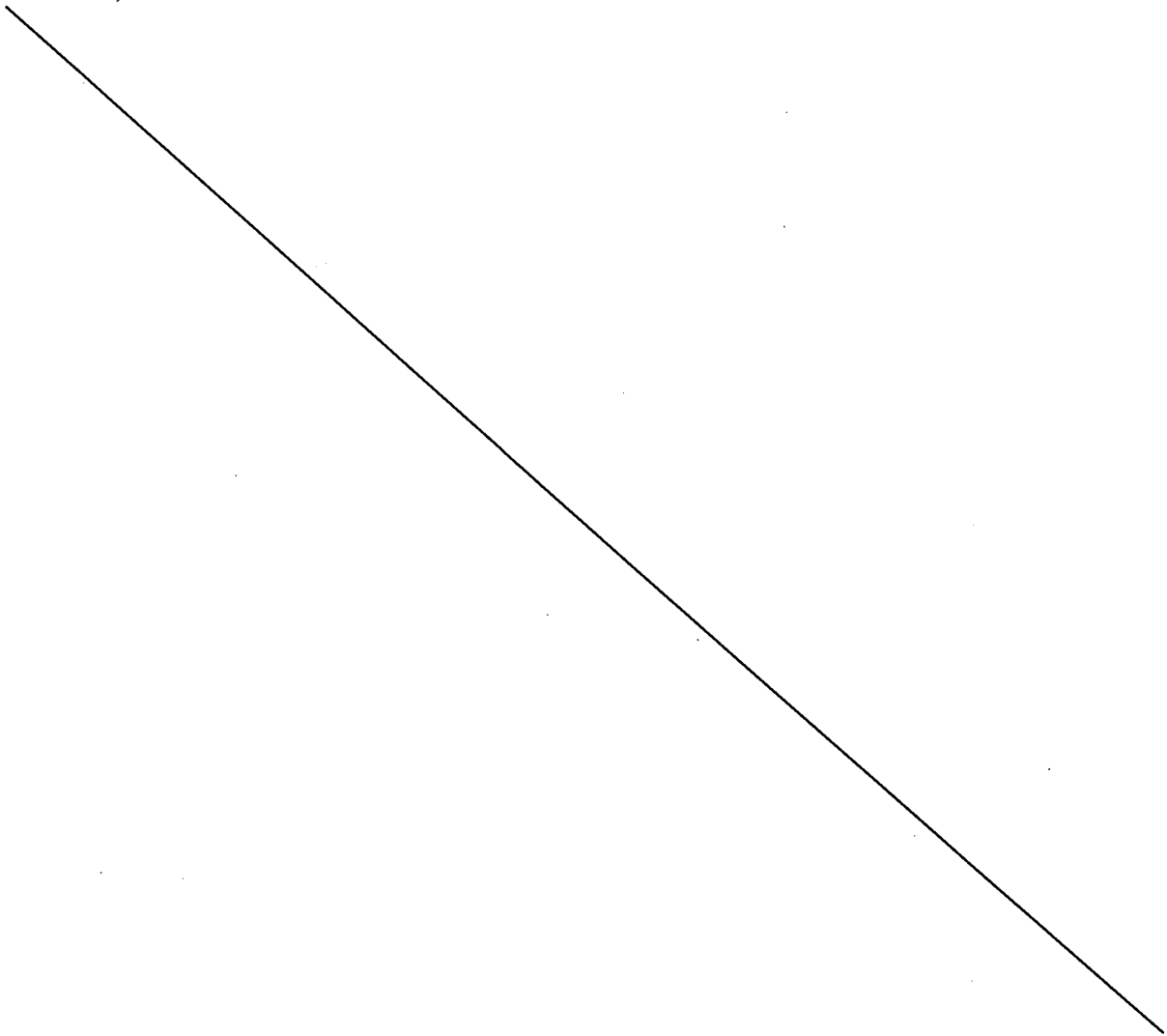


TABELA 1
Resultados da determinação da atividade de eliminação de colesterol, tolerância ao ácido e tolerância ao ácido biliar

	Atividade de eliminação de colesterol de células bacterianas viáveis (%)	Atividade de eliminação de colesterol de células bacterianas mortas por calor (%)	Tolerância ao ácido (taxa de sobrevivência, %)	Tolerância ao ácido biliar (taxa de sobrevivência, %)
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> YIT 10394	85	NT	97	310
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 1253	86	NT	117	256
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 7117	79	NT	92	177
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> YIT 10392	77	2	100	153
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> YIT 10393	86	4	100	112
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703 (linhagem tipo)	20	6	<1	198
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> JCM 1190 (linhagem tipo)	66	4	100	152
<i>Bifidobacterium angulatum</i> ATCC 27535 (linhagem tipo)	8	NT	12	108
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697 (linhagem tipo)	39	NT	<1	-
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> ATCC 27539 (linhagem tipo)	10	6	<1	80
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> JCM 1200 (linhagem tipo)	19	11	<1	126
<i>Bifidobacterium bifidum</i> IFO 14252 (linhagem tipo)	13	NT	<1	-
<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 (linhagem tipo)	27	9	<1	116
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 (linhagem tipo)	34	12	<1	-

NT: Não testado.

<1: A taxa de sobrevivência foi de 1% ou menos no teste de tolerância ao ácido.

-: Foi determinado por exame visual que virtualmente nenhuma bactéria cresceu no meio GAM com adição de ácido biliar no teste de tolerância ao ácido biliar.

Conforme mostrado na tabela 1, *Bifidobacterium animalis subsp. animalis*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* da presente invenção mostrou alta atividade de eliminação de colesterol e foi excelente na tolerância ao ácido e tolerância ao ácido biliar. Além disso, uma vez que as células bacterianas mortas não tem atividade de eliminação de colesterol, foi descoberto que estas bactérias mostram atividade em um estado celular viável.

Subsequentemente, para saber se a eliminação de colesterol do sobrenadante resultou de precipitação, ou conversão ou degradação, o nível de colesterol na fração precipitada foi medida. Como resultado, foi descoberto que o colesterol eliminado do sobrenadante não foi convertido ou degradado e existia no precipitado. Este resultado sugere a possibilidade do colesterol no sobrenadante ter sido captado nas células bacterianas e precipitado ou micelas lipídicas podem ter sido desintegradas pelo efeito desconjugante do ácido biliar das células bacterianas ou equivalente e precipitado.

Exemplo Teste 2: Efeitos nos lipídios sanguíneos e lipídios hepáticos em animais

Um meio de leite desnatado em pó 10% contendo 0,03% de extrato de levedura foi esterelizado à 121°C por 15 minutos e *Bifidobacterium pseudologum subsp. globosum* YIT 10393 foi inoculado à 1% e cultivado anaerobicamente por 24 horas. Este caldo de cultura foi inoculado à 2% no mesmo meio e cultivado anaerobicamente à 37°C por 46 a 54 horas. A

contagem de células viáveis contidas no leite fermentado preparado foi de $3,7 \times 10^8$ ufc/mL. Este leite fermentado foi liofilizado, e um alimento foi preparado com uma composição mostrada na tabela 2. Aqui, a contagem de células viáveis no
 5 alimento foi de $1,0 \times 10^6$ ufc/g. Neste meio tempo, como um controle, um meio de leite desnatado em pó a 10% contendo 0,03% de extrato de levedura foi esterelizado à 121°C por 15 minutos e então liofilizado sem inocular bactérias como leite não fermentado, e um alimento foi preparado com a composição mostrada na Tabela 2.
 10

Tabela 2

Composição dos alimentos dados aos animais (%)

Oligossacarídeo	Não adicionado	adicionado
Caseína	19,66	19,66
Óleo de milho	5	5
Mistura de vitamina (AIN-93G)	1	1
Mistura de minerais (AIN-93G)	3,5	3,5
Bitartrato de colina	0,2	0,2
sacarose	14,34	11,84
A-amido de milho	50	50
Celulose	5	5
DL-metionina	0,3	0,3
Leite fermentado ou não fermentado	1	1
galactoligossacarídeo	0	2,5

Subsequentemente, após 1 semana de criação preliminar, ratos ovariectomizados Wistar de 8 semanas de idade
 15 (adquiridos de Japan SLC) ou ratos controle foram habituados à dieta AIN-93G purificado por 1 semana e divididos nos gru-

pos experimentais mostrados na Tabela 3 dependendo do peso corporal.

Tabela 3

Grupos Experimentais			
Animais	leite	Galactooligossacarídeos %	No. de animais
Controle	SM	0	4
OVX	SM	0	5
OVX	FSM	0	5
OVX	SM	2,5	5
OVX	FSM	2,5	5

5 Controle: animais submetidos a operação simulada;
OVX: animais submetidos a ovariectomia; SM: leite não fermentado; FSM: leite fermentado

Os ratos grupados foram mantidos em gaiolas individuais usando o teste dos alimentos em temperatura ambiente
10 de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade de $55 \pm 5\%$ com a alimentação correspondente a cada grupo e água disponível à vontade por 34 dias. A ingestão diária de células viáveis foi de 10^7 ufc/animal.

Os animais foram anaestesiados com Nembutal. A alimentação foi suspensa por 4 horas antes da morte. O sangue foi coletado da aorta ventral e o fígado foi coletado por refluxo. O fígado foi armazenado à 20°C antes da análise
15 e o sangue foi centrifugado à 3000 rpm por 15 minutos para separar o plasma. Após a liofilização, o fígado foi extraído
20 pelo método de Folch (J. Biol. Chem. 226, 497-509, 1957).

Os níveis de colesterol total e triglicerídeos

contidos no plasma e extrato de fígado obtidos então foram obtidos usando Determiner TC555 (Kyowa, Medics Co., Ltd.) e Triglyceride E-test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), respectivamente. Além disso, o nível de colesterol HDL contido no plasma foi obtido usando colesterol HDL E-test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Além disso, o nível de colesterol VLDL + LDL contido no plasma foi obtido deduzindo o nível de colesterol HDL do nível de colesterol total.

10 Baseado nos resultados obtidos, o valor p foi obtido para o grupo ovariectomia pela análises de variância de duas maneiras. Então, o teste t foi feito entre os ratos ovariectomizados e os ratos controle, ambos receberam o mesmo alimento. Os resultados obtidos são mostrados nas Tabelas 4
15 a 6. Os valores foram expressos com média $\pm$ DP. Nas tabelas 4 a 6, o termo "interação" significa uma interação entre leite fermentado e galactooligossacarídeos.

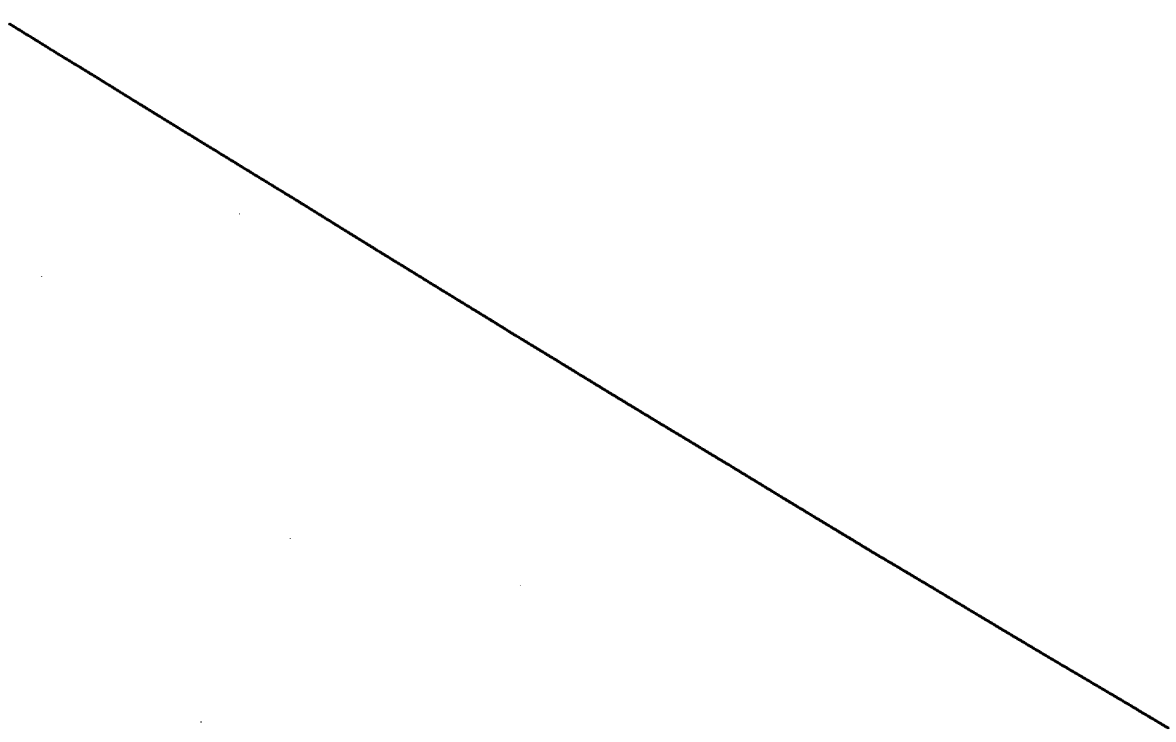


Tabela 4

Efeito do leite fermentado preparado usando *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 no crescimento

	Grupo controle				Grupo ovariectomizado				Resultado da análise de vari-	
	Leite não fermentado				Leite fermentado				ância (p<)	
	Sem oligossacarídeo		Com oligos-		Sem oligos-		Com oligos-		Leite	Interação de oli-
	sacarídeo	sacarídeo	sacarídeo	sacarídeo	sacarídeo	sacarídeo	sacarídeo	sacarídeo	fermentado	gos sacarídeos
Peso corporal inicial (g)	157±6	182±7	182±6***	183±6	182±8	183±6	232±5	234±14	NS	NS
Peso corporal final (g)	185±6	235±13	233±8***	234±14	232±5	234±14	50±7	52±10	NS	NS
Aumento no peso corporal	28±2	53±6	52±6***	52±10	50±7	52±10	425±11	452±35	NS	NS
Quantidade de comida ingerida (g/34 dias)	372±19	454±37	433±24**	452±35	425±11	452±35			NS	NS

, *: Uma diferença significativa foi observado entre o grupo controle/leite não fermentado/sem oligossacarídeo e o grupo ovariectomizado/ leite não fermentado/sem oligossacarídeo em um nível de significância de 0,1 ou 0,01.

NS: sem significância

Conforme mostrado na Tabela 4, os ratos ovariectomizados tinha mais peso corporal e ingeriram mais alimento quando comparado com o grupo controle, conforme relatado anteriormente (J. Comp. Physiol. Physicol 88: 183-193, 1975). Entretanto, efeitos da presença ou ausência de oligossacarídeos ou administração de leite fermentado no foram observada no grupo ovariectomizado, e os animais cresceram favoravelmente.

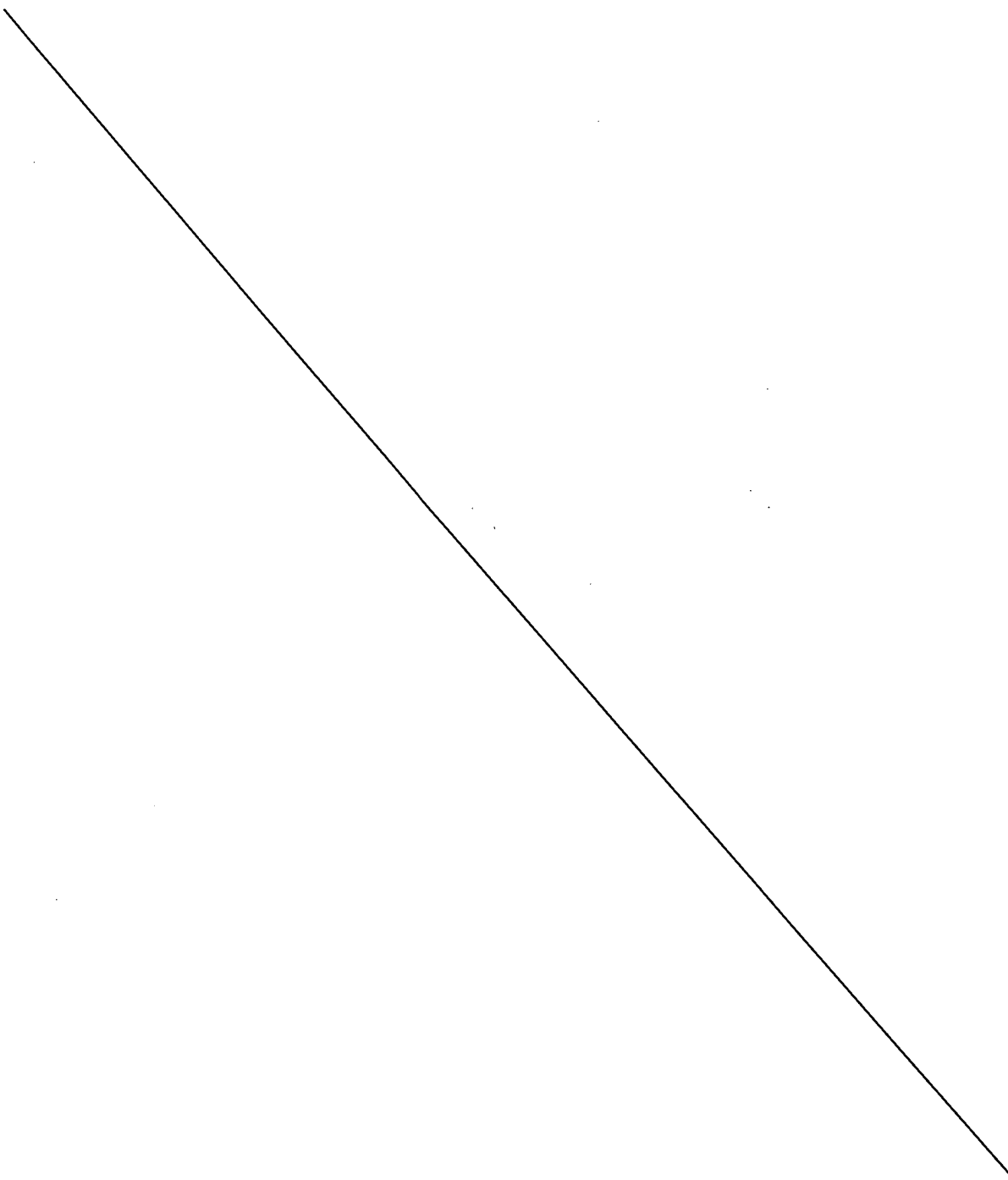


Tabela 5

Efeito do leite fermentado preparado usando *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 em lipídios do sangue

	Grupo ovariectomizado				Resultado da análise de variância (p<)	
	Grupo controle		Leite não fermentado		Leite fermentado	
	Leite não fermentado	Sem oligossacarídeo	Com oligossacarídeo	Sem oligossacarídeo	Com oligossacarídeo	Interação de oligossacarídeos
TC	101,7±3,7	134,7±8,6*	145,7±2,5	124,5±17,7	120,3±10,3	0,05 NS
TG	54,9±11,9	77,1±15,0	74,4±5,3	58,5±17,6	50,5±9,4	0,05 NS
HDL-C	67,5±5,3	90,0±15,0	91,3±16,7	101,3±16,8	100,3±7,1	NS
VLDL+LDL-C	34,0±4,2	44,7±1,2	54,4±9,6	23,2±13,8	20,1±11,9	0,0001 NS
AI	0,507±0,096	0,521±0,061	0,598±0,061	0,241±0,178	0,204±0,124	0,001 NS

, *: Uma diferença significativa foi observado entre o grupo controle/leite não fermentado/sem oligossacarídeo e o grupo ovariectomizado/ leite não fermentado/sem oligossacarídeo em um nível de significância 0,05.

TC: colesterol total (mg/dL); TG: triglicerídeo (mg/dL); HDL-C: colesterol HDL (mg/dL); VLDL + LDL-C: colesterol VLDL + LDL (mg/dL).

AI: índice de arteriosclerose (VLDL + LDL-C/HDL-C)

NS: sem significância

Além disso, conforme mostrado na tabela 5, os efeitos do leite fermentado preparados usando *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 foram observados no colesterol, triglicerídio, VLDL + LDL no sangue e o índice de arteriosclerose, e todos estes parâmetros diminuíram. Em particular, o nível de colesterol VLDL + LDL diminuíram visivelmente. Além disso, embora os efeitos dos oligossacarídeos nestes parâmetros e uma interação entre leite fermentado e oligossacarídeo não foram estatisticamente significativos, os níveis de colesterol total, triglicerídio e colesterol VLDL + LDL no sangue, e o índice de arteriosclerose foram os mais baixos nos animais tratados com oligossacarídeos e leite fermentado. Sabe-se que galactooligossacarídeo é utilizado especificamente pela bactéria pertencente ao gênero *Bifidobacterium*. Portanto, foi demonstrado que *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 cresce no trato intestinal e reduz os níveis de lipídio no sangue efetivamente pela administração de leite fermentado contendo galactooligossacarídeo. Além disso, sabe-se que o colesterol total no sangue estava elevado após a ovariectomia, e um animal que foi submetido a ovariectomia é útil como modelo de hiperlipemia pós menopausa. A comparação de dados do grupo ovariectomia/leite não fermentado/sem oligossacarídeo com o grupo controle mostrou que a ovariectomia neste teste foi bem sucedida.

Tabela 6

Efeito do leite fermentado preparado usando *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 nos lipídios hepáticos

	Grupo controle		Grupo ovariectomizado				Resultado da análise de variância	
	Leite não fermentado		Leite não fermentado		Leite fermentado		(p<)	
	Sem oligossacarídeo	Sem oligossacarídeo	Com oligossacarídeo	Sem oligossacarídeo	Com oligossacarídeo	Sem oligossacarídeo	Leite fermentado	Interação de oligossacarídeos
Peso do fígado (g)	6,5±0,6	7,9±0,8*	7,5±0,7	7,6±1,0	7,3±0,5	7,3±0,5	NS	NS
Colesterol total (mg/g)	7,4±0,8	7,1±0,3	7,0±0,4	7,3±0,4	7,3±0,4	7,3±0,4	NS	NS
Colesterol total (mg/fígado)	13,6±1,6	16,6±1,4*	16,0±1,3	16,0±2,6	15,4±0,43	15,4±0,43	NS	NS
Triglicerídeo (mg/g)	72,1±12,7	137,7±26,5**	138,4±28,8	117,7±29,0	103,3±11,1	103,3±11,1	0,05	NS
Triglicerídeo (mg/fígado)	132,4±23,8	325,8±80,3**	319,1±97,7	268,4±113,9	220,4±29,6	220,4±29,6	NS	NS

*, **: Uma diferença significativa foi observado entre o grupo controle/leite não fermentado/sem oligossacarídeo e o grupo ovariectomizado/ leite não fermentado/sem oligossacarídeo em um nível de significância de 0,05 ou 0,01.

NS: sem significância

Conforme mostrado na Tabela 6, o conteúdo de colesterol no fígado não foi afetado pela presença de oligossacarídeo ou pela administração de leite fermentado e os lipídeos não ficaram acumulados no fígado. Uma significância estatística não
5 foi observada no nível de triglicerídeo por fígado após a administração de leite fermentado, mas o conteúdo de triglicerídeo por g de fígado diminuiu.

Uma vez que o leite fermentado preparado usando *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 reduziu o
10 nível de colesterol total, triglicerídeo e colesterol LDL + VLDL no sangue e o índice de arteriosclerose mostrado acima, foi descoberto que esta bactéria tem uma habilidade de metabolismo de lipídio melhorada não apenas para colesterol mas para vários lipídios sanguíneos e um efeito de reduzir o risco de
15 desenvolver arteriosclerose.

Exemplo teste 3: Exame da habilidade de sobrevivência no leite fermentado

Extrato de levedura 0,03% foi adicionado a uma solução de leite desnatado em pó, e a mistura foi esterelizada, ca-
20 da uma das bactérias da presente invenção (*Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392, *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393)
25 foi inoculada a 2% e cultivada à 37°C em pH 5,1 ± 1,0, produziu cinco tipos de leite fermentado. Além disso, como um controle, um leite fermentado foi produzido da mesma maneira usando *Bifidobacterium longum* ATCC 15707.

10 mL de cada leite fermentado preparado foi colocado

em um tubo de ensaio de vidro para armazenamento anaeróbico e um tubo de polipropileno para armazenamento não anaeróbico (aeróbico) e armazenado à 10°C por 12 semanas. Para armazenamento anaeróbico, o tubo de ensaio foi fechado firmemente com uma rolha butil sob fluxo de gás nitrogênio. Para o armazenamento não anaeróbico, o tubo de polipropileno foi fechado frouxamente. A tabela 7 mostra pH e contagem de células viáveis após o fim da cultura. A tabela 8 mostra modificações na contagem de células bacterianas no armazenamento não anaeróbico. A tabela 9 mostra modificações na contagem de células bacterianas no armazenamento anaeróbico.

Tabela 7

pH e contagem de células viáveis para cada bactéria no fim da cultura

	pH	Contagem de células viáveis (ufc/mL)	Tempo de cultura (horas)
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> YIT 10394	5,06	$9,1 \times 10^8$	27
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 1253	5,13	$5,9 \times 10^8$	30
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 7117	5,19	$1,4 \times 10^9$	30
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> YIT 10392	5,19	$3,4 \times 10^8$	30
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> YIT 10393	5,14	$6,2 \times 10^8$	30
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	5,01	$3,3 \times 10^8$	27

Tabela 8

Mudanças na contagem de células viáveis para cada bactéria no leite fermentado no armazenamento à 10oC em armazenamento não anaeróbico

	No fim da cultura	Após 3 semanas	Após 8 semanas	Após 12 semanas
<i>Bifidobacterium animalis subsp. animalis</i> YIT 10394	$9,1 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$	$4,1 \times 10^6$
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> JCM 1253	$5,9 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> JCM 7117	$1,4 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$7,0 \times 10^8$
<i>Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum</i> YIT 10392	$3,4 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$7,6 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
<i>Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum</i> YIT 10393	$6,2 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$	$3,9 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	$3,3 \times 10^8$	$9,2 \times 10^3$	-	-

Tabela 9

Mudanças na contagem de células viáveis para cada bactéria no leite fermentado no armazenamento à 10oC em armazenamento anaeróbico

	No fim da cultura	Após 3 semanas	Após 12 semanas
<i>Bifidobacterium animalis subsp. animalis</i> YIT 10394	$9,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$4,7 \times 10^8$
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> JCM 1253	$5,9 \times 10^8$	$5,9 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> JCM 7117	$1,4 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
<i>Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum</i> YIT 10392	$3,4 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
<i>Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum</i> YIT 10393	$6,2 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	$3,3 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$	$4,2 \times 10^6$

Conforme mostrado na tabela 8, após 3 semanas de armazenamento sob condição não anaeróbica (aeróbica), *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 usado como um controle foi reduzido a $9,2 \times 10^3$ ufc/mL e não foi detectado após 8 semanas. Por outro lado, nenhuma linhagem bacteriana da presente invenção foi reduzida para menos de 1×10^8 ufc/mL mesmo após 3 semanas de armazenamento, e a taxa de sobrevivência foi de 50% ou superior quando comparado com a contagem de células no fim da cultura. Além disso, após 12 semanas de armazenamento, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* JCM 1253 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* JCM 7117 não estavam com menos de 1×10^8 ufc/mL, e as três linhagens bacterianas restantes (*Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *glosum* YIT 10392, *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *glosum* YIT 10393, *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* YIT 10394) diminuíram apenas cerca de 1 ou 2 ordens.

Conforme mostrado na tabela 9, após 3 semanas de armazenamento sob condições anaeróbicas, a contagem de células bacterianas de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 reduziu de cerca de 1/10. Entretanto, a contagem de células bacteriana da bactéria *Bifidobacterium* da presente invenção no fim da cultura foi virtualmente a mesma. As contagens de célula bacteriana de *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *glosum* YIT 10392, *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *glosum* YIT 10393, *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* YIT 10394 reduziram apenas cerca de 1/2 a 1/6 após armazenamento por 12 semanas, e a contagem de células bacterianas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

JCM 1253 e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 permaneceram virtualmente inalterada mesmo após 12 semanas.

Exemplo de prescrição 1: Produção de tablete

Vários componentes foram misturados, granulados, secos e medidos de acordo com a seguinte prescrição para produzir um tablete.

(Prescrição)	(mg)
Células bacterianas secas da bactéria da presente invenção ⁽¹⁾	20
Celulose microcristalina	100
Lactose	80
Estearato de magnésio	0,5
metilcelulose	12

⁽¹⁾: Obtido pela liofilização de células viáveis de *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10392

Exemplo de prescrição 2: Produção de bebida de leite fermentado

Glicose 3% foi adicionada a uma solução de leite em pó desnatado 15%, a mistura foi esterelizada, e *pseudolongum subsp. globosum* YIT 10393 foi inoculada à 1% e cultivada anaerobicamente à 35°C por 24 horas para obter 210g de base de leite fermentado. Neste meio tempo, 97g de açúcar e 0,2 g de ferro emulsificado foram dissolvidos em água para fazer 790 g como quantidade total e esterelizado para obter um xarope. A base de leite fermentada e o xarope obtido conforme descrito acima foram misturados, seguido da adição de 1g de sabor, homogeneizado em 15 Mpa, e colocado em um recipiente para obter um leite fer-

mentado. O leite fermentado obtido foi favorável tanto em aparência quanto em sabor, e a contagem de células viáveis imediatamente após a produção foi de $2,5 \times 10^8$ ufc/mL. Além disso, a estabilidade de armazenamento também foi favorável, com a contagem de células viáveis após armazenamento à 10°C por 21 dias sendo $1,4 \times 10^8$ ufc/mL.

Exemplo de prescrição 3: Produção de refrigerante

Os componentes da prescrição abaixo foram misturados e homogeneizados por um método comum de obter refrigerante. O refrigerante obtido foi colocado em um frasco marrom, selado com capa de alumínio e submetido ao tratamento de calor. O refrigerante obtido era favorável em aparência e sabor e a estabilidade também foi favorável.

(Prescrição)	(g)
Células bacterianas secas da bactéria da presente invenção ⁽¹⁾	5
Sabor	0,8
Água	100
Amido reduzido glicosilado	24
frutose	18

⁽¹⁾: Obtido pela liofilização de células viáveis de *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT 10394.

REIVINDICAÇÕES

1. Inibidor da absorção de colesterol
CARACTERIZADO por compreender, como um ingrediente ativo,
pelo menos um microorganismo selecionado de *Bifidobacterium*
5 *animalis* subsp. *animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium animalis*
subsp. lactis JCM 1253, *Bifidobacterium animalis subsp. lac-*
tis JCM 7117 e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum*.

2. Inibidor da absorção de colesterol
CARACTERIZADO por compreender, como um ingrediente ativo,
10 pelo menos um microorganismo selecionado de *Bifidobacterium*
animalis subsp. lactis JCM 1253 e *Bifidobacterium animalis*
subsp. lactis JCM 7117.

3. Inibidor da absorção de colesterol
CARACTERIZADO por compreender, como um ingrediente ativo,
15 pelo menos um microorganismo selecionado de *Bifidobacterium*
animalis subsp. animalis YIT 10394, *Bifidobacterium pseudo-*
longum subsp. globosum YIT 10392 e *Bifidobacterium pseudo-*
longum subsp. globosum YIT 10393.

4. Microorganismo, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser
20 *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394 (FERM
ABP-10662), *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* YIT
10392 (FERM ABP-10660) ou *Bifidobacterium pseudolongum*
subsp. globosum YIT 10393 (FERM ABP-10661).

20015185-8

RESUMO

"INIBIDOR DA ABSORÇÃO DE COLESTEROL"

É relatado uma bactéria pertencente ao gênero *Bifidobacterium* que apresenta uma excelente habilidade de sobreviver em trato digestivo, tem um efeito de inibir a absorção de colesterol no trato intestinal, é excelente na melhora do metabolismo de lipídio (por exemplo, um efeito de reduzir o nível de colesterol no sangue) e apresenta uma alta taxa de sobrevivência após armazenamento. Também é relatado um inibidor de absorção de colesterol usando a bactéria. O inibidor de absorção de colesterol compreende, como um ingrediente ativo, pelo menos um microorganismo selecionado de *Bifidobacterium animalis subsp. animalis* YIT 10394, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 1253, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* JCM 7117 e *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum*.