



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 413**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01273608 .8**

96 Fecha de presentación : **21.12.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1371735**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2003**

54

Título: **Procedimiento de evaluación del grado de acceso al intestino de bifidobacterium en alimento o bebida de leche fermentada.**

30

Prioridad: **01.02.2001 JP 2001-25297**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.07.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.07.2011

73

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

72

Inventor/es: **Shimakawa, Yasuhisa;
Serata, Masaki;
Tsuji, Hirokazu;
Sonoike, Koichiro;
Takagi, Akimitsu;
Miura, Mika y
Ishikawa, Fumiyasu**

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 362 413 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

Procedimiento de evaluación del grado de acceso al intestino de *Bifidobacterium* en alimento o bebida de leche fermentada

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento conveniente para evaluar el grado al que las bacterias *Bifidobacterium* en un alimento o bebida de leche fermentada llegan a los intestinos cuando el alimento o bebida se administra por vía oral a seres humanos; y a bacterias *Bifidobacterium* que tienen una alta viabilidad cuando se evalúan mediante el procedimiento.

10

Técnica anterior

Se informa que las bacterias *Bifidobacterium* presentan diversos efectos fisiológicos tales como efectos inhibidores contra bacterias intestinal nocivas, efectos de control de la función intestinal y efectos de inmunoactivación. Se han puesto en el mercado varios productos que contienen bacterias *Bifidobacterium*, por ejemplo, en forma de productos de leche fermentada o preparaciones que contienen bacterias vivas, y han establecido una firme posición en el mercado. En particular, una fuerte preferencia por alimento y bebida de leche fermentada permite el consumo continuo de bacterias *Bifidobacterium* y, por tanto, son una forma adecuada de administración.

15

20

Las bacterias *Bifidobacterium* presentan la mayoría de sus efectos fisiológicos mediante la producción de ácido acético o similares como un metabolito después de llegar a los intestinos. Con el fin de producir efectos satisfactorios, deben llegar a los intestinos en la forma viable. El grado al que las bacterias llegan a los intestinos se ha considerado convencionalmente con su relación de recuperación a partir de las heces como un índice. Descrito específicamente, el número de bacterias vivas en las heces refleja el grado al que las bacterias llegan a los intestinos de manera que el grado se ha confirmado recogiendo las heces de los seres humanos a los que se administraron las bacterias y contando el número de bacterias vivas (relación de recogida) en las heces.

25

Generalmente se considera que las bacterias *Bifidobacterium* tienen dificultades en llegar a los tractos intestinales debido a la débil tolerancia a un ácido y a la bilis. En otras palabras, cuando se toman por vía oral, existe la posibilidad de que sean destruidas por el jugo gástrico o la bilis antes de llegar a los intestinos.

30

En los últimos años, la mejora de diversas técnicas de producción permite un aumento en número muy alto de las bacterias que pueden administrarse de manera que si algunas de las bacterias son destruidas, todavía pueden esperarse efectos fisiológicos de las restantes. Tras la producción de alimentos fermentados que contienen bacterias *Bifidobacterium* se añade una variedad de componentes para mejorar la viabilidad bacteriana durante el almacenamiento, por ejemplo, N-acetil-glucosamina, ácido pantoténico, péptidos y lactulosa. Su acción se considera para aumentar el grado al que las bacterias *Bifidobacterium* llegan a los intestinos después de su administración.

35

40

Con el fin de obtener efectos fisiológicos más fuertes debe producirse un mayor número de bacterias viables para alcanzar los intestinos. Por consiguiente, existe una exigencia de mejora del grado al que las bacterias llegan a los intestinos. Una prueba de administración a seres humanos es inevitable para encontrar el grado, es decir, una relación de recuperación de ellas a partir de las heces. Sin embargo, trabajos engorrosos y a largo plazo necesarios para la prueba han dificultado la implementación de una prueba tal.

45

J. Dairy Sci. 80 (1997) 1031-1037 describe un modelo dinámico del estómago y el intestino delgado para probar la supervivencia de bacterias de ácido láctico.

50

Hay algunos informes sobre la producción de una cepa dotada de antemano de tolerancia a jugo gástrico o a la bilis que será de otro modo una barrera contra las bacterias tomadas por vía oral. Por ejemplo, en la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público nº Hei 9-322762 se describe que el uso de bacterias *Bifidobacterium* que presentan alta tolerancia a ácidos, sal biliar y a oxígeno permite el cultivo en leche desnatada o similares bajo condiciones anaerobias sin añadir una sustancia promotora del crecimiento. En International Journal of Food Microbiology, 47, 25-32(1999), se describen dos cepas de bacterias *Bifidobacterium* que tienen alta tolerancia a un ácido y a la bilis.

55

Considerando la posibilidad de mejorar el grado al que las bacterias llegan a los intestinos tras su administración usando tales bacterias altamente tolerantes, los presentes inventores crearon una cepa tal que tiene alta tolerancia a un ácido y a la bilis, prepararon un alimento o bebida de leche fermentada que contenía jarabe usando la cepa, lo administraron a seres humanos y encontraron una relación de recuperación a partir de las heces. Como resultado se ha revelado que no siempre hay una correlación entre la tolerancia y la relación de recuperación.

60

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es construir un sistema de evaluación conveniente y preciso que refleje el grado al que las bacterias *Bifidobacterium* en un alimento o bebida de leche fermentada llegan a los intestinos. Otro objeto de la presente invención es crear una cepa superior en el grado con respecto a las bacterias

65

Bifidobacterium convencionales y proporcionar un alimento o bebida de leche fermentada que contenga bacterias *Bifidobacterium* usando las bacterias.

Divulgación de la invención

5 Los presentes inventores llevaron a cabo una investigación sobre una relación de recuperación de bacterias *Bifidobacterium* a partir de las heces de personas a las que se les habían administrado alimento o bebida de leche fermentada que contenía bacterias *Bifidobacterium*. Como resultado se ha encontrado que en un alimento o bebida de leche fermentada, particularmente un alimento o bebida de leche fermentada que contiene jarabe, una relación de recuperación es relativamente alta justo después de la preparación, pero muestra una drástica reducción después de aproximadamente una semana desde la preparación. Si se tiene en consideración la distribución del alimento y bebida de leche fermentada, debe mantenerse una relación de recuperación suficientemente alta incluso después del almacenamiento durante un periodo tal. Los presentes inventores ha llevado a cabo otra investigación usando un alimento o bebida de leche fermentada que contiene bacterias *Bifidobacterium* y jarabe almacenado durante aproximadamente una semana. Como resultado se ha encontrado que el grado al que las bacterias *Bifidobacterium* en un alimento o bebida de leche fermentada llegan a los intestinos cuando el alimento o bebida es administrado por vía oral puede evaluarse convenientemente y con exactitud midiendo la viabilidad bacteriana después de tratamientos sucesivos con un ácido y bilis. También se ha descubierto que cuando se administra una leche fermentada o alimento que contiene una cepa que presenta al menos viabilidad bacteriana predeterminada, con la viabilidad bacteriana después de tratamientos sucesivos con un ácido y bilis como índice, el grado al que las bacterias llegan a los intestinos es excelente incluso aproximadamente una semana después de la preparación del alimento o bebida, que conduce a completarse la invención.

25 Por tanto, en un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para evaluar el grado al que las bacterias *Bifidobacterium* en un alimento o bebida de leche fermentada que contiene bacterias *Bifidobacterium* llegan a los intestinos cuando el alimento o bebida fermentado se administra por vía oral a seres humanos que comprende tratar sucesivamente el alimento o bebida de leche fermentada con un ácido y luego bilis como se define en la reivindicación 1; y medir la viabilidad bacteriana después de estos tratamientos.

30 En otro aspecto de la presente invención también se proporcionan bacterias *Bifidobacterium* como se define en la reivindicación 3 que presentan al menos el 20% de viabilidad bacteriana como se mide por el procedimiento de evaluación anteriormente descrito; y un alimento o bebida de leche fermentada que contiene bacterias *Bifidobacterium* que comprende las bacterias anteriormente descritas.

35 Mejor modo para llevar a cabo la invención

Cualquier alimento o bebida de leche fermentada que contenga bacterias *Bifidobacterium* puede usarse para la evaluación en la presente invención. Ejemplos incluyen alimento y bebida de leche fermentada que pueden obtenerse cada uno añadiendo un jarabe a una leche fermentada preparada cultivando bacterias *Bifidobacterium* en un medio nutritivo tal como medio GAM (producto de Nissui Pharmaceutical) y luego cultivando las bacterias resultantes como una semilla en un medio de leche. En particular, el grado al que las bacterias *Bifidobacterium* en un alimento o bebida de leche fermentada que contiene jarabe alcanzan los intestinos se reduce durante el almacenamiento de manera que el procedimiento de evaluación de la presente invención presenta eficacia para productos de leche fermentada que contienen jarabe. El término "leche" como se usa en este documento significa leche de vaca (leche entera), leche desnatada que es un producto procesado de la misma, leche de otro animal tal como cabra, oveja o similares, y leche de soja que es de origen vegetal. Ejemplos del jarabe incluyen sacáridos tales como glucosa, sacarosa, jarabe de fructosa-glucosa, jarabe de glucosa-fructosa y miel en panal; y alcoholes de azúcar tales como sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol y Palatinit. El contenido del jarabe es preferentemente del 0,1 al 10% en peso. El alimento o bebida de leche fermentada contiene preferentemente 1×10^7 a 5×10^9 ufc/ml, particularmente preferentemente 1×10^8 a 1×10^9 ufc/ml de bacterias *Bifidobacterium*. El número de bacterias que supera 5×10^9 perturba el juicio preciso debido a que la carga de un ácido o bilis es insuficiente para una cifra tal. Por otra parte, un número de bacterias inferior a 1×10^7 es inapropiado debido a que la carga de un ácido o bilis sobre cada bacteria es excesivamente grande.

55 En el alimento o bebida de leche fermentada puede incorporarse un emulsionante tal como éster de ácido graso de sacarosa, éster de ácido graso de poliglicerina o lecitina, y un espesante (estabilizador) tal como agar, gelatina, carragenina, goma guar, goma xantana, pectina o goma de semilla de algarroba. También pueden incorporarse vitaminas tales como vitamina A, vitaminas B, vitamina C y vitamina E, y extractos herbales.

60 Pueden usarse microorganismos distintos de bacterias *Bifidobacterium* en combinación con las mismas para la preparación de un alimento o bebida de leche fermentada. Ejemplos preferidos de microorganismos incluyen bacterias *Lactobacillus* tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*; bacterias *Streptococcus* tales como *Streptococcus thermophilus*; bacterias *Lactococcus* tales como *Lactococcus lactis subsp. lactis*; bacterias *Bacillus* tales como

Bacillus subtilis; y levaduras que pertenecen a los géneros *Saccharomyces*, *Torulaspota* y *Candida* tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* y *Candida kefir*.

5 Se prefiere un alimento o bebida de leche fermentada preparado usando, en combinación con bacterias *Bifidobacterium*, al menos una bacteria de ácido láctico seleccionada de las bacterias *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Lactococcus* anteriormente descritas porque debido a la alta preferencia por una bebida tal se facilita la administración continua y además es altamente eficaz para mejorar el grado de acceso intestinal o relación de recuperación.

10 El alimento o bebida de leche fermentada puede prepararse de un modo en sí conocido en la materia. Por ejemplo, una base de leche fermentada se prepara inoculando y cultivando bacterias *Bifidobacterium* individualmente o simultáneamente con bacterias de ácido láctico en un medio de leche esterilizada y luego homogeneizando las bacterias cultivadas. A la base de leche fermentada resultante se añade una disolución de jarabe que se ha preparado por separado. Después de mezclar, la mezcla se homogeneiza en un homogeneizador, seguido de la
15 adición de un aroma, por lo que se prepara un producto final.

Por tanto, el alimento o bebida de leche fermentada disponible puede proporcionarse en uno cualquiera de tipo blando, tipo de aroma de frutas, forma sólida y forma líquida.

20 El alimento o bebida de leche fermentada que va a someterse a tratamientos sucesivos con un ácido y bilis es preferentemente el que se ha almacenado a bajas temperaturas durante 7 días después de completarse la incubación, empezando el almacenamiento el día considerado 0 (en el caso de un alimento o bebida de leche fermentada que contiene jarabe, considerándose 0 el día en el que se añadieron el jarabe y las bacterias *Bifidobacterium*). Tiene preferentemente un pH de 5,0 a 5,8.

25 Aunque no se impone limitación particular a la cepa de las bacterias *Bifidobacterium* que van a emplearse, se prefieren aquellas derivadas de seres humanos. Se prefieren *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium catenulatum* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, de las que se prefieren particularmente *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum*.
30

El término "tratamientos sucesivos con un ácido y bilis" como se usa en este documento significa el tratamiento del alimento o bebida de leche fermentada con un ácido, seguido de tratamiento con bilis. El término "tratamientos sucesivos" como se usa en este documento significa que el tratamiento con bilis se realiza instantáneamente
35 después del tratamiento con un ácido o se realiza sin recuperar la actividad de bacterias. El término "sin recuperar la actividad de bacterias" significa que no se da tratamiento positivo para recuperar la actividad de las bacterias, por ejemplo, adición de un neutralizador a la disolución tratada con ácido o dilución con un tampón o medio.

40 El término "tratamiento con ácido" como se usa en este documento significa el tratamiento de añadir el alimento o la bebida de leche fermentada a una disolución que se ha acidificado más que el pH óptimo de bacterias *Bifidobacterium* mediante la adición de un ácido orgánico tal como ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico, ácido succínico, ácido butírico o ácido propiónico, o un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico o ácido fosfórico, produciendo así el daño al alimento. Aunque no se impone limitación particular al ácido que va a emplearse, se prefiere el uso de un ácido orgánico debido a la existencia de una sal que
45 afecta adversamente el crecimiento de algunas cepas de bacterias *Bifidobacterium* y esta influencia no puede siempre rechazarse cuando se considera una correlación entre viabilidad bacteriana y una relación de recuperación. El uso de ácido acético, ácido láctico o ácido clorhídrico aumenta una correlación entre la viabilidad bacteriana y el grado al que las bacterias llegan a los intestinos y, por tanto, se prefiere particularmente.

50 La disolución que contiene ácido que va a usarse para el tratamiento con ácido se ajusta preferentemente a pH de de aproximadamente 3,0 a 5,5, especialmente preferentemente de aproximadamente 4,0 a 4,5. Si el pH supera 5,5, se vuelve, en la mayoría de los casos, superior al de los propios productos de leche fermentada populares y sólo puede producir un ligero daño a las bacterias *Bifidobacterium*. Por otra parte, a pH inferior a 3,0, la mayoría de las bacterias serán destruidas por una disolución de ácido fuerte tal dentro de un tiempo extremadamente corto. Por
55 tanto, a pH fuera del intervalo anteriormente descrito no puede detectarse una diferencia entre cepas en la viabilidad bacteriana después del tratamiento.

Después de la adición del alimento o bebida de leche fermentada a la disolución que contiene ácido, la mezcla resultante puede tratarse durante aproximadamente 1 a 60 minutos a una temperatura apta para el crecimiento de
60 bacterias *Bifidobacterium*, es decir, aproximadamente 30 a 42°C. Se prefiere el tratamiento a aproximadamente 36 a 38°C durante aproximadamente 10 a 30 minutos, para tales condiciones reflejan las condiciones de vida de las bacterias y son convenientes para la implementación de la prueba.

65 En la presente invención, el alimento o bebida de leche fermentada después del tratamiento con ácido se trata con bilis. Descrito específicamente, el alimento o bebida de leche fermentada después del tratamiento con ácido se añade directamente a una disolución de bilis. Aunque no se impone limitación particular a las condiciones del

tratamiento con bilis, se recomienda añadir el alimento o bebida de leche fermentada tratado con ácido a una disolución obtenida añadiendo fosfato de sodio como neutralizador a aproximadamente 0,1 al 5% de bilis o sal biliar, y tratar la mezcla a 30 a 42°C durante aproximadamente 1 a 240 minutos. Con el fin de aumentar la correlación entre la viabilidad bacteriana y el grado al que las bacterias llegan a los intestinos y diferenciar claramente la tolerancia entre cepas se prefiere añadir aproximadamente 0,5 al 2% de bilis o sal biliar y tratar la mezcla a 36 a 38°C durante aproximadamente 30 a 60 minutos.

Tratamientos sucesivos más preferibles con un ácido y bilis son tratamientos de un alimento o bebida de leche fermentada que contiene bacterias *Bifidobacterium* (el número original de bacterias: aproximadamente 1×10^8) y se ha almacenado durante 7 días con un ácido de pH 4,3 a 36 a 38°C durante 10 a 30 minutos y luego con 1% de bilis a 36 a 38°C durante 30 a 60 minutos.

Condiciones específicas particularmente preferibles de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis son del siguiente modo: Primero, 1 ml de un alimento o bebida de leche fermentada se añade a 10 ml de una disolución de tratamiento con ácido ajustada con ácido acético a pH 4,3 y luego la mezcla resultante se trata a 37°C durante 30 minutos. Exactamente después del primer tratamiento, 1 ml de la disolución tratada con ácido se añade a 10 ml de una disolución de tratamiento con bilis que contiene 1% de bilis, seguido de tratamiento de la misma a 37°C durante 30 minutos. El tratamiento bajo tales condiciones permite que la viabilidad bacteriana coincida aproximadamente con el grado al que las bacterias llegan a los intestinos independientemente del tipo de las cepas que vayan a evaluarse. También hacen posible diferenciar claramente la viabilidad bacteriana entre cepas.

La viabilidad bacteriana después de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis puede determinarse comparando el número de bacterias en el alimento o bebida de leche fermentada antes de los tratamientos con el de después de los tratamientos. En otras palabras, puede calcularse una relación del número de bacterias después de los tratamientos con el de antes de los tratamientos. El número de bacterias puede medirse de un modo en sí conocido en la materia.

La viabilidad bacteriana de bacterias *Bifidobacterium* después de tales tratamientos sucesivos con un ácido y bilis muestra una estrecha correlación con el grado al que las bacterias *Bifidobacterium* en un alimento o bebida de leche fermentada llegan a los intestinos cuando la leche o el alimento se administra por vía oral a seres humanos. Descrito específicamente, la viabilidad bacteriana después de los tratamientos sucesivos sirve de parámetro que varía dependiendo del grado al que las bacterias *Bifidobacterium* llegan a los intestinos tras la administración por vía oral del alimento o bebida de leche fermentada a los seres humanos. No se sabe exactamente, pero se considera que esta estrecha correlación se debe al hecho de que el estrés aplicado a bacterias *Bifidobacterium*, primero por el tratamiento con ácido para reducir su actividad y luego por el tratamiento con bilis, es análogo al estrés que se produce en los tractos intestinales humanos.

El término "grado al que las bacterias llegan a los intestinos" como se usa en este documento significa, en el caso en el que un alimento o bebida de leche fermentada que contiene bacterias *Bifidobacterium* y jarabe se administre por vía oral a seres humanos, una relación del número de las bacterias que llegan a los intestinos con respecto al número de bacterias administradas. El número de bacterias que llegan a los intestinos se considera que es casi similar al número de bacterias recuperado de las heces de manera que en la práctica el último número se considera como el número de bacterias que llegan a los intestinos.

Aunque la viabilidad bacteriana se mide después de o bien el tratamiento con ácido o el tratamiento con bilis, no está disponible ninguna correlación entre la viabilidad bacteriana y el grado al que las bacterias llegan a los intestinos o relación de recuperación. Cuando el tratamiento con ácido y el tratamiento con bilis se realizan en algún intervalo, o cuando el tratamiento con bilis va seguido del tratamiento con ácido, la viabilidad bacteriana no tiene correlación con el grado al que las bacterias llegan a los intestinos o relación de recuperación.

Cuando se emplearon bacterias *Bifidobacterium* convencionales, por ejemplo, para el alimento o bebida tal como producto de leche fermentada, el grado al que las bacterias llegaron a los intestinos o relación de recuperación de las mismas fue suficiente cuando el producto se tomó justo después de la preparación, pero se redujo cuando el producto se suministró después de aproximadamente una semana de refrigeración. Esta tendencia fue notable en un alimento o bebida de leche fermentada que contenía jarabe. La cepa que se ha confirmado que tiene alta viabilidad bacteriana por el procedimiento de evaluación de la presente invención es excelente en el grado al que las bacterias llegan a los intestinos o relación de recuperación incluso después de una semana de almacenamiento en forma de un alimento o bebida de leche fermentada.

En la presente invención se ha confirmado que un alimento o bebida de leche fermentada que ha sido preparado usando una cepa novedosa que tiene viabilidad bacteriana del 20% o superior, más preferentemente 30% o superior, después de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis alcanza un nivel similar del grado al que las bacterias llegan a los intestinos o relación de recuperación al de justamente después de la preparación aunque se almacene durante aproximadamente 1 semana. A pesar de la suposición de que cuanto mayor número de bacterias *Bifidobacterium* en un alimento o bebida de leche fermentada mayor será el grado al que las bacterias llegan a los intestinos, los resultados del estudio por los presentes inventores han revelado que el grado tiende a reducirse

cuando el alimento se almacena durante 1 semana, produciendo una disminución en la relación de recuperación de las heces.

Si un alimento o bebida de leche fermentada que contiene al menos 1×10^8 ufc/ml de bacterias *Bifidobacterium* derivadas de ser humano presenta viabilidad bacteriana del 20% o superior después, después de la refrigeración durante una semana, del tratamiento a 37°C durante 30 minutos con una disolución de tratamiento con ácido ajustada a pH 4,3 con 10 veces el peso de ácido acético y luego el tratamiento a 37°C durante 30 minutos con 10 veces el peso del 1% de ácido biliar, el número de bacterias que llegan a los intestinos puede mantenerse a aproximadamente 1×10^7 ufc/g cuando el alimento o bebida se administra a seres humanos después de una semana de almacenamiento. El alimento y bebida de leche fermentada provistos de tal número de bacterias y viabilidad bacteriana son particularmente preferidos porque si el número de bacterias que llega a los intestinos puede mantenerse a aproximadamente 1×10^7 ufc/g puede controlarse la proliferación de bacterias *Bacteroides* spp. y *Clostridium* spp. que se llaman "bacterias intestinales malas".

No hay limitación particular impuesta a la cepa de bacterias *Bifidobacterium* que tienen alta viabilidad bacteriana después de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis, y puede esperarse un alto grado al que las bacterias llegan a los intestinos o alta relación de recuperación a partir del uso de cualquier cepa derivada de ser humano ejemplificada anteriormente. Entre ellas se prefieren *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longoma* debido a que ya se han confirmado bien los efectos fisiológicos y la seguridad para lactantes o ancianos.

Las cepas que tienen alta tolerancia a tales tratamientos sucesivos con un ácido y bilis pueden producirse, por ejemplo, por el siguiente procedimiento.

A una leche fermentada preparada usando bacterias *Bifidobacterium* como cepa parental se añade un jarabe para preparar una bebida fermentada. La bebida se dispensa en un recipiente apropiado y se refrigera. La bebida fermentada después de la refrigeración se somete a tratamientos con ácido y con bilis, seguido de separación centrífuga para recuperar las bacterias. De estas bacterias se seleccionan aquellas que tienen excelente tolerancia a tratamientos sucesivos con un ácido y bilis.

Aunque cualquier cepa de bacterias *Bifidobacterium* es útil para el procedimiento anteriormente descrito sin limitación, se emplean preferentemente las bacterias seleccionadas de *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longoma* debido a los mismos motivos que se han descrito anteriormente.

Dos cepas YIT 4125 y YIT 4126 que han sido reconocidas por tener alta viabilidad bacteriana después de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis como resultado del procedimiento anteriormente descrito están depositadas en el Depositario de organismos de patente internacional, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Chuo 6 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) el 27 de octubre de 2000; la primera como YIT 4125 de *Bifidobacterium breve* (FERM BP-7813) y la segunda como YIT 4126 de *Bifidobacterium breve* (FERM BP-7814).

Alternativamente, una cepa que tiene alta viabilidad bacteriana después de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis puede seleccionarse exponiéndola a rayos ultravioletas o tratándola con un mutágeno tal como nitrosoguanidina (NTG) o sulfonato de etilmetano (EMS).

Las bacterias *Bifidobacterium* que tienen alta viabilidad bacteriana después de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis, cuyas bacterias han sido obtenidas por el procedimiento anteriormente descrito u otro procedimiento, presentan un alto grado al que las bacterias llegan a los intestinos o relación de recuperación. Las dos cepas anteriormente descritas son cepas excelentes con viabilidad bacteriana del 35% o superior después de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis.

Además, la presente invención se refiere a alimento y bebida de leche fermentada que contienen bacterias *Bifidobacterium* y jarabe como se define en la reivindicación 4, que tienen alta viabilidad bacteriana después de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis. Las formas del alimento y bebida de leche fermentada son similares a aquellas descritas anteriormente.

Ejemplos

La presente invención se describirá en lo sucesivo en más detalle mediante los ejemplos. Sin embargo, debe tenerse en mente que la presente invención no está limitada a o por ellos.

Ejemplo de referencia 1

Las bacterias obtenidas tratando la cepa 4052 de *Bifidobacterium breve* (B. breve A), una cepa parental, con N-metil-N'-nitrosoguanidina (NTG) se cultivaron en un medio anaerobio de leche desnatada. A 10 ml de una disolución de tratamiento con ácido (pH 3,8) se añadió 1 ml de la disolución de cultivo resultante, seguido de tratamiento a

37°C durante 8 minutos. En un medio anaerobio de leche desnatada, el 1% de la disolución resultante se inoculó y se cultivó a 37°C durante 20 horas. Después del almacenamiento de la disolución de cultivo a 10°C durante 4 días, 1 ml de la disolución resultante se añadió a 10 ml de una disolución de tratamiento con ácido (pH 3,8), por lo que se realizó un tratamiento similar. Las bacterias después del tratamiento se cultivaron en un medio de leche desnatada. Se seleccionaron varias cepas derivadas de colonias individuales del cultivo y se comparó su tolerancia a ácidos. Como resultado, la cepa N4 de *Bifidobacterium breve* (*B. breve* B) se seleccionó como una cepa que tenía tolerancia a ácidos mejorada. La cepa había mejorado al mismo tiempo la tolerancia a la bilis.

Composición del medio anaerobio de leche desnatada

Leche desnatada	12%
Extracto de levadura	1%
Cisteína	0,03%
Carbonato cálcico	2%

Se burbujeó nitrógeno en el medio durante 20 minutos, seguido de cierre con un tapón de goma y esterilización en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

Ejemplo 1

Se prepararon tres leches fermentadas inoculando cultivos de siembra de *B. breve* A, *B. breve* B (cepa N4) y *B. bifidum* C (cepa YIT 4007) en un medio de leche entera al 18% (añadido con extracto de levadura al 0,03%) esterilizado a 100°C durante 90 minutos y cultivando a 34°C durante aproximadamente 20 horas. A cada una de las leches fermentadas así obtenidas se añadió un jarabe de glucosa-fructosa para dar una concentración final del 8% y las mezclas resultantes se usaron como muestras de prueba. Estas muestras se dispensaron cada una en un recipiente de vidrio. Después de cerrarse el recipiente con un tapón de goma para cortar el flujo de aire el recipiente se almacenó a 10°C durante 7 días.

Se estudió la recuperación de bifidobacterias de las heces de seres humanos administrados con estas muestras. Dieciocho voluntarios masculinos adultos sanos (edad promedio: 33) se dividieron en tres grupos al azar y se les pidió que bebieran durante 3 días 100 ml/día de la leche fermentada preparada usando cada cepa. Al día siguiente después de completarse la bebida, sus heces se recuperaron y se diluyeron escalonadamente con una disolución de dilución anaerobia. El número de bacterias recuperadas se calculó a partir del número de colonias que aparecieron en una placa selectiva. Se usó una placa T-CBPC para las cepas A y B de *B. breve*, mientras que se usó una placa T-LCM para la cepa C de *B. bifidum*.

Composición del agua anaerobia de dilución

Dihidrogenofosfato de potasio	0,0225%
Hidrogenofosfato de dipotasio	0,0225%
Cloruro sódico	0,045%
Sulfato de amonio	0,0225%
Cloruro de calcio	0,00225%
Sulfato de magnesio	0,00225%

Después de disolverse la composición anteriormente descrita en agua destilada se burbujeó nitrógeno en la disolución resultante para hacerla anaerobia. Con un tapón de goma el aire se cortó, seguido de esterilización en autoclave (121°C durante 15 minutos).

Composición de la placa T-CBPC

TOS (producto de Yakult)	1%
Tripticasa-peptona (BBL)	1%
Extracto de levadura (Difco)	0,1%
Dihidrogenofosfato de potasio	0,3%
Hidrogenofosfato de dipotasio	0,45%
Sulfato de amonio	0,3%
Sulfato de magnesio	0,02%
Clorhidrato de cisteína	0,05%
Lab-Lemco en polvo (OXOID)	0,1%
Agar (Difco)	1,5%

La composición anteriormente descrita se disolvió en agua destilada, seguido de esterilización en autoclave a 115°C durante 15 minutos. Después de enfriarse hasta 50°C se añadieron carbenicilina (Sigma) que había sido esterilizada por filtración y sulfato de estreptomina (Sigma) a la disolución resultante para dar concentraciones finales de 1 µg/ml y 0,5%, respectivamente. De tal forma se preparó una placa de agar.

Preparación de la placa T-LCM

5 Se preparó una placa T-LCM de un modo similar al empleado para la preparación de la placa T-CBPC anterior, excepto que se añadieron 2 µg/ml de lincomicina (Sigma) en lugar de 1 µg/ml de carbenicilina (Sigma) como antibiótico esterilizado por filtración.

10 Como resultado se observó una diferencia en la propiedad de recuperación como se describe a continuación entre tres leches fermentadas usando tres cepas de bifidobacterias.

Tabla 1

Cepa	A	B	C
El número inicial de bacterias	$3,99 \times 10^8$	$3,16 \times 10^8$	$7,94 \times 10^8$
El número de bacterias recuperadas	$4,79 \times 10^4$	$4,37 \times 10^5$	$9,55 \times 10^6$

Ejemplo 2

15 Se estudio el sistema de modelo *in vitro* que refleja la propiedad de recuperación en el Ejemplo 1. Con preferencia sobre la conveniencia se estudió el sistema que permitía completar el tratamiento en el transcurso de 30 minutos a 1 hora.

20 Primero, la tolerancia al tratamiento con ácido se evaluó como un modelo de estómago por el que el alimento pasa primero entre tubos digestivos. Como disolución de tratamiento con ácido se usó una disolución que tenía un pH reducido mediante la adición de un ácido a un medio de bifidobacterias, con referencia al procedimiento de Kobayashi, y col. (Japanese Journal of Bacteriology, 29, 691-697(1974)).

25 Composición de la disolución de tratamiento con ácido

Tripticasa-peptona (BBL)	1%
Extracto de levadura (Difco)	0,5%
Triptosa (Difco)	0,3%
Cloruro sódico	0,2%
Citrato de monoamonio	0,2%
Clorhidrato de cisteína	0,05%
Lactosa	1%
Ácido pirúvico	0,1%
Tween 80	0,1%
Sulfato de magnesio	0,0575%
Sulfato ferroso	0,0034%
Manganeso sulfato	0,012%

30 La composición anteriormente descrita se disolvió en agua destilada. Se añadió un ácido tal como ácido acético para ajustar el pH de la disolución a 3 a 5,5, seguido de esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Como resultado de la investigación sobre el pH de la disolución de tratamiento con ácido se encontró que el pH fijado a 3,8 o superior permitió la medición del número de bacterias supervivientes después del tratamiento durante 1 a 30 minutos. Por tanto, se empleó la disolución de tratamiento con ácido que tenía un pH de 3,8.

35 A 10 ml de la disolución de tratamiento con ácido que tenía un pH 3,8 se añadieron 1 ml de cada una de las tres muestras usadas en el Ejemplo 1, seguido de incubación a 37°C. Durante el tratamiento, el muestreo se realizó según se necesitara y se contó el número de bacterias vivas. La velocidad de muerte se determinó basándose en los datos así obtenidos. Los resultados son como se muestran a continuación.

Tabla 2

Cepa	A	B	C
Velocidad de muerte durante el tratamiento con ácido (logaritmo del número de bacterias destruidas por minuto)	0,55	0,38	0,51

Los resultados anteriormente descritos muestran que la cepa B es excelente en la velocidad de muerte por el tratamiento con ácido que, sin embargo, no coincide con el orden del Ejemplo 1 en el número de bacterias recuperadas después de la administración real.

45 Ejemplo 3

A continuación se comparó la tolerancia al tratamiento con bilis asumiendo que las bacterias llegaron a los intestinos. Como disolución de tratamiento se consideró apropiada la que tenía la composición descrita a continuación y a la que se añadió Oxgall cuando el tiempo de tratamiento y la capacidad de medida del número de bacterias se tuvieron en consideración como en el caso del tratamiento con ácido.

5

Composición de la disolución de tratamiento con bilis

Tripticasa-peptona(BBL)	1%
Extracto de levadura (Difco)	0,5%
Triptosa (Difco)	0,3%
Hidrogenofosfato de disodio 12 hidratado	2,03%
Dihidrogenofosfato de sodio 2 hidratado	0,156%
Citrato de diamonio	0,2%
Clorhidrato de cisteína	0,05%
Lactosa	1%
Ácido pirúvico	0,1%
Tween 80	0,1%
Sulfato de magnesio	0,0575%
Sulfato ferroso	0,0034%
Sulfato de manganeso	0,012%

10 La composición anteriormente descrita se disolvió en agua destilada. A la disolución resultante se añadió 0,1 al 5% de Oxgall (Difco) para disolver el último en el primero. La disolución se ajustó a pH 8,0 con una disolución de hidróxido sódico, seguido de esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

15 Como resultado de investigación sobre la concentración de Oxgall se encontró que la concentración de Oxgall fijada al 1% o menos permitió la medición del número de bacterias supervivientes después del tratamiento durante 1 a 30 minutos. Por tanto, se empleó la disolución de tratamiento con bilis que tenía una concentración de Oxgall del 1%. A 10 ml de la disolución de tratamiento con bilis que contenía 1% de Oxgall se añadieron 1 ml de cada una de las tres muestras usadas en el Ejemplo 1, seguido de tratamiento a 37°C durante 30 minutos. Después del tratamiento se contó el número de bacterias vivas. La viabilidad bacteriana después del tratamiento con bilis se midió basándose en los datos así obtenidos. Los resultados son como se muestran a continuación.

20

Tabla 3

Cepa	A	B	C
Viabilidad bacteriana (%) después del tratamiento con bilis	<0,1	60	30

25 Se ha encontrado que la cepa B mostró la mayor tolerancia a la bilis, que sin embargo fue diferente de los resultados de recuperación reales.

25

Ejemplo 4

30 También se realizaron tratamiento con ácido *in vitro* y tratamiento con bilis sucesivamente considerando que cuando el alimento pasa por los tubos digestivos pasa sucesivamente por el estómago y los intestinos. En estos tratamientos sucesivos con un ácido y bilis, el ajuste de una disolución de tratamiento con ácido a pH 4,3 o superior y una disolución de tratamiento con bilis para tener una concentración de Oxgall del 1% permitieron la medición del número de bacterias supervivientes después del tratamiento. Descrito específicamente, los tratamientos sucesivos se realizaron con un ácido y bilis como se describe a continuación.

35 A 10 ml de una disolución de tratamiento con ácido ajustada a pH 4,3 con ácido acético se añadió 1 ml de la leche fermentada que contenía jarabe como se empleó en el Ejemplo 1, seguido de tratamiento a 37°C durante 30 minutos. Inmediatamente después del tratamiento se añadió 1 ml de la disolución tratada con ácido a una disolución de tratamiento con bilis que contenía 1% de Oxgall, seguido de tratamiento a 37°C durante 30 minutos. Se comparó una relación de supervivencia de bacterias después de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis entre tres cepas.

40

Tabla 4

Cepa	A	B	C
Relación de supervivencia (%) después de tratamientos sucesivos	<1	3	10

45 Según los resultados de evaluación, la viabilidad bacteriana después de los tratamientos sucesivos coincidió con los resultados de recuperación reales del Ejemplo 1. En otras palabras, la relación de supervivencia de la cepa B fue la mayor en el caso de tratamiento único con un ácido o bilis, mientras que la de cepa C fue la mayor después de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis, que coincidieron con los resultados de la recuperación real. Esto sugiere que la recuperación de bacterias administradas mediante una bebida puede preverse basándose en los resultados

de los tratamientos sucesivos *in vitro*.

Ejemplo 5

5 La evaluación por los tratamientos sucesivos anteriormente descritos se realizó usando una cepa cultivada, la cepa NE de *B. breve* (cepa D) a la que se había conferido tolerancia a la bilis mediante el procedimiento descrito a continuación.

10 Primero, la cepa A de *B. breve* usada como base se sometió a mutación. Se mezclaron un tampón fosfato 50 mM (pH 7,0) que contenía 5 µg/ml de NTG y las bacterias de *B. breve* lavadas a una relación de 1:1. Después del tratamiento a 37°C durante 30 minutos, la mezcla se lavó dos veces con un tampón fosfato (pH 7,0). Entonces se inoculó un medio nutritivo con 1% de las bacterias resultantes, seguido de incubación a 37°C durante 16 horas.

15 Las bacterias tratadas con NTG resultantes se sometieron a tratamiento con EMS. Se mezclaron un tampón fosfato 50 mM (pH 7,0) que contenía 0,4% de EMS y las bacterias cultivadas anteriormente descritas a una relación de 1:1. Después del tratamiento a 37°C durante 30 minutos, la mezcla se lavó dos veces con un tampón fosfato (pH 7,0). Se inoculó un medio nutritivo con 1% de las bacterias resultantes, seguido de cultivo a 37°C durante 16 horas.

20 Se preparó un cultivo de siembra usando las bacterias resultantes como semilla inicial (con adición de 0,03% de extracto de levadura). Se inoculó en un medio de leche entera al 18% esterilizado a 100°C durante 90 minutos y se cultivó a 34°C durante aproximadamente 20 horas, por lo que se preparó una leche fermentada. Se añadió un jarabe de glucosa-fructosa a la leche para dar una concentración final del 8%. La mezcla resultante se dispensó en un recipiente de vidrio. Después de cerrarlo con un tapón de goma, el recipiente se almacenó a 10°C durante 10 días. Entonces, 10 ml de la muestra después del almacenamiento se añadieron a 100 ml de una disolución de tratamiento con bilis que tenía la composición que se ha descrito en el Ejemplo 4 y que contenía 2% de Ovgall. Después del tratamiento con bilis a 37°C durante 30 minutos, la disolución se centrifugó a 5000 x g durante 10 minutos para recuperar las bacterias. Las bacterias resultantes se extendieron sobre una placa de agar. A partir del cultivo así obtenido se seleccionaron varias cepas derivadas de una única colonia y se obtuvo la cepa D que tenía tolerancia mejorada.

30 Usando la cepa resultante y la cepa C se prepararon leches fermentadas que contenían jarabe como en el Ejemplo 1. De un modo similar al empleado en el Ejemplo 4, la tolerancia a los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis se comparó entre estas muestras que habían sido almacenadas a 10°C durante 7 días. Los resultados se muestran a continuación.

35

Tabla 5

Cepa	(ufc/ml)	
	D	C
El número original de bacterias	$2,1 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$
El número de bacterias supervivientes después de tratamientos sucesivos	$3,7 \times 10^7$	$9,3 \times 10^7$
Relación de supervivencia	18%	18%

40 Al mismo tiempo, la prueba de bebida se realizó en estas muestras. Veinte voluntarios adultos sanos se dividieron en dos grupos y se les pidió que tomaran 100 ml/día de cada una de las dos leches fermentadas que contenían jarabe preparadas en el Ejemplo 5 durante 3 días. Al día siguiente después de completarse la bebida, las heces se recogieron y se diluyeron escalonadamente con un agua anaerobia de dilución. El número de bacterias así recuperadas se calculó a partir del número de colonias que aparecieron en la placa selectiva. Se usó una placa T-CBPC para la cepa D de *B. breve*, mientras que se usó una placa T-LCM para la cepa C de *B. bifidum*. Los resultados se muestran a continuación.

45

Tabla 6

Cepa	D	C
El número de bacterias recuperadas (logaritmo)	6,26	6,44

50 A partir de estos resultados se ha encontrado que la cepa D cultivada mientras se sometía a un único tratamiento con bilis presentó una relación de supervivencia inferior al 20% después de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis y el número de bacterias recuperadas después de la administración mediante bebida no llegó a 1×10^7 .

Ejemplo 6

55 Como se ha encontrado que hay una alta posibilidad de que la tolerancia evaluada por medio de los tratamientos sucesivos establezca una correlación con la recuperación de bacterias después de la administración mediante bebida, una cepa se cultivó mientras se sometía a los tratamientos sucesivos y la cepa resultante que tenía tolerancia se estudió para la recuperación de bacterias después de la administración mediante bebida.

Se inoculó un cultivo de siembra preparado usando la cepa A como base en un medio de leche entera al 20% (añadido con 0,03% de extracto de levadura) esterilizado por UHT a 135°C durante 3,5 segundos, seguido de incubación a 34°C durante aproximadamente 20 horas, por lo que se obtuvo una leche fermentada. Entonces se añadió palatinosa a la leche para dar una concentración final del 10%.

La mezcla resultante se dispensó en un recipiente de vidrio. Mientras que el recipiente se cerró con un tapón de goma para bloquear la entrada del aire en el recipiente, se almacenó a 10°C durante 11 días. A 10 ml de la muestra después del almacenamiento se añadieron 100 ml de un disolución de tratamiento con ácido que tenía una composición como se muestra en el Ejemplo 4 y que tenía un pH ajustado a 4,3. Inmediatamente después la mezcla resultante se trató a 37°C durante 30 minutos, se añadieron 10 ml de la disolución tratada a una disolución de tratamiento con bilis que contenía 1% de Oxgall. La mezcla se trató a 37°C durante 30 minutos y luego se centrifugó a 5640 x g durante 10 minutos para recuperar las bacterias. Las bacterias resultantes se extendieron sobre una placa de agar. A partir de los cultivos así obtenidos se seleccionaron varias cepas derivadas de una única colonia por lo que se obtuvieron la cepa YIT 4125 de *B. breve* (que puede llamarse en lo sucesivo "cepa 4125") y la cepa YIT 4126 (que puede llamarse en lo sucesivo "cepa 4126") que tenían tolerancia mejorada a un ácido y a la bilis.

Usando estas cepas y la cepa A se prepararon leches fermentadas que contenían jarabe de un modo similar al descrito al principio del Ejemplo 6. Después del almacenamiento a 10°C durante 7 días, el número de bacterias supervivientes después de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis se determinó de un modo similar al empleado en el Ejemplo 4.

La prueba de bebida también se realizó en estas muestras. Diez voluntarios masculinos adultos sanos se dividieron en dos grupos y se les pidió que tomaran durante 3 días 100 ml/día de una cualquiera de una muestra preparada usando la cepa 4125 o la cepa A. Se recogieron las heces al día siguiente después de completarse la bebida y se midió el grado de recuperación de las bacterias administradas usando una placa T-CBP. Después de un intervalo de 1 semana, a los voluntarios de cada uno grupo se les pidió que tomaran una muestra diferente de la primera y se contó el número de bacterias recuperadas. Un promedio de los resultados de las mediciones realizadas dos veces para cada cepa se designó como el número de bacterias recuperadas.

La Tabla 7 muestra los resultados de una relación de supervivencia después de los tratamientos sucesivos con un ácido y bilis y los resultados de recuperación de bacterias administradas mediante bebida, cada una en el Día 7 después del almacenamiento de la leche fermentada; y una relación de cambio en el número de bacterias vivas en el producto de leche fermentada durante 7 días de almacenamiento. La "relación de cambio" como se usa en este documento significa el número de bacterias vivas, en términos de logaritmo, que disminuyeron por día durante el almacenamiento a baja temperatura.

Tabla 7

Cepa	A	Cepa 4125	Cepa 4126
Número inicial de bacterias	$3,7 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$
El número de bacterias supervivientes después de tratamientos sucesivos	$7,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
Relación de supervivencia	0,2%	39,4%	56,8%

El número de bacterias recuperadas

Cepa	A	Cepa 4125	Cepa 4126
El número de bacterias recuperadas (logaritmo)	6,4	7,0	Sin prueba

Tasa de cambio del número de bacterias vivas en el producto

Cepa	A	Cepa 4125
Tasa de cambio del número de bacterias vivas por día	0,22	0,05

Las cepas 4125 y 4126 obtenidas en el presente ejemplo mostraron tolerancia del 20% o superior a un ácido y a la bilis. El número de bacterias recuperadas cuando se administró la cepa 4125 mediante bebida fue 1×10^7 ufc/ml o superior.

Una tasa de cambio del número de bacterias vivas durante el almacenamiento del producto fue pequeña, sugiriendo que el número de bacterias se mantuvo alto.

A partir de los resultados anteriormente descritos se ha encontrado que cuando la relación de supervivencia después de tratamientos sucesivos con un ácido y bilis es el 20% o superior, el número de bacterias recuperadas después de su administración mediante bebida es 10^7 ufc/ml.

Entonces se realizó una prueba de almacenamiento a 10°C durante tres semanas en las muestras anteriormente descritas. Una relación de supervivencia de bacterias en el producto después del almacenamiento durante 3

semanas se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

Cepa	A	Cepa 4125
Relación de supervivencia después de 3 semanas	21,0%	69,6%

- 5 Una relación de supervivencia de las bacterias en el producto obtenido usando la cepa 4125 fue alta incluso después del almacenamiento durante 3 semanas.

Ejemplo 7

- 10 A continuación se investigó un producto comercialmente disponible. La tolerancia a un ácido y a la bilis de cada una de una leche fermentada que contenía bacterias *Bifidobacterium* y jarabe comercialmente disponible (leche fermentada E) y la leche fermentada del Ejemplo 6 preparada usando la cepa 4125 (cada leche fermentada se almacenó durante 7 días) se midió como en el ejemplo 4.
- 15 Al mismo tiempo, a un voluntario adulto sano se le pidió que tomara estos productos después de la comida en un intervalo de una semana y al día siguiente se contó el número de bacterias *Bifidobacterium* derivadas de cada producto y contenidas en las heces. El número de bacterias *Bifidobacterium* derivadas del producto se calculó del siguiente modo: primero cultivando selectivamente sólo bacterias *Bifidobacterium* en las heces sobre una placa de TOS (preparada de un modo similar a la placa T-CBPC del Ejemplo 1, excepto por la omisión de un antibiótico),
- 20 identificado, de entre ellas, las bacterias *Bifidobacterium* derivadas del producto por huella de ADN polimórfico amplificado al azar (procedimiento RAPD) y calculando el número de bacterias recuperadas basándose en su población existente. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

Producto	Producto E comercialmente disponible	Cepa 4125
El número inicial de bacterias	$5,2 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$
El número de bacterias supervivientes después de tratamientos sucesivos con un ácido y bilis	$8,5 \times 10^6$	$7,3 \times 10^7$
Relación de supervivencia	16,3%	42,9%

- 25 El número de bacterias recuperadas

Cepa	E	Cepa 4125
El número de bacterias recuperadas (logaritmo)	< 6,89	7,20

- 30 Con respecto a la leche fermentada que contenía jarabe comercialmente disponible, una relación de supervivencia de bacterias después de tratamientos sucesivos con un ácido y bilis fue inferior a 20% y la tasa de recuperación de bacterias después de la administración mediante bebida no llegó a 1×10^7 ufc/ml.

Aplicabilidad industrial

- 35 La presente invención hace posible evaluar convenientemente y con exactitud el grado al que las bacterias *Bifidobacterium* en un alimento de leche fermentada llegan a los intestinos.

- 40 La presente invención también hace posible proporcionar alimento y bebida de leche fermentada que contienen bacterias *Bifidobacterium* que permiten el alto grado al que las bacterias llegan a los intestinos incluso después de almacenamiento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de evaluación del grado al que las bacterias *Bifidobacterium* en un alimento o bebida de leche fermentada que contiene bacterias *Bifidobacterium* llegan a los intestinos cuando el alimento o bebida se administra por vía oral a seres humanos, que comprende someter el alimento o bebida de leche fermentada a tratamientos sucesivos con un ácido y bilis, y medir la viabilidad bacteriana después de los tratamientos, en el que los tratamientos sucesivos del alimento o bebida de leche fermentada con un ácido y bilis comprenden un tratamiento con el ácido a 37°C durante 30 minutos y luego con bilis a 37°C durante 30 minutos.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el alimento o bebida de leche fermentada contiene un jarabe.
3. Bacterias *Bifidobacterium* que son la cepa YIT 4125 de *Bifidobacterium breve* depositada como FERM BP-7813 o la cepa YIT 4126 de *Bifidobacterium breve* depositada como FERM BP-7814.
- 15 4. Un alimento o bebida de leche fermentada que contiene bacterias *Bifidobacterium* que comprende bacterias *Bifidobacterium* según la reivindicación 3.
5. El alimento o bebida de leche fermentada de la reivindicación 4 que comprende además un jarabe.