

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 501**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A23C 9/123** (2006.01)

**A23C 9/127** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2009 E 09796798 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012 EP 2366017**

54 Título: **Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* que disminuye el colesterol en sangre**

30 Prioridad:

**19.11.2008 FR 0806467**

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

**22.02.2013**

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)  
17, Boulevard Haussmann  
75009 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**MEUNIER, AGNÈS;  
LALANNE, FLORENT;  
NICOLLE, CATHERINE;  
KHLEBNIKOV, ARTEM y  
GAYE, CHRISTÈLE**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Luis Alfonso**

**ES 2 396 501 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

Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* que disminuye el colesterol en sangre.

- 5 La presente invención se refiere a una cepa nueva de *Lactobacillus delbrueckii* que presenta propiedades de disminución del colesterol en sangre.

Se ha dado a conocer que ciertos productos lácteos fermentados pueden ejercer efectos de disminución del colesterol en sangre. Estos efectos dependen, en particular, de la presencia, en estos productos, de cepas específicas de bacterias de ácido láctico que pertenecen a ciertas especies determinadas. En particular, son cepas de enterococos, tales como *Enterococcus faecium* (solicitud EP0101209) o *Enterococcus mundtii* (solicitud PCT WO 2007/108583), de bifidobacterias (solicitud PCT WO 2007/029773) (Xiao y otros, J Dairy Sci, 86, 2452-61, 2003), y de lactobacillus.

15 Entre los lactobacillus, se han identificado cepas que disminuyen el colesterol en sangre sólo en algunas especies, tales como *Lactobacillus casei* (Brashears y otros, J Dairy Sci, 81, 2103-10, 1998; Kapila y Sinha, Indian J Med Sci, 60, 361-70, 2006; Kawase y otros, J Dairy Sci, 83, 255-63, 2000), *Lactobacillus fermentum* (Gilliland y Walker, J Dairy Sci, 73, 905-11, 1990; Pereira y otros, Appl Environ Microbiol, 69, 4743-52, 2003), y, de manera especial, *Lactobacillus acidophilus* (Gilliland y otros, Appl Environ Microbiol, 49, 377-81, 1985; Lin y otros, J Dairy Sci, 72, 2885-99, 1989; Gilliland y Walker, J Dairy Sci, 73, 905-11, 1990; Gupta y otros, Int J Food Microbiol, 29, 105-9, 1996; Anderson y Gilliland, J Am Coll Nutr, 18, 43-50, 1999).

Por otro lado, otras especies de lactobacillus y, en particular, *Lactobacillus delbrueckii*, que es una de las especies utilizadas más ampliamente en la fabricación de productos lácteos fermentados, ya que constituye, en combinación con *Streptococcus thermophilus*, la "simbiosis del yogur" convencional, eran consideradas hasta ahora como carentes de los efectos de disminución del colesterol en sangre.

De este modo, se demostró que los yogures convencionales (obtenidos mediante fermentación con *Lactobacillus delbrueckii* + *Streptococcus thermophilus*) no presentaban los efectos de disminución del colesterol en sangre de los productos lácteos obtenidos mediante la fermentación con *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* (Akalin y otros, J Dairy Sci, 80, 2721-5, 1997), o con *Bifidobacterium longum* (Xiao y otros, J Dairy Sci, 86, 2452-61, 2003). También se dio a conocer que la administración de *Lactobacillus delbrueckii* a ratones axénicos inducía una disminución en la excreción fecal de colesterol, pero no inducía ningún cambio en el nivel de colesterol en sangre o hepático. Cuando se administraba *Lactobacillus delbrueckii* a ratones deficientes en la apolipoproteína E (ratones sin ApoE), no se observaba ningún efecto, ya fuera para el colesterol fecal, hepático o en sangre (Portugal y otros, Braz J Med Biol Res, 39, 629-35, 2006).

Los presentes inventores han aislado ahora una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* que, de manera sorprendente, presenta propiedades de disminución del colesterol en sangre. Esta cepa también presenta la capacidad de crecimiento en leche y la capacidad de propagación de las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* utilizadas habitualmente en la fabricación de yogures y, por tanto, se puede utilizar de manera conveniente en la fabricación de productos lácteos fermentados y, en particular, yogures.

Por consiguiente, la presente invención da a conocer la cepa de la subespecie *lactis* de *Lactobacillus delbrueckii* depositada el 6 de abril de 2007 bajo el nombre I-3741 con la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes ("Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos")) [French National Microorganism Culture Collection ("Colección Nacional Francesa de Cultivos de Microorganismos")], 25 rue du Docteur Roux, en Paris.

Las características de esta cepa son las siguientes:

- Morfología: Microorganismo gram positivo, bacilos granulares, más o menos largos, que son bastante pequeños.
- Fermentación de los siguientes azúcares (resultados obtenidos en una tira Api 50 CH - medio API MRS a 37°C durante 48 horas): D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, N-acetilglucosamina, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa.

La presente invención también da a conocer un fermento láctico que comprende la cepa de la subespecie *lactis* de *Lactobacillus delbrueckii* CNCM I-3741 combinada con una o más de otras cepas de bacterias del ácido láctico.

Dicha otra cepa o cepas pueden pertenecer, en particular, a las siguientes especies: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* subespecie *casei*, *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus*, *Lactobacillus zeae*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus cremoris*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus*

*delbrueckii subespecie bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subespecie lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subespecie delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis subespecie lactis*, *Lactococcus lactis subespecie cremoris*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium animalis especie lactis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*.

Según una realización preferente de un fermento láctico, según la presente invención, la cepa de la subespecie *lactis* de *Lactobacillus delbrueckii* CNCM I-3741 está combinada, como mínimo, con una cepa de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* y, como mínimo, una cepa de *Streptococcus thermophilus*.

La presente invención también da a conocer un método para preparar un producto fermentado, cuyo método se caracteriza por el hecho de que comprende la fermentación de un medio adecuado con la cepa CNCM I-3741, o con un fermento láctico, según la presente invención, que contiene dicha cepa. Según una realización preferente de este método, el medio utilizado para la fermentación es leche o un medio basado en leche, o un zumo de plantas (zumo de fruta y/o de verduras) o una mezcla de estos medios.

La presente invención también da a conocer productos fermentados, en particular productos lácteos fermentados, que contienen bacterias de la cepa CNCM I-3741 y, de manera opcional, bacterias de una o más de otras cepas de bacterias del ácido láctico.

Según una realización preferente de un producto fermentado, según la presente invención, éste contiene, después de la fermentación, como mínimo,  $1 \times 10^6$  CFU (unidades formadoras de colonias), de manera preferente, como mínimo,  $1 \times 10^7$  CFU, y de manera más preferente, entre  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^9$  CFU, por ml de bacterias de la cepa CNCM I-3741.

La presente invención también se refiere a la utilización de la cepa CNCM I-3741, o de fermentos lácticos o de productos fermentados que contienen dicha cepa, para obtener productos que inducen una disminución en el nivel de colesterol en sangre, en particular el nivel de colesterol LDL.

La presente invención se entenderá de manera más clara mediante la siguiente descripción adicional, la cual se refiere a ejemplos que ilustran las propiedades de disminución del colesterol en sangre de la cepa CNCM I-3741. Sin embargo, debe entenderse claramente que estos ejemplos se proporcionan únicamente a modo de ilustración del objeto de la presente invención, de la cual no constituyen de ningún modo una limitación.

#### **EJEMPLO 1: EFECTO DE DISMINUCIÓN DEL COLESTEROL EN SANGRE *IN VIVO* DE LA CEPAS CNCM I-3741**

Se evaluó el efecto del consumo de la cepa CNCM I-3741 (también referida en lo sucesivo como DN 111244) y, como control positivo, de la cepa I-2273 de *Lactobacillus acidophilus* dada a conocer en la patente EP1251860 (también referida en lo sucesivo como DN 112001), en ratones *in vivo* deficientes en apolipoproteína E (sin apoE). La cepa I-2273 es una cepa que presenta una actividad *in vitro* de disminución del colesterol en sangre, pero que no se puede utilizar fácilmente para obtener productos lácteos fermentados, ya que crece muy escasamente en leche.

El protocolo experimental es el siguiente:

Se dividieron cuarenta ratones sin ApoE de 9 a 10 semanas de vida en 4 grupos de 10 ratones. Estos ratones fueron proporcionados por los Laboratorios Charles River, L'Arbresle (Francia).

Todos los ratones recibieron durante 28 días una dieta rica en lípidos complementada, mediante sonda, con:

- 300  $\mu$ l/día de un cultivo que contenía  $6 \times 10^8$  CFU de la cepa DN 111244, obtenido bajo las condiciones de cultivo en leche-medio MRS (grupo 1);
- 300  $\mu$ l/día de un cultivo que contenía  $6 \times 10^8$  CFU de la cepa DN 112001, obtenido utilizando las mismas condiciones de cultivo en leche-medio MRS que las descritas para la cepa 111244 (grupo 2);
- 300  $\mu$ l/día de una leche de control, la composición de la cual es la siguiente: leche desnatada (control).

Las cepas DN 112001 y DN 111244 (CNCM I-3741) se cultivaron en medio MRS. Se volvieron a suspender posteriormente en leche para obtener una leche que contenía  $6 \times 10^8$  CFU de bacterias.

La captación diaria de los animales en los tres grupos fue idéntica. Los animales se pesaron al inicio del experimento y, a continuación, a intervalos de 5 días durante el transcurso del tratamiento. No se observó una diferencia significativa entre los diversos grupos.

El nivel de colesterol total en plasma y el nivel de colesterol LDL se midieron al inicio del experimento y después de 28 días de tratamiento.

5 **Ensayo de lípidos en plasma**

Los resultados se muestran en las figuras 1 y 2.

10 Estos resultados muestran que, después de 28 días de tratamiento, se observa una disminución en el colesterol total y en el colesterol LDL (el colesterol "malo") en los animales de los grupos 1 y 2 en comparación con el grupo de control.

**EJEMPLO 2: CRECIMIENTO DE LA CEPA CNCM I-3741 EN LECHE**

15 Las propiedades con respecto al crecimiento en leche de la cepa CNCM I-3741 se analizaron utilizando el siguiente protocolo:

20 Se inoculó un medio formado de leche desnatada reconstituida (120 g de leche desnatada en polvo en un litro de agua destilada, complementada con 2 g/l de extracto de levadura) con la cepa CNCM I-3741 o, mediante comparación, con la cepa CNCM I-1519 de la subespecie *bulgaricus* de *L. delbrueckii* (esta cepa, que se da a conocer en la solicitud EP 0858501, presenta propiedades convencionales en términos de fermentación).

25 La actividad fermentativa de las cepas, unida a su crecimiento, se mide mediante la manipulación continua del pH del medio de crecimiento.

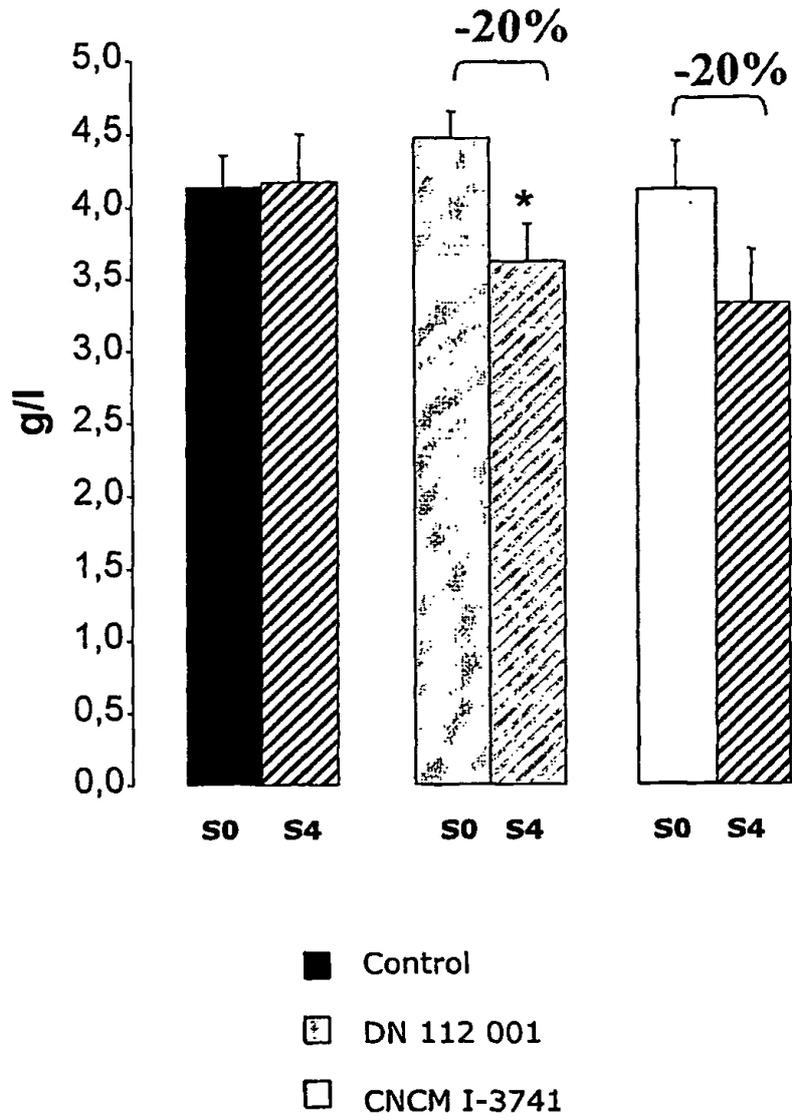
Los resultados se proporcionan en la figura 3.

30 Estos resultados muestran que la cepa CNCM I-3741 es capaz de crecer de manera eficaz en leche y, por tanto, se puede utilizar en la fabricación de productos lácteos fermentados.

**REIVINDICACIONES**

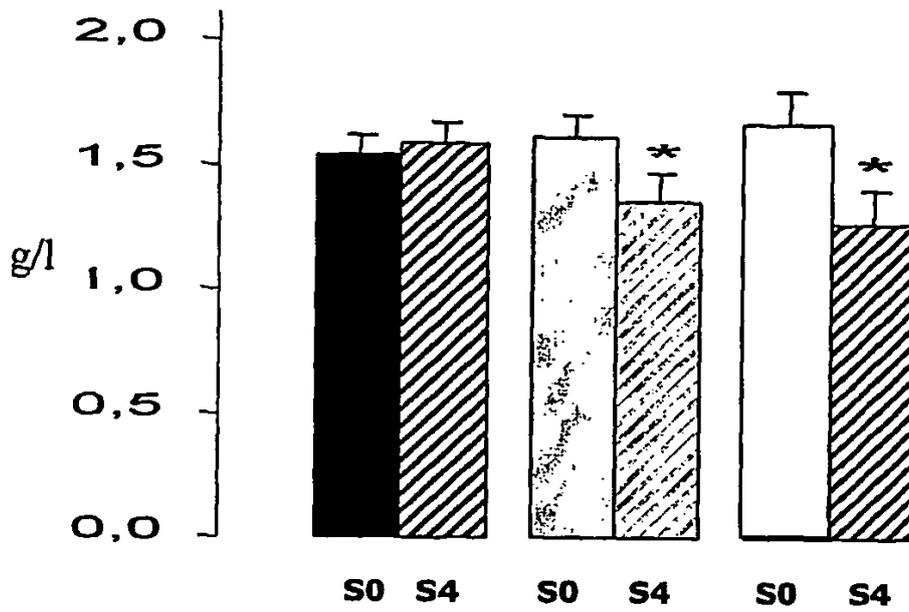
- 5 1. Cepa de la subespecie *lactis* de *Lactobacillus delbrueckii* depositada el 6 de abril de 2007 bajo el número I-3741 con la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (“Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos”)).
2. Fermento láctico que comprende la cepa de la subespecie *lactis* de *Lactobacillus delbrueckii*, según la reivindicación 1, combinado con una o más de otras cepas de bacterias del ácido láctico.
- 10 3. Fermento láctico, según la reivindicación 2, **caracterizado por el hecho de que** dicha otra cepa o cepas de bacterias del ácido láctico se eligen entre cepas que pertenecen a las siguientes especies: *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.
- 15 4. Producto fermentado que contiene bacterias de la cepa CNCM I-3741.
5. Utilización de la cepa CNCM I-3741 para obtener un producto que induce una disminución en el nivel de colesterol en sangre, en particular el nivel de colesterol LDL.

**Colesterol Total**



**Figura 1**

### Colesterol LDL



- Control
- DN 112 001
- CNCM I-3741

**Figura 2**

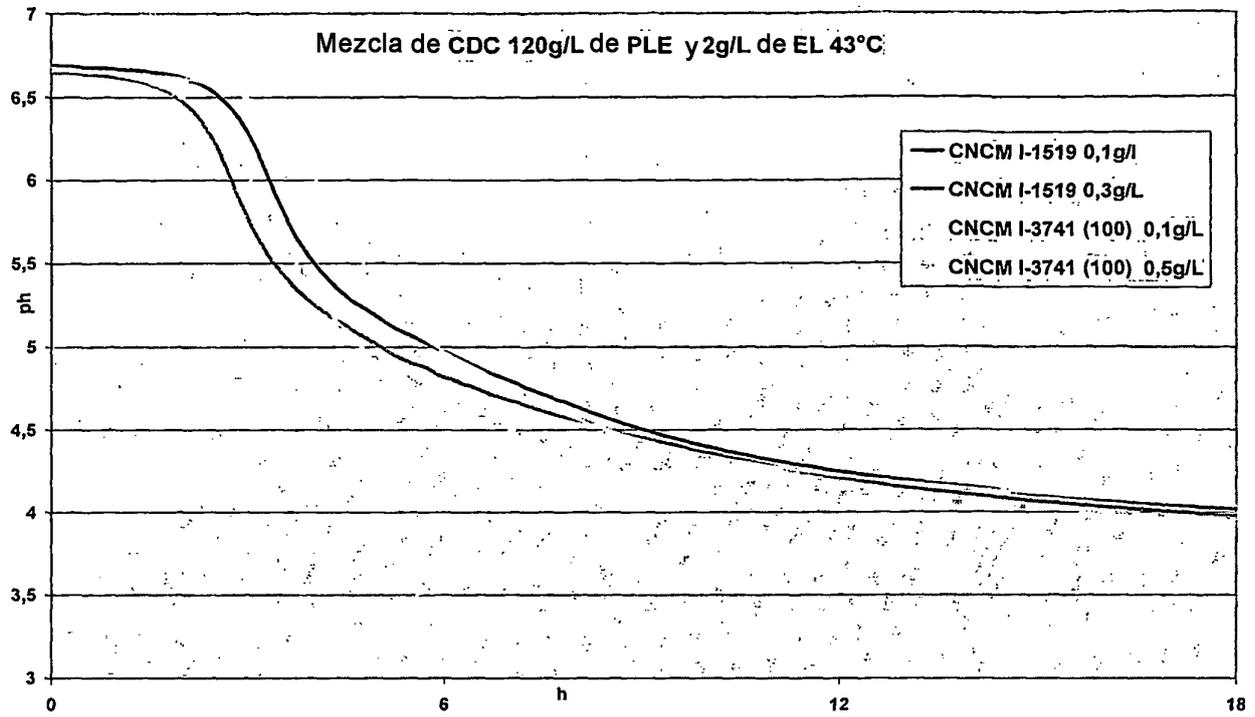


Figura 3