

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 580**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 1/14 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2007 E 07831129 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2112219**

54 Título: **Bacterias ácido lácticas novedosas**

30 Prioridad:

13.02.2007 JP 2007032645

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

16.10.2013

73 Titular/es:

**MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD. (100.0%)
33-1 SHIBA 5-CHOME
MINATO-KU TOKYO 108-8384, JP**

72 Inventor/es:

**SHIMIZU, KANETADA y
YAESHIMA, TOMOKO**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 425 580 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

Bacterias ácido lácticas novedosas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a bacterias ácido lácticas novedosas que pertenecen al género *Lactococcus*, a polvo de bacterias que contienen bacterias ácido lácticas, a una composición farmacéutica que contiene las bacterias ácido lácticas, a un agente de control de la función intestinal que contiene bacterias ácido lácticas y a un procedimiento para promover el crecimiento de *Bifidobacterium longum* y mejorar su supervivencia usando las bacterias ácido lácticas.

Se reivindica prioridad sobre la solicitud de patente japonesa 2007-032645, presentada el 13 de febrero de 2007, el contenido de la cual se incorpora a la presente por referencia.

15 **Técnica anterior**

Se sabe que las bacterias ácido lácticas tales como las bacterias del género *Lactococcus* o las bacterias del género *Bifidobacterium* (en adelante, abreviado como "bifidobacterias") tienen una actividad reguladora de la función intestinal, una actividad inmunoestimulante y una actividad anticancerosa. En consecuencia, las bacterias ácido lácticas tienden a formularse frecuentemente en alimentos de acuerdo con un aumento de la concienciación sobre salud por parte de los consumidores. En particular, las bifidobacterias tales como *Bifidobacterium longum* son una de las cepas bacterianas predominantes en la microflora intestinal formada en el conducto intestinal humano, y son crecientes las demandas de leche fermentada u otros productos alimentarios que contengan bifidobacterias viables.

Las bifidobacterias muestran una potencia de proliferación baja en medio acuoso. En consecuencia, se formulan generalmente diversas sustancias que estimulan el crecimiento en leche fermentada de modo que las bifidobacterias estén contenidas en la misma en un contenido constante, tal como 1×10^7 UFC/ml. No obstante, las sustancias estimulantes del crecimiento son generalmente caras y pueden deteriorar el sabor. Además, la conservación de bifidobacterias en condiciones ácidas es difícil y tiende a tener como consecuencia la muerte de las mismas. Por lo tanto, el conteo viable de bifidobacterias en productos de leche fermentada disminuye con una velocidad acelerada durante la distribución de los productos de leche fermentada.

En consecuencia, se espera que una promoción del crecimiento de bifidobacterias o una mejora de su supervivencia durante el almacenamiento permita no solo la preparación de leche fermentada que contenga una cantidad grande de bifidobacterias viables, sino también la preparación de leche fermentada que conserve una cantidad abundante de bifidobacterias viables desde inmediatamente después de la preparación hasta su consumo.

Se han divulgado diversos procedimientos para promover el crecimiento de bifidobacterias o mejorar su supervivencia durante el almacenamiento por fermentación con bifidobacterias y otra bacteria ácido láctica sin añadir ninguna sustancia estimulante del crecimiento o similares. Por ejemplo, (1) se ha divulgado yogur que contiene *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* y bifidobacterias, y un procedimiento de preparación del yogur (véase, por ejemplo, el documento de patente 1), como un procedimiento para promover el crecimiento de bifidobacterias para preparar leche fermentada.

Por ejemplo, (2) se ha divulgado un procedimiento para fermentar leche con bifidobacterias que incluye cultivar *Bifidobacterium breve* junto con *Lactococcus lactis subsp. lactis*, que no forme ni diacetilo ni acetoina, en un medio que contiene leche como su componente principal (véase, por ejemplo, el documento de patente 2), como un procedimiento para mejorar la supervivencia de bifidobacterias durante el almacenamiento de leche fermentada.

Documento de patente 1: Publicación de patente japonesa Nº 3.364.491.

Documento de patente 2: Publicación de patente japonesa Nº 3.068.484.

55 **Descripción de la invención**

[Problema que debe solucionarse mediante la invención]

Aunque se promueva el crecimiento de bifidobacterias y el tiempo de fermentación se reduzca según el procedimiento (1) mencionado anteriormente, no existe ninguna divulgación con respecto a la supervivencia de bifidobacterias durante el almacenamiento en el documento de patente 1. Por el contrario, aunque se reconozcan tanto efectos estimulantes del crecimiento como efectos que mejoran la supervivencia usando una mezcla compuesta por una bifidobacteria específica y una bacteria ácido láctica específica según el procedimiento (2) mencionado anteriormente, no existe ninguna divulgación con respecto a una bifidobacteria diferente a *Bifidobacterium breve*, tal como *Bifidobacterium longum*, que se formule generalmente en alimentos.

La presente invención tiene por objeto proporcionar cepas de bacterias ácido lácticas que estimulen el crecimiento de bifidobacterias, preferentemente de *Bifidobacterium longum*, y mejoren su supervivencia durante el almacenamiento.

5 La presente invención también tiene por objeto proporcionar polvo de bacterias que contengan las bacterias ácido lácticas, una composición farmacéutica que contenga las bacterias ácido lácticas, un agente de control de la función intestinal que contenga las bacterias ácido lácticas y un procedimiento para promover el crecimiento de *Bifidobacterium longum* y mejorar su supervivencia usando las bacterias ácido lácticas.

10 [Medios para resolver los problemas]

Los inventores de la presente invención han investigado intensamente con el fin de resolver los problemas mencionados anteriormente y han realizado un ensayo de fermentación mediante cultivo conjunto con *Bifidobacterium longum* para encontrar cepas de bacterias ácido lácticas que muestren una fermentabilidad excelente en medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p). Como resultado, los inventores han hallado cepas de bacterias ácido lácticas tal como se definen en la reivindicación 1 que pueden promover el crecimiento de *Bifidobacterium longum* a un conteo viable de 5×10^8 UFC/g cuando el pH es de 4,4 a 4,6, y mejorar la tasa de supervivencia de *Bifidobacterium longum* al 30 % o más después de finalizar la fermentación, un enfriamiento rápido y un almacenamiento de dos semanas a 10 °C. De este modo, los inventores completaron la presente invención.

20 Es decir, la presente invención proporciona cinco cepas bacterianas del género *Lactococcus* que tienen las propiedades bacteriológicas siguientes:

25 (1) fermentabilidad que cuaja un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) cuando se cultivan a una temperatura de 25 °C a 37 °C durante 16 horas;

30 (2) propiedades que promueven el crecimiento de *Bifidobacterium longum* que conducen a un conteo viable de *Bifidobacterium longum* de 5×10^8 UFC/g o superior, cuando se cultivan conjuntamente con *Bifidobacterium longum* en el medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) hasta un pH del mismo de 4,4 a 4,6; y

35 (3) propiedades que mejoran la supervivencia de *Bifidobacterium longum* durante el almacenamiento que conducen a una tasa de supervivencia de *Bifidobacterium longum* del 30 % o superior, después de cultivo conjunto con *Bifidobacterium longum* en el medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) hasta un pH del mismo de 4,4 a 4,6, enfriamiento rápido y almacenamiento de dos semanas a 10 °C

La presente invención también proporciona cinco cepas bacterianas del género *Lactococcus* caracterizadas porque las bacterias no tienen la capacidad de fermentar xilosa y no producen ni diacetilo ni acetoína.

40 La presente invención también proporciona cinco cepas bacterianas del género *Lactococcus* en las que las bacterias son *Lactococcus lactis subsp. lactis*.

La presente invención también proporciona cinco cepas bacterianas del género *Lactococcus* en las que al menos una cepa bacteriana de *Bifidobacterium longum* se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 y la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707.

45 La presente invención también proporciona cinco cepas bacterianas del género *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852 (FERN BP-10742).

50 La presente invención también proporciona cinco cepas bacterianas del género *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857 (FERN BP-10757).

La presente invención también proporciona cinco cepas bacterianas del género *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC859 (FERN BP-10744).

55 La presente invención también proporciona cinco cepas bacterianas del género *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC865 (FERN BP-10745).

La presente invención también proporciona cinco cepas bacterianas del género *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC866 (FERN BP-10746).

60 La presente invención también proporciona polvo de bacterias que contiene cualquiera de las bacterias del género *Lactococcus* mencionadas anteriormente.

65 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene cualquiera de las bacterias del género *Lactococcus* mencionadas anteriormente.

La presente invención también proporciona cualquiera de las bacterias del género *Lactococcus* mencionadas anteriormente.

5 La presente invención también proporciona un procedimiento para promover el crecimiento de *Bifidobacterium longum* y mejorar su supervivencia que incluye el uso de cualquiera de las bacterias del género *Lactococcus* mencionadas anteriormente.

[Efectos de la invención]

10 Las bacterias del género *Lactococcus* según la presente invención y el procedimiento para promover el crecimiento de *Bifidobacterium longum* y mejorar su supervivencia según la presente invención mejoran significativamente el crecimiento de *Bifidobacterium longum* y su supervivencia durante el almacenamiento y, por lo tanto, se producen de forma más eficaz que anteriormente productos fermentados que contienen una cantidad elevada de *Bifidobacterium longum*. Además, el conteo viable de *Bifidobacterium longum* en productos de leche fermentada se mantiene en niveles suficientes incluso durante su distribución. Los productos de leche fermentada proporcionados de este modo muestran efectos reguladores de la función intestinal elevados y son útiles para el control de la salud.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

20 Las bacterias del género *Lactococcus*, particularmente *Lactococcus lactis subsp. lactis*, según la presente invención tienen las propiedades (1), (2) y (3).

25 La propiedad (1) se refiere a la fermentabilidad. Si las bacterias ácido lácticas pueden proliferar rápidamente y tienen una fermentabilidad fuerte suficiente para cuajar un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) cuando se cultivan en el mismo a una temperatura de entre 25 °C y 37 °C durante 16 horas, las bacterias ácido lácticas pueden promover eficazmente el crecimiento de *Bifidobacterium longum* cuando se prepara la leche fermentada. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cuaja un medio de cultivo" se refiere a un fenómeno en el que el pH del medio de cultivo disminuye por debajo del punto isoelectrónico de una proteína láctea presente en el mismo mediante fermentación ácida y, por lo tanto, la proteína láctea se aglomera y el medio de cultivo se cuaja. El "medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p)" puede prepararse, por ejemplo, disolviendo el 10 % en masa de polvos de leche desnatada (fabricados por MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD., por ejemplo) en agua.

30 Aunque el intervalo de temperatura adecuado para la fermentación con bacterias del género *Lactococcus* se encuentra generalmente entre 20 °C y 30 °C, las bacterias del género *Lactococcus* según la presente invención muestran una fermentabilidad fuerte a una temperatura de entre 25 °C y 37 °C. En otras palabras, las bacterias del género *Lactococcus* según la presente invención muestran una fermentabilidad suficiente dentro de un intervalo de temperatura adecuado para la fermentación con *Bifidobacterium longum* (de 30 °C a 40 °C)

40 La propiedad (2) se refiere a propiedades promotoras del crecimiento de *Bifidobacterium longum*. Un medio lácteo tal como un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) presenta un sabor, una sensación en la boca y una apariencia externa excelentes; cuando el pH del mismo es aproximadamente 4,6, la caseína y otros componentes contenidos en el mismo están generalmente precipitados y el medio de cultivo está totalmente cuajado. En consecuencia, la fermentación se detiene generalmente mediante enfriamiento rápido o similar cuando el pH alcanza aproximadamente 4,6 para preparar productos de leche fermentada. Por lo tanto, las bacterias ácido lácticas que tienen las propiedades promotoras del crecimiento que pueden conducir al conteo viable de *Bifidobacterium longum*, que es un conteo alto de 5×10^8 UFC/g o superior, cuando se cultivan conjuntamente con *Bifidobacterium longum* en el medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) hasta que el pH del mismo es de 4,4 a 4,6, pueden aumentar eficazmente el conteo viable de *Bifidobacterium longum* en leche fermentada en el momento de preparación de la leche fermentada.

50 La propiedad (3) se refiere a propiedades que mejoran la supervivencia de *Bifidobacterium longum* durante el almacenamiento. El periodo de conservación con calidad de productos de leche fermentada es generalmente de aproximadamente dos semanas cuando se almacena a 10 °C o más. En consecuencia, puede producirse leche fermentada que mantenga un conteo viable suficiente de *Bifidobacterium longum* incluso en el punto final del periodo de conservación con calidad de la misma, siempre que las bacterias ácido lácticas tengan propiedades que mejoren la supervivencia durante el almacenamiento que puedan conducir a una tasa de supervivencia de *Bifidobacterium longum* que sea del 30 % o superior, después de cultivo conjunto con *Bifidobacterium longum* en el medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) hasta que el pH del mismo sea de 4,4 a 4,6, enfriamiento rápido y dos semanas de almacenamiento a 10 °C

60 Las bacterias del género *Lactococcus* según la presente invención pueden prepararse, por ejemplo, según el procedimiento siguiente. En primer lugar, las cepas bacterianas se aíslan a partir de varias muestras, y las cepas que muestran una fermentabilidad excelente en el medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p), más específicamente una fermentabilidad suficiente para cuajar el medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) cuando se cultivan en el mismo a una temperatura de 25 a 37 °C durante 16 horas, se seleccionan a partir de las cepas bacterianas aisladas. Después, las cepas bacterianas seleccionadas se cultivan conjuntamente con

Bifidobacterium longum y se seleccionan las cepas bacterianas que tienen propiedades promotoras del crecimiento de *Bifidobacterium longum* y propiedades que mejoran su supervivencia durante el almacenamiento definidas como las propiedades (2) y (3) mencionadas anteriormente. Es preferente que se seleccionen adicionalmente las cepas bacterianas que no tengan la capacidad de fermentar xilosa y que no produzcan ni diacetilo ni acetoina.

5

A continuación, la presente invención se explicará con más detalle.

1. Aislamiento de cepas bacterianas

10 Con el fin de aislar cepas bacterianas que tengan las propiedades mencionadas anteriormente de la naturaleza, los presentes inventores recogieron muestras de la naturaleza en Japón, diluyeron las muestras con un tampón de dilución anaeróbico ("The World of Enterobacteria" publicado por Soubunsha Co., Ltd., escrito por Tomotari Mitsuoka, página 322, 1980; en adelante abreviado como "referencia 1"), inocularon las muestras diluidas en cada placa de caldo de hígado de Briggs (véase la referencia 1 mencionada anteriormente, página 319) y después se cultivaron las muestras inoculadas a 30 °C en condiciones anaerobias. Entre las colonias obtenidas de este modo, se recogieron las cepas bacterianas que mostraron características morfológicas de bacterias estreptocócicas y se reconocieron como bacterias Gram positivas mediante observación con microscopio de especímenes aplicados. Cada una de las cepas recogidas se inoculó en bandas en cada placa plana de agar BL y después se cultivó repetidamente en condiciones anaerobias del mismo modo que se ha descrito anteriormente para obtener cepas bacterianas aisladas con pureza. Las cepas bacterianas aisladas se sometieron a un ensayo de fermentación en el medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) descrito anteriormente para obtener 20 cepas bacterianas con fermentabilidad definida como la propiedad (1) mencionada anteriormente. Después, las cepas bacterianas obtenidas se cultivaron conjuntamente con *Bifidobacterium longum* para obtener 5 cepas bacterianas que tenían tanto las propiedades promotoras del crecimiento que aumentan el conteo viable de *Bifidobacterium longum* a un pH de 4,4 a 4,6 a 5×10^8 UFC/g o más como las propiedades que mejoran la supervivencia durante el almacenamiento que aumentan la tasa de supervivencia de *Bifidobacterium longum* al 30 % o más cuando se almacenan a 10 °C durante dos semanas después de un enfriamiento rápido a un pH de 4,4 a 4,6. Las 5 cepas bacterianas se denominan "MCC852", "MCC857", "MCC859", "MCC865" y "MCC866", respectivamente.

2. Propiedades bacteriológicas

A continuación se mostrarán las propiedades bacteriológicas de las 5 cepas bacterianas. Los ensayos para determinar las propiedades bacteriológicas se realizaron con referencia al manual Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, editado por Peter H. A. Sneath, Vol. 2, publicado por Williams and Wilkins Company, 1986)

35

(I) Morfología bacteriana (observada mediante un microscopio óptico después de cultivo anaerobio en una placa plana de agar BL a 30 °C durante 72 horas)

Tamaño: 1 a 2 μm (diámetro)

40

Morfología: Bacteria estreptocócica

(II) Tinción Gram: Positiva

45

(III) Leche Litmus: Cuajada

(IV) Formación de endoesporas: Negativa

(V) Producción de gas a partir de glucosa: Negativa

50

(VI) Motilidad: Negativa

(VII) Actividad de catálisis: Negativa

55

(VIII) Ensayo de arginina descarboxilasa: Positivo

(IX) Producción de gas a partir de ácido cítrico: Negativa

60

(X) Susceptibilidad a la temperatura (a 60 °C durante 30 minutos y a 65 °C durante 30 minutos): Positiva en ambos casos

(XI) Producto de degradación de la glucosa: Ácido L-láctico

65

Tabla 1

ES 2 425 580 T3

	Cepa bacteriana	MCC	MCC	MCC	MCC	MCC	ATCC	
		852	857	859	865	866	19435	
XII	Temperatura de crecimiento	10 °C	+s	+s	+	+s	+s	+s
		40 °C	+	+	+	+	+	+
		45 °C	-	-	-	-	-	-
XIII	Resistencia a la sal	2 %	+	+	+	+	+	+
		3 %	+	+	+	+	+	+
		4 %	+	+	+	+	+	+
		6,5 %	(+)s	-	-	(+)s	(+)s	-
XIV	Resistencia al pH	9,2	+	+	+	+	+	+
		9,6	+s	+	+	+	-	-
XV	Resistencia a azul de metileno	0,01 %	+	+	+	+	+	+
		0,1 %	+	+	+	+	+	+
		0,3 %	±	+s	+	+s	+	-
XVI	Producibilidad de amoniaco a partir de arginina	+	+	+	+	±	+	
XVII	Fermentación de azúcar	Arabinosa	-	-	-	-	-	-
		Xilosa	-	-	-	-	-	+
		Ramnosa	-	-	-	-	-	-
		Ribosa	+	+	+s	+	+	+
		Glucosa	+	+	+	+	+	+
		Manosa	+	+	+	+	+	+
		Fructosa	+	+	+	+	+	+
		Galactosa	+	+	+	+	+	+
		Sacarosa	-	-	-	-	-	-
		Maltosa	+	+	+	+	+	+
		Celobiosa	+	+	+	+	+	+
		Lactosa	+	+	+	+	+	+
		Trehalosa	+	+	+	+	+	+
		Melibiosa	-	-	-	-	-	-
		Rafinosa	-	-	-	-	-	-
		Melecitosa	-	-	-	-	-	-
		Dextrina	+	+	+	+	+	+
		Almidón	+s	+	-	+	+	±s
		Glicógeno	-	-	-	-	-	-
		Inulina	-	-	-	-	-	-
		Manitol						
		Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-		
Esculina	(+)s	+	+	-	-	-		
Salicina	+	+	+s	+	+	+		
Amigdalina	-	±	-	(+)s	(+)s	-		

		Glucósido de metilo	-	-	-	-	-	-
		Gluconato de sodio	-	±	±	-	-	-
+: positivo. (+): ligeramente positivo. ±: extremadamente ligeramente positivo. -: negativo. s: reacción lenta								

Las propiedades bacteriológicas (I) a (XI) mencionadas anteriormente son comunes a las 5 cepas bacterianas y a la cepa de tipo *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435. La temperatura de crecimiento (XII), la resistencia a la sal (XIII), la resistencia al pH (XIV), la resistencia al azul de metileno (XV), la producibilidad de amoníaco a partir de arginina (XVI) y la fermentabilidad de azúcar (XVII) de cada cepa se muestran en la tabla 1. La fermentación de azúcar se examinó con respecto a 28 clases de azúcar usando un medio para la fermentación de azúcar divulgado por Mitsuoka (Tomotari Mitsuoka, The bacteriology of lactic acid bacteria”, Clinical Examination 18, páginas 1163 a 1172, 1974).

Es evidente a partir de los resultados mencionados anteriormente que la totalidad de las 5 cepas bacterianas tiene propiedades bacteriológicas comunes con las cepas bacterianas de *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Por lo tanto, se ha reconocido que las 5 cepas bacterianas son cepas bacterianas de *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Por otra parte, es evidente a partir de las propiedades bacteriológicas (XII) a (XVII) mencionadas anteriormente que las 5 cepas bacterianas son diferentes de la cepa de tipo *Lactococcus lactis subsp. lactis* en que las 5 cepas bacterianas no tienen ninguna capacidad para fermentar la xilosa.

Las 5 cepas bacterianas fueron depositadas por el solicitante en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, (Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, JAPÓN (código postal: 305-8566)) com cepas bacterianas novedosas. El número de acceso de la *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852 es FERM BP-10742, el de la *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857 es FERM BP-10757, el de la *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC859 es FERM BP-10744, el de la *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC865 es FERM BP-10745 y el de la *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC866 es FERM BP-10746. Las *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852, 859, 865 y 866 se depositaron el 1 de diciembre de 2006 y la *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857 se depositó el 10 de enero de 2007.

3. Ensayo con respecto a la fermentabilidad en medio de lecho desnatada reconstituida al 10 % (p/p).

Un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) preparado disolviendo polvos de leche desnatada (fabricados por MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.) en agua se esterilizó a 95 °C durante 30 minutos. Se inoculó cada uno de los iniciadores de cepas bacterianas al 3 % (v/v) en el medio de leche desnatada reconstituida y después se cultivó a 25, 30 o 37 °C durante 16 horas. Después, el medio de cultivo obtenido se enfrió rápidamente, se observó el estado cuajado y se midieron el pH y el conteo viable de las bacterias ácido lácticas contenidas. El conteo viable se midió usando placas planas de agar de conteo de placa BCP disponibles comercialmente (fabricadas por Eiken Chemical Co., LTD.). Los resultados de la medición se muestran en la tabla 2.

Se usó como cepa de control la cepa de tipo *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435 divulgada en el documento de patente 2.

Tabla 2

	Condiciones de cultivo								
	a 25 °C durante 16 horas			a 30 °C durante 16 horas			a 37 °C durante 16 horas		
	Conteo viable (UFC/g)	pH		Conteo viable (UFC/g)	pH		Conteo viable (UFC/g)	pH	
MCC852	2,0 x 10 ⁸	4,53	cuajado	1,5 x 10 ⁹	4,44	cuajado	8,0 x 10 ⁸	4,63	cuajado
MCC857	1,7 x 10 ⁹	4,53	cuajado	1,5 x 10 ⁹	4,41	cuajado	1,1 x 10 ⁹	4,5	cuajado
MCC859	1,4 x 10 ⁹	4,54	cuajado	8,5 x 10 ⁸	4,44	cuajado	8,1 x 10 ⁸	4,59	cuajado
MCC865	2,0 x 10 ⁹	4,52	cuajado	1,5 x 10 ⁹	4,42	cuajado	8,8 x 10 ⁸	4,63	cuajado
MCC866	2,0 x 10 ⁹	4,52	cuajado	1,3 x 10 ⁹	4,4	cuajado	8,5 x 10 ⁸	4,61	cuajado
ATCC 19435	5,2 x 10 ⁸	5,93	no cuajado	4,4 x 10 ⁸	5,65	no cuajado	3,2 x 10 ⁸	5,51	no cuajado

Cuando se usó cada una de las cepas bacterianas de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852, 857, 859, 865 y 866,

es decir, las bacterias del género *Lactococcus* según la presente invención, el pH del medio de cultivo se redujo a 4,4 a 4,6 en todas las condiciones de temperatura, y el medio de cultivo cuajó. Además, el conteo viable de las bacterias ácido lácticas contenidas fue aproximadamente de 1×10^9 UFC/g y, por lo tanto, se reconocieron condiciones de proliferación y fermentabilidad favorables.

5 Por otra parte, cuando se usó la cepa de tipo *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435, el pH del medio de cultivo fue de 5,5 o superior y el medio de cultivo no cuajó en ninguna de las condiciones de temperatura. Además, el conteo viable de las bacterias ácido lácticas fue significativamente menor a 30 °C o más, particularmente, que el de las bacterias del género *Lactococcus* según la presente invención.

10 4. Ensayo de cultivo conjunto con *Bifidobacterium longum*

(1) Ensayo de cultivo conjunto con *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787.

15 Se usó como cepa de control la cepa de tipo *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435.

En primer lugar, cada cultivo de las 5 cepas bacterianas (*Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852, 857, 859, 865 y 866) y de *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 se preparó según un procedimiento descrito en el ejemplo 1.

20 La *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 fue aceptada por el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, (Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, JAPÓN (código postal: 305-8566)) el 31 de octubre de 2001.

25 Además, se esterilizaron 1.000 ml de un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) que contenía el 0,2 % (p/p) de extracto de levadura (fabricado por Difco) a 90 °C durante 30 minutos. Después, se inocularon 30 ml de un cultivo de la cepa de tipo *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435 en el medio de leche desnatada reconstituida y se cultivaron a 30 °C durante 16 horas para preparar un cultivo de la cepa de tipo *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435.

30 En el 1 % (v/v) de cada cultivo de las cepas de *Lactococcus lactis subsp. lactis* preparado como anteriormente se inoculó el 1 % (v/v) del cultivo de *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 en un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) esterizado a 90 °C durante 10 minutos, y la mezcla se cultivó a 37 °C durante 16 horas para obtener la leche fermentada. La leche fermentada se enfrió rápidamente y se midieron el pH del mismo y el conteo viable de *Bifidobacterium longum* contenida. Después, el producto resultante se almacenó posteriormente a 10 °C durante dos semanas, y el conteo viable de *Bifidobacterium longum* se midió una semana y dos semanas después de la iniciación del almacenamiento. El conteo viable de *Bifidobacterium longum* se midió usando placas planas de agar-propionato-TOS (fabricado por YAKULT PHARMACEUTICAL INDUSTRY CO., LTD.). Los resultados de la medición se muestran en la tabla 3.

40 Tabla 3

Cepa bacteriana	Conteo viable de bifidobacterias (UFC/g)			pH
	Inmediatamente después de finalizar la fermentación	Después de una semana de almacenamiento	Después de dos semanas de almacenamiento	Inmediatamente después de finalizar la fermentación
MCC852	$5,7 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	4,52
MCC857	$8,0 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$	4,47
MCC859	$6,8 \times 10^8$	$6,9 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	4,55
MCC865	$8,3 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$	$7,3 \times 10^8$	4,56
MCC866	$6,4 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$	4,42
ATCC 19435	$1,2 \times 10^8$	El pH fue de 5 o superior y el ensayo de almacenamiento no pudo realizarse		

45 Cada leche fermentada preparada usando *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852, 857, 859, 865 o 866 tenía un pH de aproximadamente 4,5 y un conteo viable de *Bifidobacterium longum* de 5×10^8 UFC/g o más después de la fermentación. Cuando cada leche fermentada se almacenó a 10 °C durante dos semanas, la tasa de supervivencia de *Bifidobacterium longum* fue del 80 % o superior.

50 Por otra parte, la fermentación de la leche no tuvo lugar con la cepa de tipo *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435, y el pH de la leche fermentada fue de 5,0 o superior y el almacenamiento de la misma a 10 °C fue imposible.

Además, el conteo de *Bifidobacterium longum* viable inmediatamente después de terminar la fermentación fue aproximadamente de 1×10^8 UFC/g, lo que era significativamente pequeño en comparación con el caso en el se usó la bacteria del género *Lactococcus* según la presente invención.

5 Por lo tanto, es evidente que las 5 cepas bacterianas (*Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852, 857, 859, 865 y 866) promueven de forma excelente el crecimiento de *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 y mejoran su tasa de supervivencia durante el almacenamiento en comparación con otras cepas bacterianas conocidas pertenecientes a *Lactococcus lactis subsp. lactis*.

10 También es evidente que el caso en el que *Bifidobacterium longum* se cultiva conjuntamente con *Lactococcus lactis subsp. lactis* que no forma ni diacetilo ni acetoina tal como se describe en el documento de patente 2 es diferente del caso en el que se usa *Bifidobacterium breve*, y no se muestran ni dichos efectos promotores de la proliferación de *Bifidobacterium longum* ni efectos que mejoran la supervivencia como los divulgados en el documento de patente 2.

15 (2) Ensayo de cultivo conjunto con la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707.

Las propiedades promotoras del crecimiento de *Bifidobacterium longum* de las bacterias del género *Lactococcus* según la presente invención y las propiedades que mejoran la supervivencia de *Bifidobacterium longum* de las mismas durante el almacenamiento se evaluaron usando *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 y la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707.

En primer lugar, se prepararon un cultivo de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCCB57 y un cultivo de *Bifidobacterium longum* FERM EP-7787 según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 siguiente.

25 Además, se preparó un cultivo mixto de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* según el procedimiento descrito en el ejemplo 21 siguiente.

Además, se esterilizó un medio de leche desnatada al 11 % (p/p) que contenía el 0,2 % (p/p) de extracto de levadura a 90 °C durante 30 minutos. Después, se inoculó el 10 % (v/v) de la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 como iniciador en el medio de leche desnatada y se cultivó a 37 °C hasta que el pH alcanzó 4,6 para preparar un cultivo de la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707.

Se preparó el 1 % (v/v) del cultivo de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857 tal como se ha descrito anteriormente, bien el 1 % (v/v) del cultivo de *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 o bien el 1 % (v/v) del cultivo de la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, y se inoculó el 0,01 % (v/v) del cultivo mixto de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) esterilizado a 90 °C durante 10 minutos, y se cultivó a 37 °C hasta que el pH alcanzó 4,6 para obtener leche fermentada. Después, la leche fermentada obtenida se enfrió rápidamente, el conteo viable de *Bifidobacterium longum* se midió. Además, la leche fermentada se almacenó a 10 °C durante dos semanas y el conteo viable de *Bifidobacterium longum* se midió una semana o dos semanas después del inicio del almacenamiento.

Por otra parte, se preparó bien el 1,5 % (v/v) del cultivo de *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 tal como se ha descrito anteriormente o bien el 1,5 % (v/v) del cultivo de la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, y se inoculó el 0,4 % (v/v) del cultivo mixto de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) esterilizado a 90 °C durante 10 minutos, y se cultivó a 37 °C hasta que el pH alcanzó 4,6 para obtener leche fermentada como control. El conteo de *Bifidobacterium longum* viable en la leche fermentada se midió del mismo modo. Los resultados de la medición se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

50

MCC857	<i>Bifidobacterium longum</i>	Conteo viable de bifidobacterias (UFC/g)		
		Inmediatamente después de finalizar la fermentación	Después de una semana de almacenamiento	Después de dos semanas de almacenamiento
Presencia	FERM BP-7787	$1,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^8$	$7,1 \times 10^8$
Presencia	ATCC 15707	$6,5 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
Ausencia	FERM BP-7787	$2,0 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$4,0 \times 10^7$
Ausencia	ATCC 15707	$3,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$	No detectable

Los conteos viables tanto de *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 como de la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 en leche fermentada se aumentaron significativamente mediante el cultivo conjunto con *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857. Además, la tasa de supervivencia de cada *Bifidobacterium longum*

55

almacenada a 10 °C durante dos semanas fue del 30 % o superior: la de *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 fue del 71 % y la de la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 fue del 31 %.

5 Por el contrario, la tasa de supervivencia de *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 almacenada a 10 °C durante dos semanas en ausencia de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857 fue del 20 % y se detectó la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 almacenada a 10 °C durante dos semanas después de cultivarla en ausencia de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857.

10 Se obtuvo el mismo resultado cuando se usó cada una de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852, 859, 865 y 866 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857.

15 Por lo tanto, es evidente que cada una de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852, 857, 859, 865 y 866 tiene tanto propiedades excelentes para promover el crecimiento de cepas de *Bifidobacterium longum* diferentes a las de *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787, que tiene una supervivencia excelente durante el almacenamiento y propiedades para mejorar la supervivencia de cepas *Bifidobacterium longum* diferentes a *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 durante el almacenamiento.

20 5. Ensayo comparativo con la mezcla de *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* divulgada en el documento de patente 1.

El cultivo de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857, el cultivo de la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 y el cultivo mixto de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* se prepararon según el procedimiento descrito en 4(2) anterior.

25 Se preparó el 1 % (v/v) del cultivo de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857, el 1 % (v/v) del cultivo de la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, y se inoculó el 0,01 % (v/v) del cultivo mixto de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, preparado del modo anterior, en un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) esterilizado a 90 °C durante 10 minutos, y se cultivó a 37 °C hasta que el pH alcanzó 4,6 para preparar leche fermentada. La leche fermentada se enfrió rápidamente y se midió el conteo viable de *Bifidobacterium longum* contenida.

35 En cambio, se inocularon el 1 % (v/v) del cultivo de la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 preparada del modo anterior y el 2 % (v/v) de la mezcla "EZAL MA14" compuesta por *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (fabricada por Rhodia) en un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) esterilizado a 90 °C durante 10 minutos, como control. La mezcla se cultivó a 36 °C hasta que alcanzó un pH de 4,6 para preparar leche fermentada. El conteo viable de *Bifidobacterium longum* en la leche fermentada se midió. La mezcla "EZAL MA14" corresponde a un producto "EZAL MR014" (fabricado por Rhodia) descrito en el documento de patente 1.

40 El conteo de *Bifidobacterium longum* en leche fermentada preparada usando *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857 fue de $5,5 \times 10^8$ UFC/g. En cambio, no se detectó *Bifidobacterium longum* viable en una solución diluida obtenida diluyendo de leche fermentada preparada usando la mezcla "EZAL MA14" 10^6 veces y, por lo tanto, el conteo viable de *Bifidobacterium longum* presente en la leche fermentada se reveló que era 1×10^0 UFC/g o inferior.

45 En otras palabras, se reveló que no se lograron ni efectos promotores del crecimiento de *Bifidobacterium longum* ni efectos de reducción del tiempo de fermentación, tal como se menciona en el documento de patente 1, cuando se cultivaron conjuntamente *Bifidobacterium longum* con *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

50 Tal como se ha descrito anteriormente, las bacterias del género *Lactococcus* según la presente invención muestran una fuerte fermentabilidad en el medio de leche desnatada reconstituido al 10 % (p/p) a una temperatura adecuada para la fermentación con bifidobacterias. Además, cuando las bacterias del género *Lactococcus* se cultivan conjuntamente con *Bifidobacterium longum*, las bacterias del género *Lactococcus* muestran efectos promotores del crecimiento de *Bifidobacterium longum* excelentes y efectos de mejora de su supervivencia durante el almacenamiento excelentes, y tienen propiedades que no se consiguen con cepas bacterianas conocidas convencionalmente pertenecientes al género *Lactococcus*. Además, las bacterias del género *Lactococcus* pueden producir eficazmente productos fermentados tales como leche fermentada debido a la fermentabilidad extremadamente fuerte de las mismas. Además, se espera que puedan producirse productos fermentados con sabor favorable mediante las bacterias del género *Lactococcus*, debido a que las bacterias del género *Lactococcus* no producen ni diacetilo ni acetoina.

65 En particular, las 5 cepas bacterianas (*Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852, 857, 859, 865 y 866) pueden formularse con seguridad en diversos alimentos y bebidas tales como productos alimenticios fermentados, debido a que las 5 cepas bacterianas se seleccionaron a partir de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de la naturaleza en términos de fermentabilidad y posesión de propiedades promotoras del crecimiento de *Bifidobacterium longum* y propiedades de mejora de la supervivencia de *Bifidobacterium longum* durante el almacenamiento favorables.

Las bacterias del género *Lactococcus* según la presente invención pueden usarse en forma de polvo de bacterias del mismo modo que las bacterias ácido lácticas. Los polvos de bacterias pueden formularse en alimentos o piensos.

- 5 Las bacterias del género *Lactococcus* según la presente invención también pueden formularse preferentemente en una composición farmacéutica tal como un agente de control de la función intestinal. En el caso en el que las bacterias del género *Lactococcus* según la invención se formulen en un agente de control de la función intestinal, el contenido de las bacterias del género *Lactococcus* o la dosis diaria de las mismas no están particularmente limitados, siempre que se estime que el contenido o la dosis diaria sea suficiente para mostrar efectos de control de la función intestinal. Es preferente, por ejemplo, que la cantidad ingerida diariamente de las bacterias del género *Lactococcus* sea de aproximadamente 1×10^9 UFC.

15 Aunque un medio de precultivo usado para cultivar *Bifidobacterium longum* y las bacterias del género *Lactococcus* previamente no está particularmente limitado siempre que el medio de precultivo se use habitualmente, el medio de precultivo es preferentemente un medio lácteo. El medio de precultivo es más preferentemente un medio de leche desnatada reconstituida, debido a que el medio de leche desnatada reconstituida es fácil de manejar. Es preferente que la concentración del medio de leche desnatada reconstituida sea del 3 % (p/p) o superior, y más preferentemente del 8 % (p/p) o superior. Además, el medio de precultivo puede contener sustancias estimulantes del crecimiento tales como extracto de levadura o agentes reductores tales como L-cisteína. Es particularmente preferente que una sustancia estimulante del crecimiento se formule en un medio precultivado, ya que las bifidobacterias muestran un nivel bajo de proliferación en el medio acuoso. Específicamente, puede usarse un medio de cultivo que contiene del 0,1 al 1 % (p/p) de extracto de levadura. El medio de precultivo se somete a esterilización para su uso. La esterilización puede realizarse según un procedimiento convencional; se realiza específicamente calentando a 80 a 122 °C durante 5 a 40 minutos, preferentemente a 85 a 95 °C durante 5 a 35 minutos.

25 El crecimiento de *Bifidobacterium longum* y su supervivencia durante el almacenamiento puede mejorarse sencilla y eficazmente según el procedimiento para promover el crecimiento de *Bifidobacterium longum* y mejorar su supervivencia según la presente invención. Específicamente, las bacterias del género *Lactococcus* según la presente invención y la *Bifidobacterium longum* se cultivan conjuntamente según el procedimiento. Aunque la relación de inoculación de *Bifidobacterium longum* con respecto a las bacterias del género *Lactococcus* según la presente invención que se van a cultivar conjuntamente como iniciadores en un medio de base no está particularmente limitada, la relación de inoculación es preferentemente de 100:1 a 1:10, y más preferentemente de 10:1 a 1:1. Aunque la cantidad de las mismas que se van a inocular en el medio de base no está particularmente limitada, es preferente que la cantidad total de *Bifidobacterium longum* y de las bacterias del género *Lactococcus* inoculada sea del 0,01 al 10 % (v/v), más preferentemente del 0,1 al 5 % (v/v), con respecto a la cantidad del medio de base.

40 Aunque el medio de base no está particularmente limitado, siempre que el medio de base se use habitualmente para el cultivo conjunto de bifidobacterias con bacterias ácido lácticas, es preferente que el medio de base contenga leche como su componente principal. Según el procedimiento para promover el crecimiento de *Bifidobacterium longum* y mejorar su supervivencia según la presente invención, la proliferación de *Bifidobacterium longum* y su supervivencia puede mejorarse incluso en dicho medio de leche que es habitualmente inadecuado para el cultivo de bifidobacterias. El medio de base puede prepararse formulando un edulcorante tal como sacarosa, pectina, fruta, zumo de fruta, agar, gelatina, aceite y grasa, aroma, agente colorante, estabilizante, agente reductor o similares en leche de vaca, leche desnatada, nata fresca, mantequilla, leche entera en polvo, leche desnatada en polvo o similares, según la necesidad, seguido por esterilización, homogeneización, enfriamiento y similares. Es particularmente preferente que el medio de base se use para preparar leche fermentada que contenga *Bifidobacterium longum*.

50 A continuación, la presente invención se explicará circunstancialmente indicando algunos ejemplos. No obstante, la presente invención no está limitada a los ejemplos siguientes.

EJEMPLO 1

55 Se inocularon 30 ml de un cultivo de semillas de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852 en 1000 ml de medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) esterilizado a 90 °C durante 30 minutos y después se cultivaron a 25 °C durante 16 horas. Por otro lado, se esterilizaron 1000 ml de medio de leche desnatada al 11 % (p/p) que contenía el 0,2 % (p/p) de extracto de levadura a 90 °C durante 30 minutos, y se inocularon 100 ml de un cultivo de semillas de *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 en un medio de leche desnatada, seguido por cultivo a 37 °C durante 6 horas.

65 Aparte de lo anterior, se esterilizaron 50 l de un medio de base preparado mezclando y disolviendo materiales brutos compuesto por leche desnatada en polvo, leche entera en polvo, pectina y sacarosa, conteniendo el medio de base el 0,5 % (p/p) de grasa butírica, el 8,0 % (p/p) de componente sólido de leche no graso, el 5,0 % (p/p) de sacarosa y el 0,2 % (p/p) de pectina, a 90 °C durante 10 minutos, seguido por enfriamiento a 40 °C. Se inocularon 50 ml del cultivo obtenido anteriormente de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852 precultivado y 500 ml del cultivo obtenido

anteriormente de *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 precultivado en el medio de base esterilizado, seguido por cultivo a 37 °C durante 16 horas para obtener leche fermentada. La leche fermentada se enfrió inmediatamente con agitación y la leche fermentada enfriada se homogeneizó a una presión de 15 MPa, después se dispuso el producto resultante en un recipiente de vidrio que tenía una capacidad de 200 ml y después se selló el recipiente para obtener la bebida de yogur. La bebida de yogur obtenida tenía un pH de 4,64 y contenía $6,8 \times 10^8$ UFC/g de *Bifidobacterium longum*. Cuando la bebida de yogur se almacenó a 10 °C durante 14 días, el conteo viable de *Bifidobacterium longum* fue de $5,8 \times 10^8$ UFC/g y su tasa de supervivencia fue del 85 %.

EJEMPLO 2

Se obtuvo bebida de yogur del mismo modo que en el ejemplo 1, excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852. La bebida de yogur obtenida tenía un pH de 4,62 y contenía $8,5 \times 10^8$ UFC/g de *Bifidobacterium longum*. Cuando la bebida de yogur se almacenó a 10 °C durante 14 días, el conteo viable de *Bifidobacterium longum* fue de $7,6 \times 10^8$ UFC/g y su tasa de supervivencia fue del 89 %.

EJEMPLO 3

Se obtuvo bebida de yogur del mismo modo que en el ejemplo 1, excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC859 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852. La bebida de yogur obtenida tenía un pH de 4,56 y contenía $7,2 \times 10^8$ UFC/g de *Bifidobacterium longum*. Cuando la bebida de yogur se almacenó a 10 °C durante 14 días, el conteo viable de *Bifidobacterium longum* fue de $5,8 \times 10^8$ UFC/g y su tasa de supervivencia fue del 81 %.

EJEMPLO 4

Se obtuvo bebida de yogur del mismo modo que en el ejemplo 1, excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC865 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852. La bebida de yogur obtenida tenía un pH de 4,54 y contenía $6,9 \times 10^8$ UFC/g de *Bifidobacterium longum*. Cuando la bebida de yogur se almacenó a 10 °C durante 14 días, el conteo viable de *Bifidobacterium longum* fue de $6,6 \times 10^8$ UFC/g y su tasa de supervivencia fue del 96 %.

EJEMPLO 5

Se obtuvo bebida de yogur del mismo modo que en el ejemplo 1, excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC866 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852. La bebida de yogur obtenida tenía un pH de 4,55 y contenía $6,5 \times 10^8$ UFC/g de *Bifidobacterium longum*. Cuando la bebida de yogur se almacenó a 10 °C durante 14 días, el conteo viable de *Bifidobacterium longum* fue de $6,2 \times 10^8$ UFC/g y su tasa de supervivencia fue del 95 %.

EJEMPLO 6

500 ml de un cultivo de semillas de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852 cultivado a 37 °C durante 16 horas en un medio de cultivo compuesto por 50 g de extracto de carne, 100 g de extracto de levadura, 100 g de peptona, 200 g de lactosa, 50 g de K_2HPO_4 , 10 g de KH_2PO_4 , 4 g de cistina y 9,5 l de agua, se inoculó en 10 l de un medio de cultivo que tenía la misma composición que el medio de cultivo mencionado anteriormente y después se cultivó a 37 °C durante 16 horas. Además, todo el líquido de cultivo obtenido de este modo (10,5 l) se inoculó en 200 l de un medio de cultivo esterilizado a 90 °C durante 30 minutos que tenía la misma composición que el medio de cultivo mencionado anteriormente y después se cultivó a 37 °C durante 16 horas. El conteo viable después del cultivo fue de $3,0 \times 10^9$ UFC/ml.

Después, las células bacterianas se recogieron por centrifugación (15.000 rpm) usando un dispositivo de centrifugación de tipo romo (fabricado por TOMY SEIKO CO., LTD., con la denominación comercial RD-201V), y se suspendieron de nuevo en solución salina fisiológica (esterilizada a 90 °C durante 30 minutos) en la misma cantidad que el medio de cultivo, seguido por centrifugación tal como se ha descrito anteriormente para recoger las células bacterianas de nuevo. Las células bacterianas recogidas se suspendieron en 20 l de una solución (esterilizada a 90 °C durante 30 minutos) que contenía el 10 % (p/p) de leche desnatada, el 1 % (p/p) de sacarosa y el 1 % (p/p) de glutamato monosódico, y se liofilizaron según un procedimiento convencional para obtener aproximadamente 2,2 kg de polvo que contenía $8,6 \times 10^{10}$ UFC/g de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852.

EJEMPLO 7

Se obtuvieron aproximadamente 2,2 kg de polvo que contenía $9,2 \times 10^{10}$ UFC/g de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857 del mismo modo que en el EJEMPLO 6 excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852.

EJEMPLO 8

Se obtuvieron aproximadamente 2,2 kg de polvo que contenía $8,5 \times 10^{10}$ UFC/g de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC859 del mismo modo que en el EJEMPLO 6 excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC859 en

vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852.

EJEMPLO 9

- 5 Se obtuvieron aproximadamente 2,2 kg de polvo que contenía $9,4 \times 10^{10}$ UFC/g de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC865 del mismo modo que en el EJEMPLO 6 excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC865 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852.

EJEMPLO 10

- 10 Se obtuvieron aproximadamente 2,2 kg de polvo que contenía $8,8 \times 10^{10}$ UFC/g de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC866 del mismo modo que en el EJEMPLO 6 excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC866 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852.

15 EJEMPLO 11

- Se obtuvieron aproximadamente 20 kg de un agente de control de la función intestinal que contenía polvo bacteriano de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852 mezclando uniformemente 20 g de polvo bacteriano que contenía *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852, siendo el polvo bacteriano el preparado en el EJEMPLO 6, con 14 kg de almidón esterilizado en seco y 6 kg de lactosa.

EJEMPLO 12

- 25 Se obtuvieron aproximadamente 20 kg de un agente de control de la función intestinal que contenía polvo bacteriano de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857 mezclando uniformemente 20 g de polvo bacteriano que contenía *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857, siendo el polvo bacteriano el preparado en el EJEMPLO 7, con 14 kg de almidón esterilizado en seco y 6 kg de lactosa.

EJEMPLO 13

- 30 Se obtuvieron aproximadamente 20 kg de un agente de control de la función intestinal que contenía polvo bacteriano de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC859 mezclando uniformemente 20 g de polvo bacteriano que contenía *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC859, siendo el polvo bacteriano el preparado en el EJEMPLO 8, con 14 kg de almidón esterilizado en seco y 6 kg de lactosa.

35 EJEMPLO 14

- Se obtuvieron aproximadamente 20 kg de un agente de control de la función intestinal que contenía polvo bacteriano de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC865 mezclando uniformemente 20 g de polvo bacteriano que contenía *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC865, siendo el polvo bacteriano el preparado en el EJEMPLO 9, con 14 kg de almidón esterilizado en seco y 6 kg de lactosa.

EJEMPLO 15

- 45 Se obtuvieron aproximadamente 20 kg de un agente de control de la función intestinal que contenía polvo bacteriano de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC866 mezclando uniformemente 20 g de polvo bacteriano que contenía *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC866, siendo el polvo bacteriano el preparado en el EJEMPLO 10, con 14 kg de almidón esterilizado en seco y 6 kg de lactosa.

50 EJEMPLO 16

Se inocularon 30 ml de un cultivo de semillas de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852 en 1000 ml de medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) esterilizado a 90 °C durante 30 minutos y después se cultivaron a 25 °C durante 16 horas.

- 55 Aparte de lo anterior, se calentaron 50 l de leche bruta compuesta por el 3,0 % (p/p) de grasa butírica y el 9,5 % (p/p) de componente sólido de leche no graso a 70 °C, se homogeneizaron a una presión de 15 MPa, se esterilizaron a 90 °C durante 10 minutos y después se enfriaron a 40 °C. Después se inocularon 500 ml de cultivo de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852 precultivado tal como se ha descrito anteriormente en medio de base esterilizado y después se dispusieron en un recipiente de resina que tenía 500 ml de capacidad; el recipiente se selló. El cultivo se cultivó a 37 °C durante 16 horas y después se enfrió inmediatamente. La leche fermentada obtenida de este modo tenía un pH de 4,70 y contenía $1,3 \times 10^9$ UFC/g de bacterias ácido lácticas.

EJEMPLO 17

- 65 Se obtuvo leche fermentada del mismo modo que en el Ejemplo 16, excepto en que se usó *Lactococcus lactis*

subsp. lactis MCC857 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852. La leche fermentada obtenida tenía un pH de 4,69 y contenía $1,5 \times 10^9$ UFC/g de bacterias ácido lácticas.

EJEMPLO 18

5 Se obtuvo leche fermentada del mismo modo que en el Ejemplo 16, excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC859 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852. La leche fermentada obtenida tenía un pH de 4,65 y contenía $1,4 \times 10^9$ UFC/g de bacterias ácido lácticas.

10 EJEMPLO 19

Se obtuvo leche fermentada del mismo modo que en el Ejemplo 16, excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC865 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852. La leche fermentada obtenida tenía un pH de 4,64 y contenía $1,5 \times 10^9$ UFC/g de bacterias ácido lácticas.

15 EJEMPLO 20

20 Se obtuvo leche fermentada del mismo modo que en el Ejemplo 16, excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC866 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852. La leche fermentada obtenida de este modo tenía un pH de 4,62 y contenía $1,3 \times 10^9$ UFC/g de bacterias ácido lácticas.

EJEMPLO 21

25 Se inocularon 30 ml de un cultivo de semillas de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852 en 1000 ml de medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) esterilizado a 90 °C durante 30 minutos y después se cultivaron a 25 °C durante 16 horas. Aparte de lo anterior, se inocularon 50 ml de un cultivo mixto de *Streptococcus thermophilus* (fabricado por HANSEN) y *Lactobacillus bulgaricus* (fabricado por HANSEN) en 1500 ml de un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) esterilizado a 90 °C durante 30 minutos y después se cultivaron a 37 °C durante 5 horas.

30 Aparte de lo anterior, se calentaron 50 l de leche bruta compuesta por el 3,0 % (p/p) de grasa butírica y el 9,0 % (p/p) de componente sólido de leche no graso a 70 °C, se homogeneizaron a una presión de 15 MPa, se esterilizaron a 90 °C durante 10 minutos y después se enfriaron a 40 °C. Se inocularon 500 ml del cultivo de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852 precultivado tal como se ha descrito anteriormente en 50 ml de un cultivo mixto de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* al medio de base esterilizado y después se dispusieron en un recipiente de resina que tenía 500 ml de capacidad. Después, el recipiente se selló, las bacterias se cultivaron a 37 °C durante 7 horas y después se enfriaron inmediatamente. La leche fermentada obtenida de este modo tenía un pH de 4,75 y contenía $9,8 \times 10^8$ UFC/g de bacterias ácido lácticas.

40 EJEMPLO 22

Se obtuvo leche fermentada del mismo modo que en el EJEMPLO 21, excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852. La leche fermentada obtenida tenía un pH de 4,74 y contenía $1,2 \times 10^9$ UFC/g de bacterias ácido lácticas.

45 EJEMPLO 23

50 Se obtuvo leche fermentada del mismo modo que en el EJEMPLO 16, excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC859 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852. La leche fermentada obtenida tenía un pH de 4,70 y contenía $1,6 \times 10^9$ UFC/g de bacterias ácido lácticas.

EJEMPLO 24

55 Se obtuvo leche fermentada del mismo modo que en el EJEMPLO 16, excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC865 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852. La leche fermentada obtenida tenía un pH de 4,72 y contenía $1,7 \times 10^9$ UFC/g de bacterias ácido lácticas.

EJEMPLO 25

60 Se obtuvo leche fermentada del mismo modo que en el EJEMPLO 16, excepto en que se usó *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC866 en vez de *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852. La leche fermentada obtenida tenía un pH de 4,70 y contenía $1,5 \times 10^9$ UFC/g de bacterias ácido lácticas.

Aplicabilidad industrial

65 Las bacterias del género *Lactococcus* según la presente invención permiten a *Bifidobacterium longum* en un

producto de leche fermentada, tal como yogur, bebida de yogur, bebida de leche ácida o similares, mantener un nivel alto de conteo viable y de tasa de supervivencia durante el almacenamiento y, por lo tanto, las bacterias del género *Lactococcus* son útiles en términos de control de la salud y la producción de leche fermentada, y pueden aplicarse en el sector de la fabricación de productos de leche fermentada.

REIVINDICACIONES

1. Bacterias del género *Lactococcus* que tienen propiedades bacteriológicas de:

- 5 (1) fermentabilidad que cuaja un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) cuando se cultiva a una temperatura de 25 °C a 37 °C durante 16 horas;
- 10 (2) propiedades que promueven el crecimiento de *Bifidobacterium longum* que conducen a un conteo viable de *Bifidobacterium longum* de 5×10^8 UFC/g o superior, cuando se cultiva conjuntamente con *Bifidobacterium longum* en el medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) hasta un pH del mismo de 4,4 a 4,6; y
- 15 (3) propiedades que mejoran la supervivencia de *Bifidobacterium longum* durante el almacenamiento que conducen a una tasa de supervivencia de *Bifidobacterium longum* del 30 % o superior después de cultivo conjunto con *Bifidobacterium longum* en el medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) hasta un pH del mismo de 4,4 a 4,6, enfriamiento rápido y almacenamiento de dos semanas a 10 °C,
- 20 seleccionándose dichas bacterias del género *Lactococcus* del grupo que consiste en *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852 (FERM BP-10742), *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857 (FERM BP-10757), *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC859 (FERM BP-10744), *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC865 (FERM BP-10745) y *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC866 (FERM BP-10746).
- 25 2. Las bacterias del género *Lactococcus* según la reivindicación 1, seleccionándose al menos una cepa bacteriana de *Bifidobacterium longum* del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 y la cepa de tipo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707.
- 30 3 Las bacterias del género *Lactococcus* según la reivindicación 1 o 2., siendo las bacterias *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC852 (FERM BP-10742).
- 35 4. Las bacterias del género *Lactococcus* según la reivindicación 1 o 2., siendo las bacterias *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC857 (FERM BP-10757).
5. Las bacterias del género *Lactococcus* según la reivindicación 1 o 2., siendo las bacterias *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC859 (FERM BP-10744).
- 40 6. Las bacterias del género *Lactococcus* según la reivindicación 1 o 2., siendo las bacterias *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC865 (FERM BP-10745).
7. Las bacterias del género *Lactococcus* según la reivindicación 1 o 2., siendo las bacterias *Lactococcus lactis subsp. lactis* MCC866 (FERM BP-10746).
- 45 8. Polvo de bacterias que comprenden las bacterias del género *Lactococcus* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Una composición farmacéutica que comprende las bacterias del género *Lactococcus* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 50 10. Un agente de control de la función intestinal que comprende las bacterias de los géneros *Lactococcus* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
11. Un procedimiento para promover el crecimiento de *Bifidobacterium longum* y mejorar su supervivencia que comprende usar las bacterias del género *Lactococcus* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.