

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 414**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/36** (2006.01)  
**C12N 15/31** (2006.01)  
**A23C 9/127** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)  
**A23L 2/02** (2006.01)  
**C12Q 1/04** (2006.01)  
**C12Q 1/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2011 E 11747296 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2540816**

54 Título: **Método para construir una bacteria nueva que pertenece al género Bifidobacterium**

30 Prioridad:

**16.06.2010 JP 2010136792**  
**24.02.2010 JP 2010039212**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.01.2015**

73 Titular/es:

**KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (100.0%)**  
**1-19, Higashi-Shinbashi 1-chome, Minato-ku**  
**Tokyo 105-8660, JP**

72 Inventor/es:

**SAKO, TOMOYUKI;**  
**MIURA, MIKA;**  
**SHIMAKAWA, YASUHISA;**  
**MIYAZAKI, KOJI;**  
**FUJIMOTO, JUNJI y**  
**WATANABE, KOICHI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 526 414 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

Método para construir una bacteria nueva que pertenece al género *Bifidobacterium*

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una bacteria que pertenece al género *Bifidobacterium*, un método para detectar la bacteria, un método para cuantificar un recuento bacteriano de la bacteria, y un método para cuantificar un recuento bacteriano viable de la bacteria.

10

**Antecedentes de la técnica**

Las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* son bacterias importantes de la flora bacteriana intestinal humana y se sabe que tienen efectos beneficiosos sobre la salud humana, tales como la regulación de la función intestinal, por ejemplo, la mejoría del estreñimiento y diarrea, la supresión del aumento del colesterol en el suero, y la inmunoestimulación. Por eso, hay disponibles varios productos comerciales que contienen las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* en forma de varios alimentos y bebidas fermentados, preparaciones probióticas, y similares. Particularmente, los alimentos y las bebidas de leche fermentada tienen una palatabilidad excelente; por lo tanto, son adecuadas para una ingestión continua de bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium*.

20

Las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* son anaerobias obligadas y susceptibles al oxígeno, el pH bajo, y la acidez alta. Por lo tanto, hay muchas dificultades en el manejo de las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* en alimentos y bebidas de leche fermentada en términos de proliferación durante la producción, viabilidad durante el almacenaje, y similares. Con el fin de obtener el efecto fisiológico de las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium*, se considera necesario suministrar tantas bacterias vivas en el intestino como sea posible. Particularmente, se considera un factor importante el aumento de la viabilidad de las bacterias en los alimentos y bebidas, concretamente la llegada de las bacterias ingeridas al intestino.

25

Con el fin de resolver los problemas anteriores, se ha hecho un intento para mejorar la viabilidad en los alimentos y bebidas de leche fermentada mejorando el método de producción y añadiendo varios agentes mejoradores de la viabilidad tal como la N-acetil glucosamina, ácido pantoténico, péptidos, y lactulosa. Sin embargo, tal agente mejorador de la viabilidad para las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* no se puede añadir fácilmente debido no solo al aumento del coste de producción sino porque causa problemas tales como la reducción de la palatabilidad. Además, también se ha estudiado un método que bloquee completamente el contacto de las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* con el oxígeno depositando un producto fermentado que contiene las bacterias en un envase compuesto por un material de envasado impermeable al oxígeno inmediatamente después que se haya producido el producto. Sin embargo, aún no hay disponible un envase impermeable al oxígeno perfecto. Además no hay mucha flexibilidad para dar forma a tal envase, y su depósito en la basura se complica ya que el envase se fabrica utilizando materiales compuestos. Además, el envase en sí mismo es caro, etc. Como se ha mencionado anteriormente, hay muchas limitaciones en la utilización del envase.

30

35

40

En consecuencia, una solución fundamental para mejorar la viabilidad de las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* en los alimentos y bebidas fermentadas es producir bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* que tengan una alta viabilidad incluso bajo condiciones aeróbicas y bajo condiciones de pH bajo y alta acidez. Ejemplos de tal cepa bacteriana incluyen el *Bifidobacterium breve* YIT 10001 (FERM BP-8205) (Documento Patente 1), *Bifidobacterium breve* SBR 3212 (FERM P-11915) (Documento Patente 2), y *Bifidobacterium bifidum* YIT 4002 (FERM BP-1038) (Documento Patente 3).

45

Sin embargo, existe un problema ya que se espera que estas cepas con viabilidad mejorada muestren sus efectos de viabilidad mejorada solamente bajo las condiciones en las que se han producido. O sea, en la producción de una cepa mutante de las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium*, se practica normalmente un método de subcultivo y almacenamiento de las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* en un ambiente que es riguroso para el crecimiento de las bacterias y se obtiene una cepa superviviente. Aunque se puede esperar un cierto efecto en el nivel de mejoría de la viabilidad en un ambiente bajo el que se ha producido la cepa mutante, no se puede esperar un efecto de mejora de la viabilidad en otros ambientes. En consecuencia, las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* que se obtienen por un método convencional no se pueden aplicar a los alimentos y bebidas que se distribuyen bajo una condición diferente que bajo la que se produjo la cepa mutante. En consecuencia, la utilidad del método convencional ha sido extremadamente limitada.

50

55

60

También, aunque la causa se desconoce, se sabe que incluso una cepa bacteriana con viabilidad mejorada obtenida por subcultivo y almacenamiento bajo condiciones con deterioro de los factores ambientales (por ejemplo, un pH en la región ácida) no muestra su efecto de mejora de viabilidad cuando se utiliza bajo condiciones más favorables a un pH en la región neutra. Esta ha sido también una de las razones del fracaso en la obtención de una cepa bacteriana altamente versátil que sea aplicable a varios alimentos y bebidas.

65

El Documento Patente 4 se refiere a una bacteria del género *Bifidobacterium* y a los alimentos fermentados que

utilizan la misma.

#### Documento relacionados con la técnica

- 5 [Documento Patente 1] Publicación internacional N° WO 03/040350  
[Documento Patente 2] JP-2922013  
[Documento Patente 3] JP-B-61-19220  
[Documento Patente 4] EP 1 443 105 A1

#### 10 Divulgación de la invención

##### Problemas a resolver por la invención

- 15 En consecuencia, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para producir bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium que tienen una viabilidad excelente incluso bajo varias condiciones con factores ambientales diferentes, nuevas bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium obtenidas por el método, y un método para detectar las bacterias.

##### Medios para resolver los problemas

- 20 Los presentes inventores llevaron a cabo una investigación intensiva con el fin de resolver los problemas. Como resultado, han encontrado que, subcultivando y almacenando las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium alternativamente en al menos dos tipos de sistemas en los que las condiciones de los factores ambientales son diferentes al menos dos veces, se pueden obtener bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium que tienen una viabilidad excelente bajo las condiciones del subcultivo y almacenamiento alterno.

- 30 Además, como resultado de la investigación de un método para detectar específicamente las nuevas bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium obtenidas de esta manera, han encontrado un cebador capaz de amplificar específicamente un fragmento de ADN de las bacterias, y se ha descubierto que las bacterias se pueden detectar y cuantificar específicamente utilizando el cebador. Los presentes inventores han descubierto además que el recuento de bacterias viables de entre las bacterias anteriores se pueden cuantificar con una combinación del cebador y un colorante permeable a la membrana.

- 35 En el presente documento, se describe un método para producir bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium, que incluye el subcultivo y el almacenamiento de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium de manera alterna en al menos dos tipos de sistemas bajo condiciones con diferentes factores ambientales al menos dos veces.

- 40 La presente invención proporciona una bacteria que pertenece al género Bifidobacterium, en que la bacteria es la Bifidobacterium breve YIT 12272 que tiene el número de registro FERM BP-11320.

También, la presente invención proporciona un alimento o bebida, particularmente un alimento o bebida de leche fermentada que contiene dicha bacteria que pertenece al género Bifidobacterium.

- 45 También, la presente proporciona el uso de un fragmento de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia anterior para detectar o cuantificar al Bifidobacterium breve YIT 12272 que tiene el número de registro FERM BP-11320.

- 50 También, la presente invención proporciona el uso de un cebador que tiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia para detectar o cuantificar al Bifidobacterium breve YIT 12272 que tiene el número de registro FERM BP-11320.

- 55 También, la presente invención proporciona un método para detectar Bifidobacterium breve YIT 12272 que comprende la detección por el uso del cebador.

También, la presente invención proporciona un método cuantificar un recuento bacteriano de Bifidobacterium breve YIT 12272 que incluye el uso del cebador.

- 60 También, la presente invención proporciona un método para cuantificar un recuento de bacterias viables de Bifidobacterium breve YIT 12272 que tiene el número de registro FERM BP-11320 que incluye la realización de una reacción PCR de una muestra tratada con un colorante permeable a la membrana utilizando el cebador.

**Efecto de la invención**

- De acuerdo con el método para producir bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium de la presente invención, se obtiene una bacteria que pertenece al género Bifidobacterium, en que la bacteria es el Bifidobacterium breve YIT 12272 que tiene el número de registro FERM BP-11320. En concreto, se obtiene un Bifidobacterium breve YIT 12272 que tiene el número de registro FERM BP-11320 que tiene una viabilidad excelente incluso en productos terminados o bajo condiciones diferentes en los factores ambientales tales como las condiciones de distribución. Aunque tal cepa bacteriana es aplicable a varios alimentos y bebidas y tienen alta viabilidad en los alimentos y bebidas, puede mostrar eficazmente el efecto fisiológico de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium. También, la cepa bacteriana es utilizable en varios alimentos y bebidas y se pueden producir mejorando las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium que tienen un efecto fisiológico específico tal como una acción anti Helicobacter pylori por medio del método de producción de la presente invención. Por estas razones, la presente invención tiene una aplicabilidad industrial extremadamente alta.
- 15 El Bifidobacterium breve YIT 12272 que tiene una viabilidad excelente se puede detectar y cuantificar específicamente en alimentos, bebidas, heces y en el intestino utilizando el fragmento de ADN descrito anteriormente.

**Breve descripción de los dibujos**

- 20 La FIG. 1 muestra la secuencia de nucleótidos de la banda RAPD específica de Bifidobacterium breve YIT 12272. La secuencia de un cebador específico de YIT 12272 está rodeada por un cuadrado;
- La FIG. 2 muestra el cambio del valor cuantitativo de YIT 12272 por PCR cuantitativa con un tratamiento de tinción permeable a la membrana;
- 25 La FIG. 3 muestra las condiciones óptimas para el tratamiento PMA;
- La FIG. 4 muestra el cambio en el valor cuantitativo del YIT 12272 tratado por calor en las heces por tratamiento PMA; y
- La FIG. 5 muestra una relación entre el recuento de bacterias viables de YIT 12272 vivo añadido a las heces y el valor cuantitativo de YIT 12272 obtenido por PCR cuantitativa (con tratamiento PMA).

**Modos de llevar a cabo la invención**

- En el presente documento, un factor ambiental se refiere a cualquier factor que afecta a la proliferación y viabilidad de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium. Ejemplos de los mismos incluyen el pH, la presión osmótica, acidez, temperatura de cultivo/almacenamiento, tiempo de cultivo/almacenamiento, la cantidad de oxígeno disuelto, luz, presión, actividad acuática, un microorganismo co-existente, un factor nutricional (por ejemplo, azúcares, proteína, péptido, grasas, tales como la grasa láctea, vitaminas, minerales, sólidos lácteos no grasos, y un factor de crecimiento de bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium tal como un extracto de levadura), un antibiótico, un método de cultivo (tal como un cultivo estático, un cultivo removido, un cultivo agitado, un cultivo en aeración), un método de esterilización, un método de mezclado, un método de envasado, y un material del envase de almacenamiento de un caldo de cultivo o un alimento o bebida. Particularmente, se utilizan preferentemente un pH, presión osmótica, acidez, temperatura de cultivo, y un factor nutricional, que son factores ambientales importantes que afectan la proliferación y viabilidad de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium. En el presente documento, la luz incluye tanto la luz visible como la luz no visible, y la acidez indica la cantidad de una solución acuosa 1/10 N de hidróxido sódico (en ml) necesaria para neutralizar 9 g de muestra.

- También "al menos dos tipos de sistema bajo condiciones con diferentes factores ambientales" se refiere a al menos dos tipos de sistemas en los que se varía la calidad y/o la cantidad de ciertos factores ambientales, por ejemplo, al menos dos tipos de sistema que resultan de la variación del pH, la presión osmótica, acidez, temperatura del cultivo, un factor nutricional, y similares de un caldo de cultivo o un alimento o bebida. Ejemplos más específicos incluyen sistemas que resultan de la variación de un caldo de cultivo o un alimento o bebida por medio del cambio en el pH, por ejemplo, de 5 a 3, cambiando la presión osmótica, por ejemplo, de 600 mOsm (miliosmol) a 950 mOsm, cambiando la acidez, por ejemplo, de 6 a 20, cambiando la temperatura del caldo de cultivo, por ejemplo, de 37 °C a 30 °C, cambiando los azúcares del caldo de cultivo o el alimento o bebida, por ejemplo, de un azúcar digerible a un azúcar no digerible, y, por ejemplo, aumentando la concentración de oxígeno disuelto por agitación.

- No se impone ninguna limitación en particular ni en el factor ambiental diana ni en los cambios de la calidad y/o cantidad del mismo. Sin embargo, es preferible tomar en consideración una o más condiciones y factores ambientales de los caldos de cultivo o alimentos o bebidas a los que se aplican las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium que se producen con el método de producción, seleccionar la condición y el factor ambiental que afecta la proliferación y viabilidad de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium, y llevar a cabo el subcultivo y almacenamiento alternativamente de las bacterias bajo la condición y factor ambiental seleccionados de esta manera. Aunque las condiciones de cultivo de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium varían dependiendo de la especie bacteriana, en general, el cultivo se lleva a cabo aproximadamente bajo las condiciones siguientes; un contenido en sólidos lácteos no grasos del 5 al 30%, un contenido en grasa láctea del 0 al 10%, una presión osmótica de 150 a 1000 mOsm, un pH del 4,0 al 7,0, una concentración de oxígeno disuelto de 0 a 2 ppm, y

una temperatura de cultivo de 30 a 39 °C. Las condiciones pueden variarse dentro del intervalo anterior, o se pueden fijar las condiciones fuera del intervalo anterior. Además, las condiciones de almacenamiento varían dependiendo del tipo y la forma del caldo de cultivo, alimento o bebida, por ejemplo, la temperatura de almacenamiento para los alimentos y bebidas puede ser una temperatura normal, una temperatura de refrigeración o una temperatura de congelación. Por lo tanto, el factor ambiental y la condición de un caldo de cultivo o un alimento o bebida a los que se aplican las bacterias se pueden seleccionar y usar apropiadamente.

También cuando se añade un jarabe (edulcorante) a un caldo de cultivo para proporcionar un alimento o bebida, se usarán varios tipos de azúcares. En este caso, la presión osmótica se puede aumentar o disminuir dependiendo del tipo de azúcar que se utilice; por lo tanto, tal cambio en la presión osmótica se puede utilizar como la condición que se va a variar.

Además, cuando un alimento o bebida se almacena en un depósito de mezcla durante un cierto periodo de tiempo antes de depositarse en un envase, la bebida o alimento necesita homogenizarse removiéndose antes de que se deposite en el envase. En este momento, el oxígeno del espacio superior del depósito de mezcla se puede meter y aumentar en algunos casos la concentración de oxígeno disuelto hasta una concentración de saturación. Por lo tanto, tal cambio en la concentración de oxígeno disuelto se puede utilizar como la condición que se va a variar.

Aunque no se impone ninguna limitación en particular sobre el tipo de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium que se pueden utilizar en el método de producción, los ejemplos de las mismas incluyen Bifidobacterium breve, B. longum, B. bifidum, B. animalis, B. suis, B. infantis, B. adolescentis, B. catenulatum, B. pseudocatenulatum, B. lactis, y B. globosum. Entre estas, son preferibles Bifidobacterium breve, Bifidobacterium longum, y Bifidobacterium bifidum ya que se han utilizado en varios productos lácteos durante algún tiempo y tienen datos acumulados de la seguridad y similares, y además, estas bacterias muestran también un efecto alto de mejora de la viabilidad. Entre estas, es particularmente preferible el Bifidobacterium breve.

Utilizando las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium mencionadas anteriormente como cepa parental, por subcultivo y almacenamiento alternativo de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium al menos dos veces en al menos dos tipos de sistemas bajo condiciones con diferentes factores ambientales, se pueden obtener las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium que tienen una viabilidad excelente bajo todas las condiciones que se usan para el subcultivo y almacenamiento alternativo. Específicamente, (1) la cepa parental de bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium se cultiva bajo el factor ambiental A para de esta manera obtener un caldo de cultivo, o un alimento o bebida. El caldo de cultivo, o el alimento o bebida obtenidos de esta manera se almacena de forma que se concentra o selecciona una cepa que muestra una viabilidad mejorada bajo las condiciones con el factor ambiental A. (2) Tras esto, se cultiva la cepa que muestra una viabilidad mejorada bajo el factor ambiental B para obtener de esta manera un caldo de cultivo o un alimento o bebida. El caldo de cultivo o el alimento o bebida obtenidos de esta manera se almacena de manera que se concentra o selecciona una cepa que muestra una viabilidad mejorada bajo las condiciones con el factor ambiental B. (3) Las etapas anteriores se repiten al menos dos veces, de forma que se pueden obtener bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium que muestran una viabilidad excelente bajo los factores ambientales A y B.

Un método de subcultivo y almacenamiento alternativo, cuando las condiciones se varían basándose en los factores ambientales A y B, incluye llevar a cabo el subcultivo y almacenamiento alternativo en cualquier combinación y orden tal como A → B → A → B → A y A → A → B → B → A → A → B → B → A → A → B → B; sin embargo el cultivo y almacenamiento alternos se lleva a cabo preferentemente al menos dos veces. Se lleva a cabo preferentemente 2 a 100 veces, más preferentemente 4 a 100 veces, particularmente preferentemente 4 a 50 veces.

Al menos se pueden fijar dos tipos de variaciones de la condición del factor ambiental. Se puede llevar a cabo un método de subcultivo y almacenamiento alternos en el que fijan tres variaciones de la condición, A, B, y C en cualquier manera, por ejemplo, A → B → C → A → B → C → A → B → C y A → A → A → B → B → C → A → B → B → B → C → C → A.

Los factores ambientales se cambian preferentemente al menos en un tipo, además, al menos en dos tipos, y particularmente al menos en tres tipos seleccionados de entre el pH, la presión osmótica, la acidez, la temperatura de cultivo, y un factor nutricional en términos de A y B. En el presente documento, estos factores se cambian preferentemente dentro del intervalo siguiente; cambio de pH de 0,1 a 3 entre 4,0 y 7,0, cambio de la presión osmótica de 10 a 700 mOsm entre 150 y 1000 mOsm, cambio de acidez de 1 a 20 entre 5 y 30, y cambio de la temperatura de cultivo de 1 a 6 °C entre 30 y 39 °C. En cuanto al factor nutricional, es preferible cambiar el tipo de azúcar de jarabe de palatinosa a maltosa reducida. También, el contenido de grasa láctea se cambia preferentemente en un 0,1 a 6% entre 0 y 10%. También el contenido en sólidos lácteos no grasos se cambia en 0,1 al 20% entre el 5 y el 30%.

Además, también es posible tratar la cepa parental de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium con un agente inductor de mutación y similar tal como rayos ultravioleta, nitrosoguanidina (NTG), y etil metansulfonato (EMS), y sometiendo la cepa parental tratada con el agente inductor de mutaciones al subcultivo y almacenamiento alternativo mencionado anteriormente para seleccionar una cepa bacteriana que tenga la calidad deseada.

En el presente documento, la viabilidad indica aproximadamente cuántas bacterias vivas están presentes en un caldo de cultivo o un alimento o bebida después del almacenamiento, y el recuento de bacterias viables que se puede obtener por un método ordinario. Por ejemplo, un caldo de cultivo, o una bebida o alimento que se almacena se diluye apropiadamente y se aplica a un medio de agar propionato TOS, seguido por el cultivo anaeróbico a 37 °C durante 72 horas. Luego, se puede obtener el recuento de bacterias viables determinando las colonias que se forman en el medio. La viabilidad se puede indicar basándose en la proporción del recuento de bacterias viables en un caldo de cultivo, o una bebida o alimento que se utiliza para almacenamiento después del almacenamiento con respecto a antes del almacenamiento.

Se puede utilizar cualquier medio en el que puedan crecer las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium, tales como un medio GAM, un medio MILS (Iwata & Morishita, Letter in Applied Microbiology, vol. 9, 165-168, 1989), un medio propionato TOS, leche de soja, jugo vegetal, zumo de frutas, y mosto como caldo de cultivo en el método de producción de la presente invención. Sin embargo, es preferible un medio que contiene leche como componente principal, y ejemplos de leche incluyen la leche de vaca (leche entera) y un producto procesado de la misma tal como la leche desnatada y un péptido derivado de leche. Se puede fijar un contenido en sólidos lácteos no grasos y un contenido en grasa en cualquier cantidad dependiendo del material lácteo que se utilice y la cantidad de mezcla del mismo, y se puede añadir un factor de crecimiento de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium tal como un extracto de levadura. Cualquiera de estos contenidos sólidos lácteos no grasos, contenido en grasa, y factor de crecimiento de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium puede ser un factor ambiental.

También, el factor ambiental de alimentos y bebidas de leche fermentada que se obtiene añadiendo un ingrediente opcional tal como un jarabe a un caldo de cultivo que contiene un medio lácteo está cerca del producto terminado; por lo tanto, las bacterias que muestran una viabilidad alta en un producto terminado pueden concentrarse más eficazmente. Por lo tanto, se utilizan preferentemente alimentos y bebidas de leche fermentada para el cultivo y mejora mencionados anteriormente de la cepa bacteriana. Un ingrediente opcional, por ejemplo, se pueden añadir un jarabe (edulcorante) tal como azúcares, un agente emulsionante, un aglutinante (un estabilizante), vitaminas, y minerales a los alimentos y bebidas de leche fermentada, cualquiera de los cuales puede ser un factor ambiental. Ejemplos del jarabe incluyen azúcares tales como glucosa, sacarosa, fructosa, jarabe de maíz alto en fructosa, jarabe de glucosa fructosa, palatinosa, trehalosa, lactosa, xilosa, azúcar de malta, miel, y molasas, azúcar alcohol tal como sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, palatinit, un jarabe de azúcar reducida, un edulcorante altamente dulce tal como aspartamo, taumatina, sucralosa, acetosulfamo-K, y stevia. También, se puede añadir un agente emulsionante tal como un éster de ácido graso sacarosa, un éster de ácido graso glicerina, un éster de ácido graso poliglicerina, un éster de ácido graso sorbitán, y lecitina, un aglutinante (un estabilizante) tal como agar, gelatina, carragenano, goma arábiga, goma xantano, pectina, goma de algarrobo, goma gelan, carboximetil celulosa, polisacáridos de soja, y alginato de propilenglicol a los alimentos y bebidas de leche fermentada. Además de estos, se pueden añadir zinc, hierro, y manganeso, un acidificante tal como el ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, y ácido glucónico, un contenido en grasa láctea tal como nata, mantequilla, crema ácida, saborizantes de, por ejemplo, yogur, frutos del bosque, naranja, membrillo chino, perilla, cítricos, manzana, menta, uva, albaricoque, pera, crema pastelera, melocotón, melón, plátano, tropicales, hierbas, té y café, un extracto de hierbas, y un extracto de caramelo, y similares.

Para el caldo de cultivo y el alimento o bebida de leche fermentada, también se pueden utilizar en combinación, microorganismos distintos de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium. Ejemplos de los microorganismos incluyen las bacterias que pertenecen al género Lactobacillus tal como Lactobacillus casei, L. acidophilus, L. plantarum, L. buchneri, L. gallinarum, L. amylovorus, L. brevis, L. rhamnosus, L. kefir, L. paracasei, L. curvatus, L. zeae, L. helveticus, L. salivarius, L. gasseri, L. fermentum, L. reuteri, L. crispatus, L. delbrueckii subesp. bulgaricus, L. delbrueckii subesp. delbrueckii, y L. johnsonii, bacterias que pertenecen al género Streptococcus tal como Streptococcus thermophilus, bacterias que pertenecen al género Lactococcus tal como Lactococcus lactis subesp. lactis y Lactococcus lactis subesp. cremoris, bacterias que pertenecen al género Enterococcus tal como Enterococcus faecalis y E. faecium, bacterias que pertenecen al género Bacillus tal como Bacillus subtilis, levaduras que pertenecen al género Saccharomyces, Torulaspora, y Candida tal como Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii, y Candida kefir.

Los alimentos y bebidas fermentados se pueden producir de acuerdo con un método ordinario. Por ejemplo, cuando se producen alimentos y bebidas de leche fermentada, la cepa parental de bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium se inoculan en un medio de leche esterilizada sola o en combinación con otros microorganismos, y se cultivan, y el producto resultante se somete a un tratamiento de homogeneización para dar leche fermentada. Posteriormente, se añade y mezcla una solución de jarabe preparada por separado, y el producto resultante se homogeniza y similar, y un saborizante se añade además para preparar el producto final.

Por el método mencionado anteriormente, que utiliza el Bifidobacterium breve YIT 4125 (FERM BP-7813) como cepa parental, se produce una cepa de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium que muestran una viabilidad particularmente excelente bajo las condiciones de diferentes factores ambientales. La cepa bacteriana obtenida de esta manera se depositó como Bifidobacterium breve YIT 12272 (FERM BP-11320) en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki) Organismo Internacional Depositario de Patentes, el 16 de febrero de 2010. El Bifidobacterium breve YIT 12272

## ES 2 526 414 T3

tiene las siguientes características bacteriológicas en comparación con su cepa parental, el Bifidobacterium breve YIT 4125.

[Tabla 1]

Morfología celular bacteriana y características de la colonia		
	Cepa YIT 4125	Cepa YIT 12272
Tinción de Gram	Positiva	Positiva
Morfología de la célula bacteriana	Bacilo pleomórfico	Bacilo pleomórfico
Color de la colonia	Blanco	Blanco
Forma de la colonia	Circular con margen suave	Circular con margen suave

5 Las células bacterianas de cada cepa se cultivaron en medio MILS con agar añadido (Iwata & Morishita, Letter in Applied Microbiology, vol. 9, 165-168, 1989) a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas (Mitsubishi gas chemical company, Inc.) y se recogió una colonia única del medio agar (aislamiento de colonia única). Este proceso de aislamiento de una colonia única se repitió para purificar una cepa bacteriana. Luego, se observaron la morfología bacteriana (cultivo en medio MILS una noche, seguido por tinción gram) y las características de la colonia (cultivo en medio agar) de la cepa bacteriana purificada.

10

[Tabla 2]

Resultados del ensayo del carácter de fermentación del azúcar por API 50CH		
	YIT 4125	YIT 12272
Control	-	-
Glicerol	-	-
Eritritol	-	-
D-Arabinosa	±	-
L-Arabinosa	-	-
D-Ribosa	+	+
D-Xilosa	-	-
L-Xilosa	-	-
D-Adonitol	-	-
Metil-βD-Xilopiranosido	-	-
D-Galactosa	+	+
D-Glucosa	+	+
D-Fructosa	+	+
D-Manosa	(+)	+
L-Sorbosa	-	-
L-Ramnosa	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
D-Manitol	-	-
D-Sorbitol	-	-
Metil-αD-Manopiranosido	-	-
Metil-αD-Glucopiranosido	+	+
N-Acetil-Glucosamina	-	-
Amigdalina	+	+

## ES 2 526 414 T3

Resultados del ensayo del carácter de fermentación del azúcar por API 50CH		
	YIT 4125	YIT 12272
Arbutina	+	+
Esculin citrato férrico	+	+
Salicina	+	+
D-Celobiosa	+	+
D-Maltosa	+	+
D-Lactosa	+	+
D-Melibiosa	+	+
D-Sacarosa	+	+
D-Trehalosa	±	(+)
Inulina	-	-
D-Melezitosa	+	+
D-Rafinosa	+	+
Almidón	-	(+)
Glucógeno	-	-
Xilitol	-	-
Gentiobiosa	+	+
D-Turanosa	+	+
D-Lixosa	±	-
D-tagatosa	-	-
D-Fucosa	-	-
L-Fucosa	(+)	(+)
D-Arabitól	-	-
L-Arabitól	-	-
Gluconato	-	-
2 Ceto Gluconato	-	-
5 Ceto Gluconato	-	-
+: fuertemente positivo (+): débilmente positivo -: Negativo ±: Negativo o débilmente positivo demorado		

De acuerdo con el manual de API 50 CH (el producto de bioMerieux Japón), cada suspensión bacteriana tras el cultivo durante una noche se inocula en un medio que contiene cada sustrato, y luego se cultivan anaeróticamente a 37 °C durante siete días. Tras esto, se determinó las características de fermentación de cada sustrato.

5 No se impone ninguna limitación en particular sobre la forma de utilización de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium de la presente invención, y se pueden utilizar bacterias liofilizadas o también se puede utilizar un producto de cultivo que contiene las bacterias. Sin embargo, de cualquier manera, las bacterias preferentemente están vivas.

10 Las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium de la presente invención se pueden mezclar con un vehículo farmacéutico sólido o líquido no tóxico y se utilizan en la forma convencional de preparación farmacéutica. Ejemplos de la preparación incluyen una preparación sólida tal como un comprimido, un gránulo, polvo y una cápsula, una preparación líquida tal como una solución, una suspensión, y una emulsión, y una preparación liofilizada. Estas preparaciones se pueden preparar por un método ordinario que se utiliza en la tecnología de preparación

15



farmacéutica. Ejemplos de vehículos farmacéuticos no tóxicos incluyen glucosa, lactosa, sacarosa, almidón, manitol, dextrina, glicéridos de ácidos grasos, polietilenglicol, hidroxietil almidón, etilenglicol, ésteres de ácidos grasos polioxi-etileno sorbitán, aminoácidos, gelatina, albúmina, agua, y solución salina fisiológica. También se puede añadir apropiadamente según se necesite un aditivo convencional tal como un estabilizante, un humectante, un agente emulsionante, un aglutinante, un agente de ajuste de la tonicidad, y un diluyente.

Las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium de la presente invención no solo se pueden preparar como una preparación farmacéutica como se ha descrito anteriormente sino que también se utiliza añadiéndolas a alimentos y bebidas. Cuando se añaden a alimentos y bebidas, las bacterias se pueden añadir solas o junto con varios ingredientes nutricionales. Específicamente, cuando se añaden las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium de la presente invención a alimentos y bebidas, se puede utilizar adecuadamente un aditivo que es utilizable en alimentos y bebidas, y los alimentos y bebidas se pueden moldear en una forma adecuada al consumo, específicamente un gránulo, un grano, un comprimido, una cápsula, una pasta, y similares, por medios convencionales. Además, las bacterias se pueden añadir a varios productos alimenticios, por ejemplo, un producto procesado de carne al como el jamón y las salchichas, una mantequilla, y una leche desecada, o las bacterias también se pueden añadir a bebidas tales como el agua, zumo de frutas, leche, un refresco, y una bebida de té. Se señala que los alimentos y comidas incluyen también la alimentación para animales.

Las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium de la presente invención se pueden aplicar a varios tipos de alimentos y bebidas de diferentes ambientes, y debido a su alta viabilidad en alimentos y bebidas. las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium pueden mostrar eficazmente su función fisiológica general tal como la acción reguladora intestinal. También, mejorando las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium que tienen naturalmente un efecto fisiológico específico tal como la acción de erradicación de la bacteria Helicobacter pylori por el método de producción posibilita la utilización de la cepa bacteriana en varios alimentos y bebidas. Esto aumenta la palatabilidad de los alimentos y bebidas que contienen la cepa bacteriana y al mismo tiempo amplía la posibilidad de elección de los consumidores. Además, mejorando la viabilidad de la cepa bacteriana se puede aumentar el efecto fisiológico de la cepa bacteriana.

Además, el alimento y bebida se utilizan preferentemente como alimentos y bebidas fermentadas, leche de soja fermentada, zumo fermentado de fruta, y jugo vegetal fermentado que contiene bacterias vivas que pertenecen al género Bifidobacterium de la presente invención. Entre ellos, se emplean preferentemente los alimentos y bebidas fermentados. Estos alimentos y bebidas de leche fermentada se pueden producir por un método ordinario, y se pueden producir por el método mencionado anteriormente. Los alimentos y bebidas de leche fermentados obtenidos de esta manera se pueden proporcionar también como un producto en forma de cualquier tipo simple sin jarabe (un edulcorante), un tipo suave, un tipo con sabor a fruta, sólido, líquido y similar.

Además, la presente invención se refiere a alimentos y bebidas que contienen al bacteria que pertenece al género Bifidobacterium de la presente invención, particularmente los alimentos y bebidas de leche fermentada que contienen un edulcorante. El tipo, el método de producción, y la forma de los alimentos y bebidas de leche fermentada pueden ser similares a los que se han descrito anteriormente. Es preferible producir alimentos y bebidas de leche fermentada utilizando una combinación de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium de la presente invención y al menos un tipo de bacteria seleccionada de entre las bacterias que pertenecen al género Lactobacillus, bacterias que pertenecen al género Streptococcus, y bacterias que pertenecen al género Lactococcus debido a que se consigue una alta palatabilidad, y facilita la ingestión continua.

Además, para los alimentos y bebidas preparadas utilizando las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium, se ha utilizado principalmente un envase compuesto por un material de envasado impermeable al oxígeno, tal como el cristal y el papel revestido de aluminio con el fin de aumentar la viabilidad de las bacterias durante el almacenamiento. Sin embargo, debido a que la bacteria que pertenece al género Bifidobacterium de la presente invención no necesita una condición anaeróbica estricta debido a su alta viabilidad se pueden utilizar también resinas altamente permeables al oxígeno (tales como poliestireno, polietileno, y tereftalato de polietileno) como material para el envase. Un envase fabricado con tal resina tiene la ventaja del bajo coste y la alta flexibilidad de forma, en comparación con un envase compuesto de un material de envasado impermeable al oxígeno.

Un fragmento de ADN y un cebador de la presente invención tiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°1 o SEC ID N° 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia. El cebador fragmento de ADN de la presente invención se puede obtener realizando un PCR sobre el ADN derivado de numerosas bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium y bacterias relacionando y buscando por medio del método RAPD. Es decir, la PCR se lleva a cabo sobre el ADN derivado de bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium utilizando muchos cebadores aleatorios para amplificar un fragmento de ADN encajado entre los cebadores aleatorios. Basándose en el patrón de la banda RAPD obtenido de esta manera, se realiza la clonación y se determina la secuencia de nucleótidos del producto de amplificación PCR específico de Bifidobacterium breve YIT 12272 (SEC ID N° 3). El cebador fragmento de ADN de la presente invención se diseña basándose en la secuencia de nucleótidos determinadas de esta manera (SEC ID N°s 1 y 2). El cebador fragmento de ADN de la presente invención incluye un fragmento de ADN cebador que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N° 1 o 2.

Para el cebador utilizado en la presente invención, es preferible utilizar una combinación de las secuencias de nucleótidos representadas por las SEC ID N<sup>os</sup> 1 y 2; o una combinación de dos secuencias de nucleótidos complementarias a las secuencias. Además, es preferible utilizar un cebador que tenga la secuencia SEC ID N<sup>o</sup> 1 o una secuencia complementaria a la secuencia como cebador directo y un cebador que tiene una secuencia SEC ID N<sup>o</sup> 2 o una secuencia complementaria a la secuencia como cebador inverso.

El cebador que se utiliza en la presente invención es específico para el Bifidobacterium breve YIT 12272, y es útil para la detección, cuantificación del recuento bacteriano, y la cuantificación del recuento de bacterias viables para el Bifidobacterium breve YIT 12272. Ejemplos de una muestra para el método de detección y cuantificación de la presente invención incluyen alimentos y bebidas, productos farmacéuticos, y heces que contienen YIT 12272.

Ejemplos del método de detección y cuantificación de YIT 12272 incluyen las etapas de (1) extraer el ADN de una muestra, (2) realizar una reacción PCR utilizando el cebador de la presente invención, y (3) detectar el fragmento de ADN amplificado en la etapa (2).

En mayor detalle, primero, se extrae el ADN de las heces, alimentos, bebidas, y similares, como una muestra para la PCR. Como un método de extracción de ADN a partir de una solución diluida de heces y similares, se prefieren el método de Marmur que es el método de referencia, y método enzimático que es el método de Marmur modificado, y el método del cloruro de bencilo. Además, se puede proporcionar una muestra que se obtiene por suspensión de algunas de las células bacterianas en un tampón o agua esterilizada, seguida de tratamiento por calor a 95 °C durante aproximadamente 15 minutos como matriz para la PCR.

Se puede obtener un fragmento de ADN diana (producto de la PCR) llevando a cabo la reacción de amplificación utilizando una combinación del ADN extraído de esta manera y el cebador de la presente invención. En general, cuando se utiliza un cebador en el método de la PCR y similares, se prefiere utilizar un par o dos tipos de cebadores. Por ejemplo, utilizando un grupo cebador de cebadores que tienen las secuencias de nucleótidos de las SEC ID N<sup>os</sup> 1 y 2, solamente se puede amplificar una región encuadrada entre los cebadores en el ADN de Bifidobacterium breve YIT 12272 entre otros numerosos tipos de bacterias que están presentes, de manera que se pueden identificar las bacterias. También cuando se realiza la PCR, es posible también la cuantificación de las bacterias diana sometiendo la matriz de ADN a diluciones seriadas antes de encontrar el límite de detección y luego se lleva a cabo el análisis similar.

El ADN que se obtiene de esta manera se puede someter a electroforesis y se puede identificar el Bifidobacterium breve YIT 12272 basándose en la presencia o ausencia de una banda.

También, se pueden detectar y cuantificar solamente las bacterias vivas de Bifidobacterium breve YIT 12272 realizando una reacción PCR en una muestra después de tratarlas con un colorante permeable a la membrana. Ejemplos de colorante permeable a la membrana que se va a utilizar incluyen monoazida (EMA) y monoazida propidio (PMA), y es particularmente preferible la monoazida propidio (PMA). El tratamiento con colorante permeable a la membrana de una muestra se lleva a cabo, por ejemplo, añadiendo una solución del colorante permeable a la membrana que tiene una concentración final de 5 a 250 μM, seguida por irradiación de luz. La reacción PCR se puede realizar de la misma manera que se ha mencionado anteriormente.

## Ejemplos

De aquí en adelante, el contenido de la presente invención se describirá más detalladamente con Ejemplos.

(Ejemplo 1) Cultivo y mejora de Bifidobacterium breve YIT 10001 y YIT 4125 por el método de subcultivo alterno

Se realizó el cultivo alterno y la concentración de las bacterias, utilizando la cepa Bifidobacterium breve YIT 10001 (FERM BP-8205) y la cepa Bifidobacterium breve YIT 4125 (FERM BP-7813) como cepas parentales.

(1) Tras esterilizar el medio con leche entera en polvo al 20,7% a 135 °C durante 3,5 segundos, se inocularon un 0,5% de iniciador de siembra 1 de la cepa Bifidobacterium breve YIT 10001 o la cepa YIT 4125 y un 1% de iniciador de siembra de Bifidobacterium bifidum y luego se co-cultivaron a 33 °C hasta que el pH alcanzó un 5,3, preparando de esta manera la suspensión bacteriana A1 (400 ml).

(2) Se mezcló la solución de jarabe A en la suspensión bacteriana A1 hasta una concentración final de palatinosa del 10%, de manera que se preparó el producto lácteo A1 (630 ml). El producto lácteo A1 (200 ml) se dispensó en matraces de 300 ml, y a continuación se almacenó a 5 °C durante una semana a la vez que se removía (90 rpm), bajo condiciones aeróbicas con un tapón de algodón (de aquí en adelante, abreviado como almacenamiento aeróbico removiendo). Posteriormente se llenaron tubos de ensayo con el producto lácteo A1 resultante y se cerraron con un tapón de butilo, seguido por almacenamiento estático a 10 °C durante una semana bajo condiciones anaeróbicas (de aquí en adelante, abreviado como almacenamiento anaeróbico estático).

(3) El producto lácteo A1, almacenado bajo las condiciones anteriores se inoculó en 10 ml de un medio lácteo con cefalotina añadida (12% de leche desnatada, 0,1% de extracto de levadura, 0,03% de hidrócloruro de L-

cisteína, 0,2% de carbonato cálcico sedimentario, de aquí en adelante abreviado como medio lácteo), seguido por cultivo anaeróbico a 37 °C durante 24 horas, de manera que se preparó el iniciador madre 2 de Bifidobacterium breve. El iniciador madre 2 (0,03 ml) se inoculó en 30 ml de medio lácteo (12% de leche desnatada, 0,1% de extracto de levadura, 0,03% de hidrocloreto de L-cisteína, 0,2% de carbonato cálcico sedimentario, de aquí en adelante abreviado como medio lácteo), seguido por cultivo anaeróbico a 37 °C durante 24 horas, preparado de esta manera el iniciador de siembra 2 de Bifidobacterium breve. Se repitieron operaciones similares a las anteriores utilizando el iniciador de siembra 2. Es decir, el producto lácteo A2 preparado utilizando el iniciador de siembra 2 se sometió a almacenamiento aeróbico removiendo, seguido por almacenamiento anaeróbico estático, de esta manera se prepararon el iniciador madre 3 de Bifidobacterium breve, y después, el iniciador de siembra 3.

(4) Posteriormente, se esterilizó un medio con leche desnatada al 23,5% a 120 °C durante 3,5 segundos, y se inocularon un 2% de iniciador de siembra 3 de Bifidobacterium breve y un 0,01% de iniciador de siembra de Lactococcus lactis y luego se mezclaron y se co-cultivaron a 37 °C hasta que el pH alcanzó un 4,4, de esta manera se preparó la suspensión bacteriana B1 (100 ml).

(5) Además, se añadió a un medio con leche desnatada al 19,7% que se había esterilizado a 120 °C durante 3,5 segundos, un 0,08% de péptido lácteo, y luego se inoculó un iniciador de siembra de Streptococcus thermophilus y se cultivó a 37 °C hasta que el pH alcanzó un 4,3, de esta manera se preparó la suspensión bacteriana C1 (700 ml). La suspensión bacteriana C1 se añadió a la suspensión bacteriana B1 (con una relación de la mezcla de 1:2), y además, se mezcló la solución de jarabe B hasta un 5% de la concentración final de jarabe de maltosa reducida, se preparó de esta manera el producto lácteo B1 (870 ml).

(6) De manera similar que el producto lácteo A1, el producto lácteo B1 (1 ml) se sometió a almacenamiento aeróbico removiendo, seguido por almacenamiento anaeróbico estático, y luego se inoculó en 10 ml de medio lácteo con cefalotina añadida, seguido por cultivo anaeróbico a 37 °C durante 24 horas para proporcionar el iniciador madre 4 de Bifidobacterium breve. El iniciador madre 4 (0,03 ml) se inoculó en 30 ml de medio lácteo, seguido por cultivo anaeróbico a 37 °C durante 24 horas, de esta manera se preparó el iniciador de siembra 4 de Bifidobacterium breve. Se repitieron operaciones similares a las anteriores utilizando el iniciador de siembra 4, Es decir, el producto lácteo B2 preparado con el iniciador de siembra 4 se sometió a almacenamiento aeróbico removiendo, seguido por almacenamiento anaeróbico estático, de esta manera se prepararon el iniciador madre 5, y después, el iniciador de siembra 5 de Bifidobacterium breve.

Como se muestra anteriormente, la preparación, el almacenamiento aeróbico removiendo, y el almacenamiento anaeróbico estático del producto lácteo A se repitieron dos veces y se concentró el Bifidobacterium breve. Una serie de las etapas anteriores se agruparon en un ciclo, que se repitió durante un total de cuatro ciclos. Finalmente, el producto lácteo A8 y el producto lácteo B8 se sometieron a almacenamiento anaeróbico estático a 10 °C durante dos semanas y luego una parte (1 ml) de cada uno de los productos se aplicaron a un medio de agar propionato TOS (Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.) que contenía 5 µg/ml de cefalotina y se llevó a cabo un cultivo anaeróbico a 37 °C utilizando el Anaero Pack (Mitsubishi gas chemical company, Inc.) para aislar una colonia única. El aislamiento de la colonia única se repitió por purificación, de esta manera se aislaron colonias únicas de un total de 42 colonias derivadas de la cepa Bifidobacterium breve YIT 10001 y la cepa YIT 4125, específicamente un total de 21 cepas del producto lácteo A8 y un total de 21 cepas del producto lácteo B8.

#### (Ejemplo 2) Ensayo de confirmación de la viabilidad

Utilizando la cepa parental y las cepas aisladas, se prepararon los productos lácteos A y B y se almacenaron mientras se removía a 5 °C durante una semana bajo condiciones aeróbicas, seguido por almacenamiento estático a 10 °C durante dos semanas bajo condiciones anaeróbicas según el método del Ejemplo 1. Luego, se seleccionó la cepa de Bifidobacterium breve YIT 12272 (derivada de la cepa YIT 4125, aislada del producto lácteo A8), que mostraba una viabilidad excelente tanto en los productos lácteos A y B.

Los resultados de viabilidad de la cepa YIT 12272 y la cepa control (cepa YIT 10001 y cepa YIT 4125) en los productos lácteos A y B se muestran en la Tabla 3. Con respecto a la cepa YIT 12272, sobrevivieron  $3 \times 10^7$  UFC/ml o más células vivas tras el almacenamiento mientras se removía a 5 °C durante una semana bajo condiciones aeróbicas, seguido por almacenamiento estático a 10 °C durante dos semanas bajo condiciones anaeróbicas en ambos productos lácteos A y B. Por el contrario, en los productos lácteos A y B preparados utilizando cada bacteria de control, sobrevivieron  $3 \times 10^7$  UFC/ml o más células vivas en uno de los productos lácteos; sin embargo, las bacterias control no mostraron una viabilidad excelente en ambos productos.

También, se muestran las propiedades físicas de los productos lácteos A y B en la Tabla 4. Se mezcló el jarabe A en la suspensión bacteriana A para preparar el producto lácteo A, en el que se encontró una acidez de 5,6 y 3,4 respectivamente. Aunque la presión osmótica de la suspensión bacteriana A era de 550 mOsm, se aumentó a 950 mOsm en el producto lácteo A. Entre tanto, la suspensión bacteriana C y el jarabe B se mezclaron en la suspensión bacteriana B para preparar el producto lácteo B, en el que se encontraron un pH y acidez de 4,4 y 7,5, respectivamente. Aunque la presión osmótica de la suspensión bacteriana B era de 900 mOsm, disminuía a 600 mOsm en el producto lácteo B.

Como se ha mostrado anteriormente, se revelaba que la viabilidad de la cepa *Bifidobacterium breve* YIT 12272 estaba aumentada, en comparación con la cepa control, en ambos productos lácteos A y B, que se diferenciaban en la temperatura de cultivo, pH, acidez, un cambio en la presión osmótica debido a la mezcla con el jarabe, un contenido en sólido lácteo no graso, y un contenido de grasa láctea.

5

[Tabla 3]

Recuento de bacterias viable de la cepa <i>Bifidobacterium breve</i> YIT 12272 en los productos lácteos A y B después del almacenamiento		
	Recuento de bacterias viables (UFC/ml)	
	Producto lácteo A	Producto lácteo B
Cepa de ensayo YIT 12272	1,2 x 10 <sup>8</sup>	5,8 x 10 <sup>7</sup>
Cepa control		
Cepa YIT 10001	6,0 x 10 <sup>6</sup>	4,1 x 10 <sup>7</sup>
Cepa YIT 4125	1,0 x 10 <sup>8</sup>	6,0 x 10 <sup>6</sup>

El recuento de bacterias viables se determinó sobre un medio agar propionato TOS que contenía 5 mg/ml de cefalotina tras el almacenamiento mientras se remueve a 5 °C durante una semana bajo condiciones aeróbicas, seguido por almacenamiento estático bajo condiciones anaeróbicas a 10 °C durante dos semanas.

[Tabla 4]

Propiedades físicas de los productos lácteos A y B				
	Producto lácteo A		Producto lácteo B	
	Suspensión bacteriana A	Producto	Suspensión bacteriana B	Producto
Temperatura de cultivo (°C)	33		37	
pH	5,3	5,6	4,4	4,4
Acidez	6,0	3,4	20,7	7,5
Presión osmótica (mOsm)	550	950	900	600
Contenido lácteo no graso (%)	14,5	9,4	22,4	8,9
Contenido en grasa láctea (%)	5,2	3,4	0,2	0,1

La presión osmótica se midió con el Osmostat OM-6040 fabricado por Kyoto Daiichi Kagaku.

10 (Ejemplo 3) Ensayo de confirmación de la resistencia contra el jugo gástrico artificial

Se cultivaron durante una noche la cepa *Bifidobacterium breve* YIT 12272 y la cepa control (cepa YIT 10001 y la cepa YIT 4125) anaeróticamente a 37 °C en el medio lácteo. Luego, se añadieron 0,5 ml del cultivo bacteriano obtenido de esta manera a 10 ml de jugo gástrico artificial que se había calentado a 37 °C durante 30 minutos, se mezclaron inmediatamente, y luego se incubaron a 37 °C. En el minuto 0 y a los 120 minutos tras la incubación (tratamiento con jugo gástrico artificial), se recogió 1 ml de la mezcla y se diluyó apropiadamente, y después de eso se determinó el recuento de bacterias viables utilizando el medio agar propionato TOS ((Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., 37°C, cultivo anaeróbico).

15

20 El jugo gástrico artificial se preparó de la siguiente manera. O sea, se disolvieron las siguientes sustancias en agua de intercambio iónico de forma que la concentración final de cada sustancia era; proteosa peptona ((Becton, Dickinson and Co.): 5 g/l, mucina gástrica (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.): 1,5 g/l, cloruro sódico: 5 g/l, bicarbonato sódico: 3 g/l, y fosfato potásico dihidrogenado: 1 g/l. El pH de la solución resultante se ajustó a 2,8 con ácido clorhídrico 3,6 N, y la solución obtenida de esta manera se esterilizó en autoclave a 115 °C durante 15 minutos, y luego se almacenaron a 4 °C. Posteriormente, se disolvió pepsina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en agua de intercambio iónico a 400 mg/l, y la solución resultante se esterilizó por filtración a través de una membrana (DISMIC-25cs, Advantec, 0,45 µm) para dar una solución de pepsina. El pH de la solución se re-ajustó a 2,8 y se añadieron 20 ml de la solución a 180 ml de la solución preparada anteriormente justo antes de su uso, de esta manera se preparó el jugo gástrico artificial.

25

30

Los recuentos de bacterias viables en el minuto 0 y a los 120 minutos tras el tratamiento con jugo gástrico artificial se muestran en la Tabla 5. Aunque el recuento de bacterias viables de la cepa *Bifidobacterium breve* YIT 12272 apenas había cambiado incluso 120 minutos después del tratamiento con el jugo gástrico artificial, el recuento de bacterias viables de la cepa de control (cepa YIT 10001 y cepa YIT 4125) disminuía con el tratamiento. Se ha revelado que también se había aumentado la resistencia de la cepa YIT 12272 contra el jugo gástrico artificial, al compararse con la cepa control.

35

[Tabla 5]

Resistencia de la cepa <u>Bifidobacterium breve</u> YIT 12272 contra el jugo gástrico artificial		
	Recuento de bacterias viables (UFC/ml)	
	Minuto 0 tras el tratamiento con jugo gástrico artificial	120 minutos después del tratamiento con ácido gástrico artificial
Cepa de ensayo YIT 12272	2,4 x 10 <sup>8</sup>	2,1 x 10 <sup>8</sup>
Cepa control		
Cepa YIT 10001	3,0 x 10 <sup>8</sup>	1,7 x 10 <sup>5</sup>
Cepa YIT 4125	3,9 x 10 <sup>8</sup>	3,0 x 10 <sup>7</sup>

(Ejemplo 4) Ensayo de confirmación de la resistencia al tratamiento secuencial con jugo gástrico artificial/ bilis artificial y fluido intestinal

5 Utilizando la cepa Bifidobacterium breve YIT 12272 y la cepa de control (cepa YIT 10001 y cepa YIT 4125), se preparó el producto lácteo B de manera similar al Ejemplo 1. Los productos lácteos B (200 ml) que se prepararon utilizando cada cepa bacteriana se dispensaron cada uno en matraces de 300 ml, seguido por almacenamiento a 5 °C durante una semana mientras se removía (90 rpm) bajo condiciones aeróbicas con un tapón de algodón. 10 Posteriormente, se llenaron tubos de ensayo con los resultantes productos lácteos B, seguido por almacenamiento estático a 10 °C bajo condiciones anaeróbicas con un tapón de butilo. Se tiene que señalar que solamente la fase gaseosa del matraz de 300 ml que contenía el producto B preparado utilizando la cepa YIT 4125 se sustituyó con nitrógeno gaseoso, y luego el producto resultante se almacenó a 5 °C durante una semana mientras se removía (90 rpm) bajo condiciones aeróbicas con un tapón de butilo, seguido por almacenamiento estático a 10 °C bajo 15 condiciones anaeróbicas.

De manera similar al método del Ejemplo 3, se realizó el tratamiento con el jugo gástrico artificial añadiendo 0,5 ml del producto lácteo B que se había sometido a almacenamiento estático a 10 ° durante cuatro días a 10 ml de jugo gástrico artificial con un pH ajustado a 3,3, seguido por incubación a 37 °C durante 60 minutos. A 2 ml de la solución de ensayo obtenida de esta manera, se le añadió 1 ml de bilis artificial que se había calentado previamente a 37 °C, seguido inmediatamente por removido. Posteriormente, a la mezcla así obtenida, se le añadió una mezcla de 5 ml compuesta de 4 ml de fluido intestinal artificial y 1 ml de fluido pancreático artificial, que se había calentado a 37 °C durante 30 minutos, y la mezcla resultante se removió y se incubó a 37 °C. Luego el minuto 0 y a los 60 minutos después del tratamiento con el jugo gástrico artificial y 60 minutos después del tratamiento con bilis y fluido intestinal artificiales, se recolectó 1 ml de la mezcla resultante en cada momento, y se diluyó apropiadamente, y se determinó el recuento de bacterias viables utilizando medio agar propionato TOS (Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., 37 °C, cultivo anaeróbico). 20 25

La bilis artificial se preparó disolviendo bilis en polvo (Oxgall, Difco) en agua de intercambio iónico a 40 g/l y ajustando el pH de la solución resultante a 8,0 con carbonato sódico 3 M, y luego diluyendo la solución resultante con agua de intercambio iónico de forma que la concentración de bilis en polvo era del 1% (P/V), seguido por esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se utilizó la bilis artificial preparada de esta manera. También, se preparó el fluido intestinal artificial disolviendo las siguientes sustancias en agua de intercambio iónico de forma que la concentración final de cada sustancia era; cloruro sódico: 5 g/l, cloruro potásico; 1 g/l, y bicarbonato sódico: 3 g/l, y ajustando el pH de la solución resultante a 8,0 con carbonato sódico 3 M, seguido por esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El fluido pancreático artificial se preparó disolviendo lipasa pancreática (MP Biomedicals) en el fluido intestinal artificial a 20 g/l inmediatamente antes del ensayo, y la solución resultante se esterilizó por filtración a través de un filtro de membrana (DISMIC-25cs, Advantec 0,45 µm), seguido por almacenamiento en hielo. Se utilizó el fluido pancreático preparado de esta manera. 30 35 40

El recuento de bacterias viables en el minuto 0 y 60 minutos después del tratamiento con jugo gástrico artificial, y 60 minutos después del tratamiento con bilis artificial y fluido intestinal se muestran en la Tabla 6. El recuento de bacterias viables de la cepa de Bifidobacterium breve YIT 12272 en el producto lácteo B almacenado era mayor que el de la cepa control (cepa de Bifidobacterium breve YIT 10001 y cepa YIT 4125= no solo tras el tratamiento con el jugo gástrico artificial sino también tras el tratamiento secuencial con jugo gástrico artificial y fluido intestinal que contenía bilis artificial. Esto revelaba que la cepa YIT 12272 tenía más aumentadas ambas resistencias al jugo gástrico artificial y al fluido intestinal/bilis artificial que las bacterias control. 45

[Tabla 6]

Resistencia de la cepa <u>Bifidobacterium breve</u> YIT 12272 en el producto lácteo B contra el tratamiento secuencial con jugo gástrico artificial/bilis artificial y fluido intestinal tras el almacenamiento			
	Recuento de bacterias viables (UFC/ml)		
	Minuto 0 tras el tratamiento con jugo gástrico artificial	60 minutos tras el tratamiento con jugo gástrico artificial	60 minutos tras el tratamiento con bilis artificial y fluido intestinal
Cepa de ensayo Cepa YIT 12272	$6,9 \times 10^7$	$2,8 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$
Cepa Control Cepa YIT 10001 Cepa YIT 4125	$4,9 \times 10^7$ $8,1 \times 10^7$	$3,2 \times 10^4$ $2,6 \times 10^5$	$5,3 \times 10^2$ $3,1 \times 10^3$

El producto lácteo B se almacenó mientras se agitaba a 5 °C durante una semana bajo condiciones aeróbicas (solo la cepa YIT 4125 strain se almacenó bajo condiciones anaeróbicas), seguido por el almacenaje durante cuatro días a 10 °C bajo condiciones anaeróbicas, y luego se trataron con jugo gástrico artificial (pH 3,3) y secuencialmente con bilis artificial (1% de bilis en polvo). El recuento de bacterias viables se enumeró en el producto lácteo B que se obtuvo de esta manera.

## (Ejemplo 5) Producción de alimentos y bebidas de leche fermentada

- 5 En 506 g de agua, se disolvieron 124 g de leche entera en polvo, seguido por esterilización a 135 °C durante 3 segundos. Posteriormente, se inocularon la cepa Bifidobacterium breve YIT 12272 al 0,5%, Bifidobacterium bifidum al 1%, y Lactobacillus acidophilus al 0,001% y se cultivaron a 33 °C hasta que el pH alcanzó 5,3. La mezcla resultante se homogenizó a 15 MPa para dar 630 g de una suspensión bacteriana. Entre tanto, se disolvieron en agua 98 g de palatinosa, 8 g de zumo de zanahoria, 2,5 g de aceite que contenía DHA, 7 g de calcio emulsionado, 10 0,1 g de lactoferrina, 0,02 de vitamina D, y 1 g de saborizante, y se añadió agua hasta un volumen total de 370 g. La mezcla resultante se esterilizó a 120 °C durante tres segundos para dar una solución de jarabe. La suspensión bacteriana y la solución de jarabe se mezclaron y luego se vertieron en un envase tetra brick, de manera que se obtuvo un producto de leche fermentada que tenía: pH 5,6; acidez de 3,4; contenido en sólidos lácteos no grasos del 15 8,7%; y contenido en grasa láctea del 3,2% (el recuento bacteriano inicial de la cepa de Bifidobacterium breve YIT 12272 era de  $9,5 \times 10^5$  UFC/ml).

El producto de leche fermentada obtenido de esta manera se almacenó a 10 °C durante 14 días, en el que se encontró una tasa de supervivencia de la cepa Bifidobacterium breve YIT 12272 del 30%. También, el producto de leche fermentada así obtenido tenía un sabor excelente.

20

## (Ejemplo 6) Producción de alimentos y bebidas de leche fermentada

- 25 En 90 g de agua, se disolvieron 25 g de leche desnatada en polvo, seguido por esterilización a 120 °C durante 3,5 segundos. Posteriormente se inocularon la cepa Bifidobacterium breve YIT 12272 al 2% y Lactococcus lactis al 0,01% y se cultivaron a 37 °C hasta que el pH alcanzaba un 4,4. La mezcla resultante se homogenizó a 15 MPa para dar 115 g de suspensión bacteriana A. También se disolvieron 60 g de leche desnatada en polvo y 0,25 g de péptido lácteo en agua, y se añadió agua hasta un volumen total de 330 g. La mezcla resultante se esterilizó a 120 °C durante 3,5 segundos, y luego se inoculó Streptococcus thermophilus al 0,5%. Las bacterias se cultivaron a 37 °C hasta que el pH alcanzó 4,3, y luego se homogenizó la mezcla resultante a 15 MPa para dar 330 g de suspensión bacteriana B. Mientras tanto, se disolvieron en agua 47 g de maltitol, 29 g de povidex, 14 g de jarabe de 30 galactooligosacáridos, 3,5 g de hierro emulsionado, 3 g de pectina, 1 g. de péptido colágeno, 0,3 g de mezcla de vitamina B, y 0,1 g de aspartamo, se añadieron además 1 g de saborizante y 1 g de aceite de vitamina E, y luego se añadió agua hasta un volumen total de 555 g. La mezcla resultante se esterilizó a 120 °C durante 3 segundos para dar la solución de jarabe. Las suspensiones A y B y la solución de jarabe se mezclaron y luego se depositaron en un 35 envase tetra brick, de forma que se obtuvo un producto de leche fermentada que tenía: un pH de 4,4; acidez de 7,5; contenido en sólidos lácteos no grasos del 8,1%; y contenido en grasa láctea del 0,1% (el recuento bacteriano inicial de la cepa Bifidobacterium breve YIT 12272 era de  $8,8 \times 10^8$  UFC/ml).

- 40 El producto de leche fermentada obtenido de esta manera se almacenó a 10 °C durante 16 días, en el que se encontró una tasa de supervivencia de la cepa Bifidobacterium breve YIT 12272 que era de 34%. También el producto de leche fermentada que se obtuvo así tenía un sabor excelente.

(Ejemplo 7) Producción de alimentos y bebidas de leche fermentada

En 198 g de agua, se disolvieron 58 g de leche desnatada en polvo, seguido por esterilización a 120 °C durante 3,5 segundos. Posteriormente se inocularon la cepa Bifidobacterium breve YIT 12272 al 1%, Lactococcus lactis al 0,2%, y Streptococcus thermophilus al 0,01% y se cultivaron a 37 °C hasta que el pH alcanzaba el 4,5. La mezcla resultante se homogenizó a 15 MPa para dar 256 g de suspensión bacteriana. Mientras tanto, se disolvieron en agua 25 mg de jarabe de galactooligosacáridos, 16 g de lactitol, 16 g de palatinosa, 3 g de pectina, y 0,05 g de sucralosa, y se añadieron además 1 g de saborizante y agua hasta un volumen total de 744 g. La mezcla resultante se esterilizó entonces a 120 °C durante tres segundos para dar la solución de jarabe. La suspensión bacteriana y la solución de jarabe se mezclaron y luego se depositaron en un tetra brick, donde se obtuvo una bebida de elche fermentada que tenía; pH de 4,4; acidez de 5,3; contenido en sólidos lácteos no grasos del 5,5%; y contenido en grasa láctea del 0,1% (el recuento bacteriano inicial de la cepa Bifidobacterium breve YIT 12272 era de  $1,3 \times 10^9$  UFC/ml).

La bebida de leche fermentada obtenida de esta manera se almacenó a 10 °C durante 23 días. Como resultado, se encontró que la tasa de supervivencia de la cepa Bifidobacterium breve YIT 12272 era del 41%. También la bebida de leche fermentada así obtenida tenía un sabor excelente.

(Ejemplo 8) Producción de alimentos y bebidas de leche fermentada

Se disolvieron 58 g de leche en polvo entera, 42 g de leche desnatada y 0,02 g de péptido lácteo en 487 g de agua, seguido por esterilización a 135 °C durante tres segundos. En la mezcla resultante se inocularon los iniciadores de la cepa Bifidobacterium breve YIT 12272 y Lactobacillus acidophilus al 0,5% y 1,0% respectivamente. La mezcla resultante se cultivó entonces a 33 °C hasta que el pH alcanzó 5,3, y luego se homogenizó a 15 MPa para dar 587 g de una suspensión bacteriana.

Mientras tanto, se disolvieron en agua 98 g de palatinosa, 8 g de zumo de zanahoria, y un g de saborizante, y se añadió más agua a un volumen total de 413 g. La mezcla resultante se esterilizó a 120 °C durante 3 segundos para dar la solución de jarabe.

La suspensión bacteriana y la solución de jarabe se mezclaron y se depositaron en un envase tetra brick, donde se obtuvo un producto de leche fermentada que tenía: un pH de 5,6; acidez de 2,9; contenidos lácteos no grasos del 8,1%; y contenido en grasa láctea del 1,4% (el recuento inicial de la cepa Bifidobacterium breve YIT 12272 era de  $9,5 \times 10^8$  UFC/ml).

El producto de leche fermentada obtenido de esta manera se almacenó a 10 °C durante 14 días, y se encontró que la tasa de supervivencia de la cepa Bifidobacterium breve YIT 12272 era del 30%. También el producto de leche fermentada así obtenido tenía un sabor excelente.

(Ejemplo 9) Producción de comprimidos

Cada uno de los ingredientes que se muestran a continuación se mezcló de acuerdo con la siguiente formulación, y la mezcla resultante se sometió a granulación, secado y ajuste del tamaño del gránulo, seguido por compresión, de manera que se produjeron los comprimidos.

(Formulación)	(mg)
Célula bacteriana desecada de la presente invención <sup>1)</sup>	20
Celulosa microcristalina	100
Lactosa	80
Estearato magnésico	0,5
Metilcelulosa	12
1) Producida por liofilización de la célula bacteriana viva de la cepa <u>Bifidobacterium breve</u> YIT 12272	

(Ejemplo 10) Producción de refrescos

Cada uno de los ingredientes mostrados a continuación se mezclaron de acuerdo con un método ordinario basado en la siguiente formulación. La mezcla resultante se homogenizó para dar refrescos. Los refrescos obtenidos de esa manera se depositaron en botellas marrones y se sellaron con un tapón de aluminio, seguido por un tratamiento de calor. Los refrescos así obtenidos eran favorables tanto en apariencia externa como en sabor, y también tienen una buena estabilidad de almacenamiento.

(Formulación)	(mg)
Célula bacteriana desecada de la presente invención <sup>1)</sup>	5
Saborizante	0,8
Agua	100
Almidón reducido en sacáridos	0,5
Fructosa	12

1) Producida por liofilización de la célula bacteriana viva de la cepa Bifidobacterium breve YIT 12272

(Ejemplo 11) Producción de un cebador específico de cepa bacteriana por el método de ADN polimórfico amplificado aleatorio (RAPD)

5 Se extrajo el ADN de la célula bacteriana utilizando 62 cepas de bacterias que pertenecen a Bifidobacterium breve y se aplicó el método RAPD realizando una PCR de acuerdo con el siguiente procedimiento para buscar una secuencia de nucleótidos específica de YIT 12272.

10 (1) Extracción de ADN a partir de la célula bacteriana

15 Se cultivaron sesenta y dos cepas que pertenecen a Bifidobacterium breve (Bifidobacterium breve YIT 4014<sup>T</sup>, YIT 4015, YIT 4023, YIT 4024, YIT 4043, YIT 4049, YIT 4063, YIT 4064, YIT 12272, y otras 53 cepas) utilizando medio GAM (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) suplementado con un 1% de glucosa, durante 24 horas a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas. La suspensión bacteriana (0,5 ml) se centrifugó, se retiró el sobrenadante, y se añadieron 0,25 ml de un tampón de extracción de ADN (Tris-HCl 100 mM, EDTA 40 mM, pH 9,0), 0,05 ml de SDS al 10%, 0,5 ml de fenol saturado de TE, y 0,7 g de perlas de cristal (de 0,1 mm de diámetro). La mezcla se agitó vigorosamente para destruir las células bacterianas. Luego, se añadieron 0,15 ml de acetato sódico 3 M y la mezcla se centrifugó, y el sobrenadante se transfirió a toros tubos. Tras precipitación con isopropanol y lavado con etanol al 70%, el producto así obtenido se secó al aire y por último se disolvió en 0,1 ml de un tampón TE (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM).

(2) Método RAPD

25 El método RAPD se llevó a cabo utilizando 27 tipos de cebadores aleatorios (Tabla 7). Un líquido de reacción tenía un volumen total de 20 µl que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 200 µM de mezcla dNTP, 1,5 µM de cebador aleatorio, 1,5 U de Taq ADN polimerasa (producto de Takara Bio Inc.), y 10 ng de matriz de ADN. Las reacciones PCR se llevaron a cabo utilizando el ciclador térmico de ADN PTC200 (MJ Research, Inc.), en el que la reacción PCR incluía las siguientes etapas; 94 °C durante 120 segundos, seis ciclos de (94 °C durante 120 segundos, 36 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 90 segundos), 30 ciclos de (94 °C durante 20 segundos, 36 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 90 segundos), y 72 °C durante 180 segundos. El producto de amplificación obtenido así se sometió a electroforesis a 50 V en un gel de agarosa al 1,5%. Luego, el gel se tiñó con bromuro de etidio para confirmación bajo radiación UV.

35 [Tabla 7]

Secuencia de un cebador aleatorio para el método RAPD			
Nombre de cebador	Secuencia (5'... 3')	Nombre de cebador	Secuencia (5'... 3')
p1001	GTGAAGTAGG(SEC ID N° (4))	p1251	AAGACTGTCC(SEC ID N° (18))
p1002	CAATAGCCGT(SEC ID N° (5))	p1252	GCGGAAATAG(SEC ID N° (19))
p1003	CAGTACCCAC(SEC ID N° (6))	p1254	CCGCAGCCAA(SEC ID N° (20))
p1004	AGGTAACCGT(SEC ID N° (7))	p1255	CCGATCTAGA(SEC ID N° (21))
p1005	CAGTACCTTC(SEC ID N° (8))	p1280	GAGGACAAAG(SEC ID N° (22))
p1006	GGTTAAAGCC(SEC ID N° (9))	p1281	AACGCGCAAC(SEC ID N° (23))
p1007	TCGACGATAG(SEC ID N° (10))	p1282	GACGACTATC(SEC ID N° (24))
p1008	AGCCAACGAA(SEC ID N° (11))	p1284	GTCAACGAAG(SEC ID N° (25))
p1009	GTTGCGGTCC(SEC ID N° (12))	p1285	AGCCAGTTTC(SEC ID N° (26))
p1010	TGCGACTTAC(SEC ID N° (13))	p1287	CGCATAGGTT(SEC ID N° (27))
p1011	GTAGACAAGC(SEC ID N° (14))	p1288	GGGGTTGACC(SEC ID N° (28))
p1248	TGCCGAATTC(SEC ID N° (15))	p1289	ACTTGCATCC(SEC ID N° (29))
p1249	CGAACTAGAC(SEC ID N° (16))	p1292	CCCGTCAGCA(SEC ID N° (30))
p1250	GGCTTAACAC(SEC ID N° (17))		



(3) Clonación

5 Comparando los patrones de banda RAPD de 62 cepas de las bacterias que pertenecen a *Bifidobacterium breve*, se clonó un producto de amplificación PCR que se encontró que era específico de YIT 12272 utilizando el kit de clonación TA (producto de Invitrogen Corporation) según con el manual adjunto. Es decir, el producto de amplificación PCR se insertó en un vector pCR2.1 y se introdujo en *Escherichia coli* para su transformación. A continuación, la *E. coli* transformada se inoculó en un medio agar Luria Bertani (LB) que contenía X-gal y 50 µg/ml de ampicilina y se cultivó. Luego, las bacterias formadoras de colonias blancas que se obtuvieron así se hicieron proliferar en el medio líquido LB, y a partir de esta se extrajo el ADN para obtener el ADN clonado. Según el método de referencia, la secuencia de nucleótidos del ADN del producto de amplificación PCR se determinó por un método de terminador colorante (FIG. 1).

15 (4) Producción de un cebador específico de cepa bacteriana y confirmación de su especificidad

Entre las secuencias de nucleótidos de ADN del producto de amplificación PCR específicas de YIT 12272 que se obtuvieron por clonación, se seleccionó una secuencia que era la más específica de YIT 12272 y tenía una alta reactividad PCR para producir un cebador específico de YIT 12272. La secuencia del cebador se ha mostrado en la Tabla 8. Utilizando este cebador específico de YIT 12272, se llevó a cabo la PCR sobre el ADN extraído de un total de 144 cepas bacterianas incluyendo las 62 cepas bacterianas de las bacterias que pertenecen a *Bifidobacterium breve* YIT 12272 y 82 especies de 78 especies y 12 géneros de bacterias que se aíslan frecuentemente del tracto intestinal humano (Tabla 9) para confirmar la especificidad. Utilizando un mezcla de reacción que tenía un volumen total de 20 µl que contenía 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de mezcla dNTP, 0,3 µM de cebador, 0,5 U de Taq ADN polimerasa, y 10 ng de matriz ADN, se llevaron a cabo las reacciones PCR, en las que la reacción PCR incluía las siguientes etapas; 94 °C durante 120 segundos, 32 ciclos de (94 °C durante 20 segundos, 60 °C durante 10 segundos, y 72 °C durante 20 segundos), y 72 °C durante 180 segundos. El producto de amplificación obtenido de esta manera se sometió a electroforesis a 100 V sobre gel de agarosa al 1,5%. Luego, se tiñó el gel con bromuro de etidio para confirmación bajo radiación UV. Como resultado, el cebador específico de YIT 12272 así producido se confirmó específico para *Bifidobacterium breve* YIT 12272.

[Tabla 8]

Secuencia del cebador específico de YIT 12272 (pBbrY)			
SEQ ID NO	Organismo diana	Nombre del cebador	Secuencia (5'...3')
1	<i>B. breve</i> YIT 12272	pBbrY-F	ATGGCAAACCG GGCTGAA
2		pBbrY-R	GCG GAT GAG AGG TGG G

[Tabla 9]

Cepa bacteriana utilizada

<i>Bacteroides</i> spp.	<i>Bacteroides distasonis</i> YIT 6162 <sup>†</sup> , <i>B. fragilis</i> YIT 6158 <sup>†</sup> , <i>B. ovatus</i> YIT 6161 <sup>†</sup> , <i>B. thetatoaomicron</i> YIT 6163 <sup>†</sup> , <i>B. uniformis</i> YIT 6184 <sup>†</sup> , <i>B. vulgatus</i> YIT 6159 <sup>†</sup>
<i>Bifidobacterium</i> spp.(Excepto <i>breve</i> )	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> YIT 4011 <sup>†</sup> , <i>B. angulatum</i> YIT 4012 <sup>†</sup> , <i>B. animalis</i> subesp. <i>animalis</i> YIT 4044 <sup>†</sup> , <i>B. animalis</i> subesp. <i>lactis</i> YIT 4121 <sup>†</sup> , <i>B. asteroides</i> YIT 4033 <sup>†</sup> , <i>B. bifidum</i> YIT 4039 <sup>†</sup> , <i>B. boum</i> YIT 4091 <sup>†</sup> , <i>B. catenulatum</i> YIT 4016 <sup>†</sup> , <i>B. choerinum</i> YIT 4067 <sup>†</sup> , <i>B. coryneforme</i> YIT 4092 <sup>†</sup> , <i>B. cunicuti</i> YIT 4093 <sup>†</sup> , <i>B. dentium</i> YIT 4017 <sup>†</sup> , <i>B. gallicum</i> YIT 4085 <sup>†</sup> , <i>B. gallinarum</i> YIT 4094 <sup>†</sup> , <i>B. indicum</i> YIT 4083 <sup>†</sup> , <i>B. longum</i> subesp. <i>infantis</i> YIT 4018 <sup>†</sup> , <i>B. longum</i> subesp. <i>longum</i> YIT 4021 <sup>†</sup> , <i>B. longum</i> subesp. <i>suis</i> YIT 4082 <sup>†</sup> , <i>B. magnum</i> YIT 4098 <sup>†</sup> , <i>B. merycicum</i> YIT 4095 <sup>†</sup> , <i>B. minimum</i> YIT 4097 <sup>†</sup> , <i>B. pseudocatenulatum</i> YIT 4072 <sup>†</sup> , <i>B. pseudolongum</i> subesp. <i>globosum</i> YIT 4101 <sup>†</sup> , <i>B. pseudolongum</i> subesp. <i>pseudolongum</i> YIT 4102 <sup>†</sup> , <i>B. pullonum</i> YIT 4104 <sup>†</sup> , <i>B. ruminantium</i> YIT 4105 <sup>†</sup> , <i>B. saeculare</i> YIT 4111 <sup>†</sup> , <i>B. subtile</i> YIT 4116 <sup>†</sup> , <i>B. thermophilum</i> YIT 4073 <sup>†</sup>
<i>Clostridium</i> spp.	<i>Clostridium celatum</i> YIT 6056 <sup>†</sup> , <i>C. perfringens</i> YIT 6050 <sup>†</sup>
<i>C. aerofaciens</i>	<i>Collinsella aerofaciens</i> YIT 10235 <sup>†</sup>
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i> YIT 2031 <sup>†</sup> , <i>E. faecium</i> YIT 2032 <sup>†</sup>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> YIT 6044 <sup>†</sup>
<i>Eubacterium</i> spp.	<i>Eubacterium bifforme</i> YIT 6076 <sup>†</sup> , <i>E. rectate</i> YIT 6082 <sup>†</sup>

## Cepa bacteriana utilizada

<u>Lactobacillus</u> spp.	<u>Lactobacillus acidophilus</u> YIT 0070 <sup>†</sup> , <u>L. amylophilus</u> YIT 0255 <sup>†</sup> , <u>L. amylovorus</u> YIT 0211 <sup>†</sup> , <u>L. bifementans</u> YIT 0260 <sup>†</sup> , <u>L. brevis</u> YIT 0076 <sup>†</sup> , <u>L. buchneri</u> YIT 0077 <sup>†</sup> , <u>L. casei</u> YIT 0180 <sup>†</sup> , YIT 9029, <u>L. coryniformis</u> subesp. <u>coryniformis</u> YIT 0237 <sup>†</sup> , <u>L. crispatus</u> YIT 0212 <sup>†</sup> , <u>L. delbrueckii</u> subesp. <u>delbrueckii</u> YIT 0080 <sup>†</sup> , <u>L. delbrueckii</u> subesp. <u>lactis</u> YIT 0086 <sup>†</sup> , <u>L. delbrueckii</u> subesp. <u>bulgaricus</u> YIT 0181 <sup>†</sup> , <u>L. fermentum</u> YIT 0081 <sup>†</sup> , <u>L. gallinarum</u> YIT 0218 <sup>†</sup> , <u>L. gasserii</u> YIT 0192 <sup>†</sup> , <u>L. helveticus</u> YIT 0083 <sup>†</sup> , <u>L. johnsonii</u> YIT 0219 <sup>†</sup> , <u>L. malefermentans</u> YIT 0271 <sup>†</sup> , <u>L. gris</u> YIT 0277 <sup>†</sup> , <u>L. parabuchneri</u> YIT 0272 <sup>†</sup> , <u>L. paraplantarum</u> YIT 0445 <sup>†</sup> , <u>L. pentosus</u> YIT 0238 <sup>†</sup> , <u>L. plantarum</u> YIT 0102 <sup>†</sup> , <u>L. pontis</u> YIT 0273 <sup>†</sup> , <u>L. reuteri</u> YIT 0197 <sup>†</sup> , <u>L. rhamnosus</u> YIT 0105 <sup>†</sup> , <u>L. sakei</u> YIT 0247 <sup>†</sup> , <u>L. salivarius</u> subesp. <u>salivarius</u> YIT 0104 <sup>†</sup> , <u>L. sharpeae</u> YIT 0274 <sup>†</sup> , <u>L. vaginalis</u> YIT 0276 <sup>†</sup> , <u>L. zeae</u> YIT 0078 <sup>†</sup>
<u>Lactococcus</u> spp.	<u>Lactococcus garviae</u> YIT 2071 <sup>†</sup> , <u>L. lactis</u> subesp. <u>cremoris</u> YIT 2007 <sup>†</sup> , <u>L. lactis</u> subesp. <u>lactis</u> YIT 2008 <sup>†</sup> , <u>L. lactis</u> subesp. <u>hordinae</u> YIT 2060 <sup>†</sup> , <u>L. plantarum</u> YIT 2061 <sup>†</sup> , <u>L. raffinolactis</u> YIT 2062 <sup>†</sup>
<u>Propionibacterium</u>	<u>Propionibacterium acnes</u> YIT 6165 <sup>†</sup>
<u>Ruminococcus</u> spp.	<u>Ruminococcus bromii</u> YIT 6078 <sup>†</sup> , <u>R. lactaris</u> YIT 6084 <sup>†</sup> , <u>R. productus</u> YIT 6141 <sup>†</sup>
<u>Streptococcus</u> spp.	<u>Streptococcus thermophilus</u> YIT 2001, YIT 2021, YIT 2037 <sup>†</sup>

(Ejemplo 12) Detección de YIT 12272 vivos por el método PCR (1) Optimización de un colorante permeable a la membrana

- 5 Se utilizaron monoazida de etidio (EMA) y monoazida de propidio (PMA), que son colorantes permeables a la membrana para Bifidobacterium breve YIT 12272. Utilizando un medio con GAM + 1% de glucosa, se añadió a cada de YIT 12272 sin tratar que se habían cultivado durante 24 horas a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas (bacterias vivas), células muertas de las mismas obtenidas calentando las bacterias a 80 °C durante 10 minutos, o células muertas obtenidas por cultivo continuo de las bacterias durante 10 días a 37 °C el colorante a concentraciones
- 10 finales de EMA y PMA de 240 µM y 50 µM, respectivamente. Tras mantenerlas calientes a temperatura ambiente durante cinco minutos, las bacterias se radiaron con luz durante 2 minutos utilizando dos lámparas halógenas de 500 W a una distancia de 20 cm de la lámpara. Posteriormente, se extrajo el ADN de cada una de las células bacterianas, y se cuantificó el YIT 12272 por PCR cuantitativa utilizando el cebador específico de YIT 12272. (se utilizó como método PCR cuantitativo, el método descrito en International Journal of Food Microbiology (2008) Vol.
- 15 126, p. 210 a 215). Como resultado, aunque ambos EMA y PMA inhibían la amplificación en las células bacterianas muertas, EMA también inhibía la amplificación PCR en las bacterias vivas. Basándose en que el PMA inhibía la amplificación en bacterias muertas sin inhibir la amplificación en YIT 12272 vivos, se encontró que el PMA era adecuado para la detección y cuantificación de YIT 12272 vivos por PCR cuantitativa. [FIG. 2].
- 20 Con el fin de optimizar el tratamiento con PMA, se llevó a cabo la PCR utilizando el cebador específico de YIT 12272, y las bacterias vivas y células bacterianas destruidas por calor de YIT 12272 que se trataron con varias concentraciones de PMA (5 µM, 50 µM, y 150 µM) y tiempo de radiación lumínica (uno, dos y cinco minutos). Como resultado, se encontró que el tiempo de radiación lumínica no afectaba al tratamiento con PMA, y que el tratamiento con bajas concentraciones (5 µM) y altas concentraciones (150 µM) de PMA mostraba un efecto inhibitor más débil
- 25 sobre la amplificación PCR en las bacterias destruidas por calor, al compararse con el tratamiento con 50 µM de PMA (FIG. 3). En consecuencia, se encontró que el tratamiento con 50 µM de PMA y dos minutos de radiación lumínica era adecuado para aplicarse como tratamiento con PMA en YIT 12272.

(2) Detección y cuantificación de YIT 12272 vivo en heces

- 30 Se prepararon heces en las que se había confirmado la ausencia de YIT 12272 por medio selectivo y PCR cuantitativa utilizando el cebador específico de YIT 12272. Se añadieron en las heces células bacterianas destruidas por calor de YIT 12272, seguido por tratamiento con PMA (50 µM de PMA y dos minutos de radiación lumínica). Como resultado se encontró que se inhibía la amplificación PCR en las células bacterianas de YIT 12272 destruidas
- 35 por calor en las heces, y el valor cuantitativo de bacterias muertas de YIT 12272 disminuía a aproximadamente una veintena milésimas (FIG. 4). Por el contrario, se añadieron a las heces YIT 12272 vivos que se habían cultivado durante 24 horas y se llevó a cabo el tratamiento con PMA, y se cuantificaron los YIT 12272 por PCR cuantitativa utilizando el cebador específico para YIT 12272. Como resultado, el tratamiento con PMA no inhibió la amplificación por PCR en los YIT 12272 viables, con el resultado de que, cuando el YIT 12272 está presente en una cantidad de
- 40 10<sup>5</sup> o más por gramo de heces, los YIT 12272 viables se podían cuantificar con precisión (FIG. 5). En este caso, el recuento de bacterias viables de YIT 12272 se puede calcular por la fórmula 3 siguiente.

(Símbolo)

Valor cuantitativo de PCR de YIT 12272 sin tratamiento PMA: X células/g  
 Valor cuantitativo de PCR de YIT 12272 sometidos a tratamiento PMA: Y células/g  
 El recuento de bacterias viables de YIT 12272 en una muestra: L células/g  
 Es recuento de bacterias muertas de YIT 12272 en una muestra: D células/g

**Fórmula 1:  $X = L + D$**

**Fórmula 2:  $Y = L + D/20000$**

**Fórmula 3 (La fórmula 3 se deriva de las fórmulas 1 y 2):  $L = (20000 Y - X) / 19999$**

Se utilizó el siguiente método para la extracción del ADN de las heces. Utilizando una solución de dilución anaeróbica (Tabla 10), se preparó una solución diluida 10 veces. Luego se centrifugaron 0,2 ml de la solución y se retiró el sobrenadante, seguido por re-suspensión en 1,0 ml de tampón PBS. Se repitió la operación de lavado anterior tres veces. Posteriormente, el aglomerado de heces obtenido de esta manera se almacenó a -80 °C hasta la extracción del ácido nucleico. Se descongeló el aglomerado liofilizado de heces, y se le añadieron 0,6 ml de un tampón ASL (QIAGEN), seguido por calentamiento a 70 °C durante cinco minutos. Posteriormente, se añadieron 0,5 ml de fenol saturado de TE y 0,7 g de perlas de cristal con un diámetro de 0,1 mm, y la mezcla resultante se agitó vigorosamente a 6,5 m/s durante 30 segundos utilizando el FastPrep FP120 (Bio101, Inc.). Luego se añadieron 0,1 ml de acetato sódico 3 M y se obtuvo el sobrenadante por centrifugación. En 0,7 ml de sobrenadante se añadieron 0,7 ml de un tampón ASL y comprimidos Ex de Inhibición (QIAGEN). La mezcla resultante se mezcló completamente y se centrifugó para obtener el sobrenadante. A 0,55 ml del sobrenadante se le añadieron 0,55 ml de tampón AL (QIAGEN) y 0,55 ml de etanol al 100%, a continuación se removió. Posteriormente, toda la mezcla resultante se pasó a través de una columna spin QIAmp (QIAGEN) para permitir que el ADN se adsorba a la columna. Tras lavar la columna, se añadieron 0,1 ml de un tampón AE (QIAGEN) y la solución resultante se centrifugó, recolectando de esta manera el ADN.

[Tabla 10]

Composición de la solución de dilución anaeróbica

Componente	composición (g/l)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,225
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,225
NaCl	0,45
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,225
CaCl <sub>2</sub>	0,0225
MgSO <sub>4</sub>	0,0225
Hidrocloreto de L-Cisteína monohidrato	0,5
Resazurin	0,001
Bacto agar	0,5
Tween 80	0,5

(3) Detección y cuantificación de YIT 12272 vivos en heces en un ensayo de ingestión oral

Se llevó a cabo un estudio en el que adultos sanos a los que se les había prohibido tomar productos alimenticios que contenían bacterias vivas durante tres semanas, se sometieron a la ingestión de un envase (100 ml) del producto de leche fermentada del Ejemplo 6 (que contenía YIT 12272 en una cantidad de 10<sup>10,5</sup>/ envase) diariamente continuamente durante 10 días.

(3-1) Detección de YIT 12272 vivos por una combinación de medio selectivo y el cebador específico para YIT 12272

Se recolectaron las heces de los sujetos antes y después de la ingestión del producto de leche fermentada que contiene YIT 12272 del Ejemplo 6 y se sometieron a dilución seriada de 10 veces utilizando un tampón de dilución (PBS). De la solución resultante, se aplicaron 100 µl a un medio selectivo de YIT 12272 (T-CBPC, Tabla 11), seguido por cultivo anaeróbico a 37 °C durante 72 horas para formar colonias. Las colonias obtenidas de esta manera se cultivaron anaeróticamente a 37 °C durante 24 horas en un medio líquido GAM con un 1% de glucosa añadida (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), obteniendo de esta manera las células bacterianas. Se extrajo el ADN de las células bacterianas, y se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN obtenido de esta manera como matriz y el cebador específico de YIT 12272. También, algunas de las cepas bacterianas se sometieron a identificación de la cepa bacteriana por el ensayo RAPD. Como resultado, los resultados de identificación de YIT 12272 para ambos métodos anteriores coincidían perfectamente. Hasta ahora, para determinar una colonia formada en un medio

selectivo como de YIT 12272, eran necesarios ensayos complejos y largos de RAPD y ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) utilizando anticuerpos monoclonales específicos para YIT 12272. Sin embargo, se ha demostrado que el uso del cebador específico para YIT 12272 facilita la determinación rápida y simple de YIT 12272.

5

[Tabla 11]  
Composición del medio selectivo de YIT 12272 (T-CBPC)

Componente	Composición (/L)
Medio agar propionato TOS (Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.)	62,5 g
Solución de antibióticos *	50 ml

\* Añadida tras esterilización en autoclave a 115°C durante 15 min.  
Que contiene lo siguiente por cada 50 ml  
0,001 g de sal disódica de Carbenicilina y  
5000000U de sal de sulfato de Estreptomina

(3-2) Cuantificación de YIT 12272 vivos en heces

10 Con el fin de detectar YIT 12272 vivos en heces recolectadas de los sujetos antes y después de haber ingerido el producto de leche fermentada que contiene YIT 12272 del Ejemplo 6, los aglomerados de heces disueltos se suspendieron en 0,5 ml de PBS, y se le añadieron 1,4 µl de una solución de PMA 20 mM (concentración final de 50 µM). La mezcla resultante se removió con cuidado y se almacenó en oscuridad durante cinco minutos.

15 Posteriormente, se irradió la mezcla con luz intensa durante dos minutos utilizando lámparas halógenas y se centrifugó, y se retiró el sobrenadante. Se extrajo el ADN de las heces tratadas con PMA y se cuantificaron los YIT 12272 vivos en las heces por PCR cuantitativa de combinación utilizando el cebador específico de YIT 12272. También se cuantificó simultáneamente el recuento de bacterias totales de YIT 12272 incluyendo las células muertas en las heces sin tratamiento PMA. Los resultados obtenidos de esta manera se muestran en la Tabla 12 junto con las UFC de YIT 12272 obtenidas utilizando el medio selectivo agar T-CBPC. No se detectaron YIT 12272

20 en las heces recolectadas de los sujetos antes de ingerir el producto de leche fermentada que contiene YIT 12272 tanto por el método de cultivo como por la PCR cuantitativa utilizando el cebador específico para YIT 12272. Por el contrario, el número total (viables y muertas) de B. breve YIT 12272 que se detectó por qPCR sin tratamiento con PMA era de  $10^{8,1 \pm 0,8}$ , el de B. breve YIT 12272 detectado por qPCR con tratamiento con PMA era de  $10^{7,5 \pm 1,0}$ , y se detectaron  $10^{6,9 \pm 1,5}$  UFC de YIT 12272 utilizando medio selectivo específico de YIT 12272, por gramo de heces

25 recolectadas de los sujetos que habían completado la ingestión. Además, debido a que el valor cuantitativo de las células bacterianas muertas tratadas con PMA obtenido por PCR era suficientemente pequeño, el recuento de bacterias viables de YIT 12272 calculado por la Fórmula 3 era igual al recuento de bacterias obtenido por la PCR cuantitativa tras el tratamiento con PMA (Tabla 12). En consecuencia, se confirmó que el uso del tratamiento con PMA y la PCR cuantitativa posibilitaban la determinación del recuento de bacterias viables de YIT 12272.

30

[Tabla 12]  
Recuento bacteriano de YIT 12272 en heces recolectadas de los sujetos antes y después de la ingestión del producto de leche fermentada que contiene YIT 12272

Muestra	Log <sub>10</sub> de células o UFC/g de heces					
	Antes de la ingestión			Tras la ingestión		
	PCR Cuantitativa		UFC	PCR Cuantitativa		UFC
	Sin tratamiento PMA (células vivas + células muertas)	Tratamiento PMA (Células vivas)		Sin tratamiento PMA (células vivas + células muertas)	Tratamiento PMA (Células vivas)	
a	<5,0 <sup>a)</sup>	< 5,0	<2,0 <sup>a)</sup>	8,5	8,4	7,9
b	< 5,0	< 5,0	< 2,0	6,7	< 5,0	3,3
c	< 5,0	< 5,0	< 2,0	8,5	8,3	7,4
d	< 5,0	< 5,0	< 2,0	8,8	8,4	7,9
e	< 5,0	< 5,0	< 2,0	6,4	5,3	4,8
f	< 5,0	< 5,0	< 2,0	8,4	7,9	7,6
g	< 5,0	< 5,0	< 2,0	8,4	7,7	6,9
h	< 5,0	< 5,0	< 2,0	9,1	8,8	8,3
i	< 5,0	< 5,0	< 2,0	8,2	7,1	6,8
j	< 5,0	< 5,0	< 2,0	8,2	8,0	7,2

Recuento bacteriano de YIT 12272 en heces recolectadas de los sujetos antes y después de la ingestión del producto de leche fermentada que contiene YIT 12272

Muestra	Log <sub>10</sub> de células o UFC/g de heces					
	Antes de la ingestión			Tras la ingestión		
	PCR Cuantitativa		UFC	PCR Cuantitativa		UFC
	Sin tratamiento PMA (células vivas + células muertas)	Tratamiento PMA (Células vivas)		Sin tratamiento PMA (células vivas + células muertas)	Tratamiento PMA (Células vivas)	
k	< 5,0	< 5,0	< 2,0	8,5	8,1	7,5
Media <sup>b)</sup>	< 5,0	< 5,0	< 2,0	8,1	7,5	6,9
D. E. <sup>b)</sup>	-	-	-	0,8	1,0	1

a) El límite de detección de YIT 12272 por PCR cuantitativa es de 10<sup>5</sup> células/gramo de heces y por el método de cultivo es de 10<sup>2</sup> UFC.

b) Si cualquier muestra estaba presente por debajo del límite de detección, se calculó el valor medio y le D. E. de la muestra basándose en el recuento bacteriano del límite de detección.

Hasta ahora, se llevaba a cabo un método para detectar y cuantificar YIT 12272 en las heces permitiendo a las bacterias formar una colonia en un medio selectivo, y un ensayo para confirmar una colonia como YIT 12272 necesitaba un trabajo y tiempo considerable. También, considerando que el medio selectivo contiene una alta concentración de antibióticos, se señala una posibilidad de que las bacterias dañadas no se sometían a división, por lo que se infravaloran los YIT 12272 vivos. La PCR cuantitativa utilizando el cebador específico para YIT 12272 de la presente invención posibilita la cuantificación de todos los YIT 12272 en las heces independientemente de que estén vivas o muertas. Además, solo los YIT 12272 de las heces se podrían cuantificar rápida y simplemente combinándolos con PMA, que es un colorante permeable a la membrana.

(Ejemplo 13) Ensayo de recuperación de bacterias ingeridas

Se dividieron aleatoriamente en dos grupos diecinueve adultos sanos entre los 20 y los 50 años de edad, y después de siete días de observación (periodo de observación), los sujetos ingirieron un envase (100 ml) de o bien el producto de leche fermentada preparada utilizando la cepa YIT 12272 (bebida de ensayo) o un producto de leche fermentada preparada utilizando la cepa YIT 10001 en vez la YIT 12272 (bebida de control), los dos producidos de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6, diariamente durante siete días (periodo de ingestión 1). Después de 10 días de interrupción (periodo de interrupción), los sujetos que habían ingerido o la bebida de ensayo o la bebida control se entrecruzaron, y se continuó la ingestión durante siete días más (periodo de ingestión 2). Se recolectaron las heces el día siguiente al día final del periodo de observación, cada periodo de ingestión, y periodo de interrupción. Se tiene que señalar que los sujetos tenían prohibida la ingestión de cualquier producto de leche fermentada o productos probióticos distintos de la bebida de ensayo o la bebida de control durante el periodo del ensayo. También, los recuentos bacterianos del *Bifidobacterium* en la bebida de ensayo y la bebida de control eran de 6,8 a 8,9 x 10<sup>8</sup> UFC/ml y 2,9 a 4,2 x 10<sup>8</sup> UFC/ml, respectivamente.

De acuerdo con el ejemplo 12, utilizando el medio selectivo de agar T-CBPC, se obtuvieron las UFC de las bacterias ingeridas en las heces (cepa YIT 12272 o cepa YIT 10001). Utilizando el método RAPD del cebador específico para la cepa YIT 12272 se muestra en la Tabla 8, se llevó a cabo un ensayo cualitativo de capa bacteriana.

Aunque las bacterias ingeridas no se detectaron en las heces recolectadas de cualquiera de los sujetos antes de la ingestión del producto de leche fermentada, los recuentos de las bacterias ingeridas en el grupo de ingestión de bebida de ensayo tras la ingestión era de 7,3±0,8 Log UFC/g y 5,9±1,1 Log UFC/g, respectivamente, mostrando que el recuento bacteriano era significativamente mayor en el grupo de ingestión de la bebida de ensayo que en el grupo de ingestión de la bebida de control (Tabla 13). Se tiene que señalar que no se observó ningún efecto secundario adverso asociado a la ingestión ni de la bebida de ensayo ni de la bebida de control durante el periodo de estudio.

[Tabla 13]

Recuento bacteriano de bacterias ingeridas en las heces		
	Antes de la ingestión	Después de la ingestión
Grupo de ingestión de la bebida de ensayo (n=19)		
Recuento bacteriano de las bacterias ingeridas detectadas	ND	7,3±0,8 <sup>##</sup>

Recuento bacteriano de bacterias ingeridas en las heces		
	Antes de la ingestión	Después de la ingestión
(Log CFU/g)		
Grupo de ingestión de la bebida de control (n=19)		
Recuento bacteriano de las bacterias ingeridas detectadas (Log CFU/g)	ND	5,9±1,1
##: p<0,01 Comparado con el grupo de ingestión de la bebida de control (ensayo t independiente de los dos grupos)		
ND: Por debajo del límite de detección (10 <sup>2</sup> UFC)		

- 5 Se ha revelado que, por la ingestión del presente producto de leche fermentada, tanto la de la cepa YIT 12272 como la de la cepa YIT 10001, se recolectaban vivas en las heces; sin embargo, el recuento bacteriano de la cepa YIT 12272 era significativamente mayor que el de YIT 10001. Se considera que este resultado refleja que la cepa YIT 12272 tiene una viabilidad favorable en un producto, y al mismo tiempo el aumento de su resistencia contra el jugo gástrico artificial y la bilis artificial/fluido intestinal.  
(Ejemplo 14) Ensayo de la acción sobre la regulación del intestino 1
- 10 Se llevó a cabo un ensayo abierto en el que 57 sujetos de 63 años de edad o más que padecían estreñimiento o predisposición a estreñimiento (tres a cinco veces de evacuación intestinal/semana, contenido en agua de las heces de menos del 70%, 27 hombres y 30 mujeres, media de edad 68,7±5,4) ingirieron, tras dos semanas de periodo de observación, un envase (100 ml) del producto de leche fermentada descrito en el Ejemplo 8 diariamente durante 15 condiciones del movimiento intestinal y las propiedades de las heces (escala Bristol Stool). Se tiene que señalar que a los sujetos se les prohibió ingerir cualquier producto de leche fermentada o productos probióticos distintos del presente producto de leche fermentada durante el periodo de ensayo. También, el recuento bacteriano del Bifidobacterium en el presente producto de leche fermentada era de 1 x 10<sup>8</sup> UFC/ml o más.
- 20 En comparación con antes de la ingestión, el número de movimientos del intestino grueso, el número de días que tenían evacuación intestinal, y la cantidad de heces estaban significativamente mejorados tras la ingestión. También se había mejorado significativamente la puntuación de la escala Bristol Stool, y se normalizó la dureza de las heces (Tabla 14). Se tiene que señalar que no se observaron efectos secundarios adversos asociados con la ingestión del presente producto de leche fermentada durante el periodo de ensayo. A partir de los resultados anteriores, se 25 confirmó que el presente producto de leche fermentada tenía una acción en la regulación intestinal.

[Tabla 14]

Condiciones de la defecación y propiedades de las heces durante el periodo de observación y el periodo de ingestión		
	Periodo de Observación	Periodo de Ingestión
Número de defecaciones (número de veces a la semana)	5,0±1,7	6,2±1,9**
Número de días que se defeca (número de días /semana)	4,3±1,2	5,2±1,2**
Cantidad de heces (unidades/semana) <sup>1)</sup>	21,7±9,7	27,4±11,8**
Puntuación de las propiedades fecales <sup>2)</sup>	3,6±0,9	3,8±0,7 <sup>#</sup>
<sup>1)</sup> : una forma cilíndrica de un diámetro de 2 cm x una altura de 5 cm se fijó como una unidad. <sup>2)</sup> : Basada en la Escala Bristol Stool, las heces se evaluaron en una escala del uno al siete: (1) bultos separados, (2) duras, (3) grietas en la superficie, (4) superficie lisa, (5) semi-sólidas, (6) blandas, y (7) líquidas. ** : p<0,01 Comparado con el periodo de observación (ensayo t relativo a los dos grupos) <sup>#</sup> : p<0,05 Comparado con el periodo de observación (ensayo de suma de rangos con signo de Wilcoxon)		

- 30 (Ejemplo 15) Ensayo de la acción sobre la regulación intestinal 2
- 35 Se llevó a cabo un ensayo de comparación de grupos paralelos doble ciego controlado por placebo, en el que 75 mujeres estudiantas predispuestas a estreñimiento (con edades entre 18 y 23 años, cinco o menos defecaciones/semana) ingerían, tras cuatro semanas de periodo de observación, un envase (100 ml) de o bien el producto de leche fermentada descrito en el Ejemplo 6 (el grupo de ensayo) o una bebida placebo (leche sin fermentar sin bacterias, galactooligosacáridos, y polidextrosa, el grupo de placebo) diariamente durante cuatro semanas. En la semana final del periodo de observación y el periodo de ingestión, se examinaron la condición de las defecaciones y las propiedades de las heces (Escala Bristol Stool). Se tiene que señalar que a los sujetos se les prohibió ingerir cualquier producto de leche fermentada o productos probióticos distintos de la presente bebida de

leche fermentada o placebo durante el periodo de estudio. También, el recuento bacteriano del Bifidobacterium en el presente producto de leche fermentada era de  $1 \times 10^8$  UFC/ml o más.

5 Se analizaron cuarenta y cuatro sujetos cuyo contenido en agua de las heces era menor del 70% (Tabla 15). Como resultado, se encontró que el grupo de ensayo mostraba una tendencia de más defecaciones en el periodo de ingestión en comparación con el grupo de placebo ( $p = 0,081$ ). Aunque no se observó ningún cambio en el número de días de defecación entre el periodo de ingestión y el periodo de observación en el grupo de placebo, aumentaba significativamente en el grupo de ensayo en el periodo de ingestión en comparación con el periodo de observación, y era significativamente mayor en el grupo de ensayo en comparación con el grupo placebo en el periodo de ingestión.

10 Aunque la puntuación de las propiedades no cambió en el grupo de placebo en el periodo de ingestión en comparación con el periodo de observación, la puntuación aumentaba significativamente en el grupo de ensayo, indicando una mejoría en las propiedades fecales. También, en el periodo de ingestión, el grupo de ensayo mostraba una tendencia a tener una puntuación más alta para las propiedades fecales ( $P = 0,070$ ) en comparación con el grupo placebo. Se tiene que señalar que no se observaron efectos secundarios adversos con la ingestión del presente producto de leche fermentada o la bebida de placebo durante el periodo de estudio. A partir de los resultados anteriores, se confirmó que el presente producto de leche fermentada tenía una acción reguladora intestinal.

15

[Tabla 15]

Condición de la defecación y propiedades de las heces durante el periodo de observación y el periodo de ingestión		
	Periodo de Observación	Periodo de Ingestión
Número de defecaciones (número de veces/semana)		
Grupo Placebo (n=20)	4,1±1,2	4,2±1,8
Grupo de ensayo (n=24)	4,7±1,7	5,5±2,9 <sup>a)</sup>
Número de días de las defecaciones (número de días/semana)		
Grupo Placebo (n=20)	3,8±1,2	3,6±1,4
Grupo de ensayo (n=24)	3,8±1,0	4,6±1,6 <sup>#</sup>
Puntuación de las propiedades fecales <sup>1)</sup>		
Grupo Placebo (n=20)	3,0±1,2	3,1±0,9
Grupo de ensayo (n=24)	3,2±0,9	3,6±0,7 <sup>*b)</sup>

<sup>1)</sup>: Basándose en la Escala Bristol Stool, las heces se evaluaron en una escala del uno al siete: (1) bultos separados, (2) duras, (3) grietas en la superficie, (4) superficie lisa, (5) semi-sólidas, (6) blandas, y (7) líquidas.  
<sup>\*</sup>:  $p < 0,05$  Comparado con el periodo de observación (ensayo t relativo a los dos grupos o ensayo de suma de rangos con signos de Wilcoxon)  
<sup>#</sup>:  $p < 0,05$  Comparado con el grupo placebo (ensayo t relativo a los dos grupos)  
<sup>a)</sup>:  $p = 0,081$  Comparado con el grupo placebo (ensayo t relativo a los dos grupos)  
<sup>b)</sup>:  $p = 0,070$  Comparado con el grupo placebo (ensayo de suma de rangos con signo de Wilcoxon)

20

(Ejemplo 16) Ensayo de la acción inhibidora sobre la producción de un producto de putrefacción

25 Se llevó a cabo un ensayo de comparación de grupos paralelos doble ciego controlado por placebo, en el que 39 sujetos femeninos sanos con edades de entre veinte a setenta años se dividieron en dos grupos de forma que ambos grupos se igualaron en términos de edad, altura, peso corporal, y BMI, y tras cuatro semanas de periodo de observación, ingirieron un envase (100 ml) de o bien el producto de leche fermentada del Ejemplo 6 (grupo de ensayo) o una bebida placebo (leche sin fermentar sin bacterias, galactooligosacáridos, y povidexrosa, un grupo placebo) diariamente durante cuatro semanas. En la semana final del periodo de observación y el periodo de ingestión, se recolectó sangre de los brazos de los sujetos. Se tiene que señalar que se prohibió a los sujetos la ingestión de cualquier producto de leche fermentada o productos probióticos distintos de la presente leche fermentada o la bebida placebo durante el periodo de ensayo. También, el recuento bacteriano de los Bifidobacterium en la presente leche fermentada era de  $1 \times 10^8$  UFC/ml o más.

30

35 Se preparó el suero a partir de la sangre recolectada de esta manera de acuerdo con el método ordinario, y se almacenó congelado a  $-80$  °C. Luego, se agitó y se mezcló con 25  $\mu$ l del suero, 475  $\mu$ l de agua mili-Q, 200  $\mu$ l de ácido clorhídrico, y 10  $\mu$ l de una solución de referencia interna (obtenida diluyendo 4-clorofenol (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) 300 veces con acetato de etilo (Sigma)), y la mezcla resultante se calentó a 100 °C durante 60 minutos en un tubo de ensayo sellado. Después del enfriamiento, se añadieron 2 ml de dietil éter a la mezcla

resultante: removiendo a continuación, y se recogió 1 ml de la capa de dietil éter y se mezcló con 1 ml de metanol que contenía hidróxido sódico 0,05 N. La mezcla se secó para solidificarlo con un evaporador centrífugo y luego se disolvió en 200 µl de acetato de etilo. La mezcla resultante se filtró a través de un filtro de 0,45 µm (Ultrafree-MC, Millipore Corporation), preparando de esta manera una muestra para HPLC. También, se mezclaron 25 µl de una solución obtenida diluyendo para-cresol (Nacalai tesque, Inc.= de 0 a 0,01% con acetato de etilo, 675 µl de acetato de etilo, y 10 µl de la solución de referencia interna y se proporcionó como solución de referencia. Se llevó a cabo un análisis HPLC de para-cresol bajo las siguientes condiciones.

Sistema HPLC: Alliance 2695 (Waters Corporation) Detector: detector de fluorescencia Ex 260 nm, Ev 305 nm (utilizando un detector en combinación de 270 nm UV)  
 Columna: Columna-L 4,6 x 150 mm, un diámetro de partícula de 5 µm (Instituto de Evaluación Clínica e Investigación) Temperatura de la columna: 40 °C  
 Eluyente: %A; 0,1% de ácido fosfórico, %B; acetonitrilo, %A/%B = 80/20 (isocrático)  
 Tasa de flujo: 1,0 ml/min  
 Volumen de inyección: 10 µl  
 Temperatura de la cámara de muestras: 10 °C  
 Tiempo de medición: 30 minutos

Aunque la concentración en la sangre de para-cresol tras la ingestión no cambiaba en comparación con antes de la ingestión en el grupo placebo, la concentración desciende significativamente en el grupo de ensayo. También era significativamente más bajo en el grupo de ensayo en comparación con la del grupo placebo (Tabla 16). Se tiene que señalar que no se observaron efectos secundarios adversos ni con la ingestión del presente producto de leche fermentada ni con la bebida placebo durante el periodo de ensayo.

[Tabla 16]

Concentración de para-cresol en la sangre antes y después de la ingestión		
	Antes de la ingestión (µM)	Después de la ingestión (µM)
Grupo placebo (n=19)	61,9 ± 16,7	67,0 ± 11.1
Grupo de ensayo (n=20)	74,0 ± 13,0	34,3 ± 7,5 <sup>#</sup>
: p<0,05 Comparado con antes de la ingestión (ensayo t relativo a los dos grupos)		
<sup>#</sup> : p<0,05 Comparado con el grupo placebo (ensayo t relativo a los dos grupos)		

Los resultados anteriores revelaron que la ingestión de la presente leche fermentada disminuía la concentración en sangre de un producto de putrefacción intestinal (para-cresol), que era una sustancia biológicamente tóxica producida por las bacterias intestinales. Esto se consideraba el resultado de la inhibición de la producción de para-cresol en el intestino debido a una acción de mejoría ambiental. Es decir, la presente leche fermentada se consideró que tiene una acción de mejoría ambiental.

**[Aplicabilidad Industrial]**

El método para producir bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium de la presente invención posibilita la adquisición de las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium que tienen una viabilidad excelente incluso bajo condiciones con diferentes factores ambientales. Esta cepa bacteriana se puede aplicar a varios alimentos y bebidas, y debido a su alta viabilidad y bebidas, las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium pueden mostrar eficazmente sus funciones fisiológicas. También, se puede producir una cepa bacteriana que sea utilizable en varios alimentos y bebidas mejorando las bacterias que pertenecen al género Bifidobacterium que tienen un efecto fisiológico específico tal como una acción anti-Helicobacter pylori por el método de producción de la presente invención; por lo tanto, la presente invención tiene una extremadamente alta aplicabilidad industrial.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA
- <120> Método para construir una bacteria nueva que pertenece al género Bifidobacterium
- <130> YK0062
- <150> JP 2010-039212
- <151> 24-02-2010



ES 2 526 414 T3

<150> JP 2010-136792  
 <151> 16-06-2010

5 <160> 30

<170> PatentIn versión 3.1

10 <210> 1  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> ADN diseñado basándose en el gen Bifidobacterium

<400> 1  
 atggcaaaac cgggctgaa 19

20 <210>2  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> ADN diseñado basándose en el gen Bifidobacterium

<400> 2  
 gcggatgaga ggtggg 16

30 <210>3  
 <211> 1151  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Bifidobacterium breve YIT 12272

<400> 3

agccagtttc gaggtatggc cggctactacc acgcgaaccc gggcgggtgga acagcctcca 60

aaggggtgaag gtgttcatcg cttgcctccc gcgttgatgt cgtgaccgac ggctgcagca 120

gcgttggcgt cggcatccgg ctgatgcagc ctaccgtcct gcatcattac ggttcggcca 180

cagaagccag cgacgttggg atcgtgcggt acgaccacta cggcagcggc gttatcacgc 240

gctgcggcca tcaggatgcc catcacctca cgtccggtgg tctgatcgag ggcaccggtc 300

ggttcgtcgg cgaataccac ggctggtttc acggcgagcg cacgggcat ggcgatgcgc 360

tgcatctgac cgccgctcat ctccccggc cggttattgg cgagggcacg aaggcccatg 420

ES 2 526 414 T3

cgttccagcc agagaatcgc ggtgtcggtg gcggtgcggt atggcatgcc gtcgagcacc 480  
 atcggcagtg cgatatatttc gactgccggc aattcgggaa gcagctggcc ggattggaag 540  
 acaaaaccga aagcgttgcg gcgcagcttg gtgcggccgg catcgctcat ggcatccaga 600  
 ttcgagccac ggaaggtcac tgtgccggcg gtcggcttga tgatgccggc gagcgcgtgc 660  
 agcagcgtgg acttgccgga gccagacggg cccatgacag caaccgtctc accctcacc 720  
 aatgcgaagc tcacgtggtt cagggcaagt gtgtgcatgg ttggcatggc aaaaccgggc 780  
 tgaacattgg cagcgggaac cgcagcacct gttccggccg gcatcacacc ggtaacgcca 840  
 tgaccggcct gcgcacgggc catactggcg gtgtagtcca tgatcaagtc atgtgcctcg 900  
 atcaccggag accactgctg ccgtgcgtcc tgttgttga ctgcttccgg tgcggtctga 960  
 gtctgctgaa attgctgtgt tgccttattc atactcccga gagtacggat cgagcagaag 1020  
 cctgaccatc aggctgcggt atgaaccttt tcaaccgccc caccacctc tcacccgcaa 1080  
 ggattagaga ttcgcagctc atgcgacaat acttttatca atggcaatgt ggataacttc 1140  
 ggaaactggc t 1151

5 <210>4  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador aleatorio

<400> 4  
 gtgaagtagg 10

15 <210>5  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador aleatorio

<400> 5  
 caatagccgt 10

25 <210>6  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador aleatorio

35 <400> 6  
 cagtaccac 10

40 <210>7  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador aleatorio

# ES 2 526 414 T3

<400>7  
 aggtaaccgt            10

5        <210>8  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

10       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 8  
          Cagtacctc            10

15       <210>9  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

20       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 9  
          ggttaaagcc            10

25       <210> 10  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

30       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 10  
          tcgacgatag            10

35       <210> 11  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

40       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 11  
          agccaacgaa            10

45       <210> 12  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

50       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 12  
          gttgcggtcc            10

55       <210> 13  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

60       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

65       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

# ES 2 526 414 T3

<400> 13  
 tgcgacttac            10

5        <210> 14  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

10       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 14  
          gtagacaagc            10

15       <210> 15  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

20       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 15  
          tgccgaattc            10

25       <210> 16  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

30       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 16  
          cgaactagac            10

35       <210> 17  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

40       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

45       <400> 17  
          ggcttaacac            10

         <210> 18  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

50       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

55       <400> 18  
          aagactgtcc            10

60       <210> 19  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

65       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

# ES 2 526 414 T3

<400> 19  
 gcggaatag            10

5        <210> 20  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

10       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 20  
          ccgcagccaa            10

15       <210>21  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

20       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 21  
          ccgatctaga            10

25       <210> 22  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

30       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 22  
          gaggacaaag            10

35       <210> 23  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

         <220>  
          <223> Cebador aleatorio

45       <400> 23  
          aacgcgcaac            10

         <210> 24  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

50       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 24  
          gacgactatc            10

55       <210> 25  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

60       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

65       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

<400> 25  
 gtcaacgaag            10

5        <210> 26  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

10       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 26  
          agccagttc            10

15       <210> 27  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

20       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 27  
          cgcataggtt            10

25       <210> 28  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

30       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

         <400> 28  
          ggggttgacc            10

35       <210> 29  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

40       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

45       <400> 29  
          actgcatcc            10

         <210> 30  
          <211> 10  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

50       <220>  
          <223> Cebador aleatorio

55       <400> 30  
          cccgtcagca            10

**REIVINDICACIONES**

1. Una bacteria que pertenece al género *Bifidobacterium*, en donde la bacteria es *Bifidobacterium breve* YIT 12272 que tiene el número de registro FERM BP-11320.  
5
2. Un alimento o bebida que comprende la bacteria que pertenece al género *Bifidobacterium* de acuerdo con la reivindicación 1.
3. El alimento o bebida de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el alimento o bebida es un alimento o bebida fermentados tal como un alimento o bebida de leche fermentada.  
10
4. El alimento o bebida de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, que además comprende un edulcorante.
5. El uso de un fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia para detectar o cuantificar el *Bifidobacterium breve* YIT 12272 que tiene el número de registro FERM BP-11320.  
15
6. El uso de un cebador que comprende una secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia para detectar o cuantificar el *Bifidobacterium breve* YIT 12272 que tiene el número de registro FERM BP-11320.  
20
7. El uso de un grupo de cebadores que comprende la combinación de dos secuencias de nucleótidos representadas por las SEC ID N°s 1 y 2 o una combinación de dos secuencias de nucleótidos complementarias a las secuencias para detectar o cuantificar el *Bifidobacterium breve* YIT 12272 que tiene el número de registro FERM BP-11320.  
25
8. Un método para detectar el *Bifidobacterium breve* YIT 12272 que tiene el número de registro FERM BP-11320, que comprende la detección por el uso del cebador como se define en la reivindicación 6 o 7.
9. Un método para cuantificar un recuento bacteriano del *Bifidobacterium breve* YIT 12272 que tiene el número de registro FERM BP-11320, que comprende la cuantificación por el uso del cebador como se define en la reivindicación 6 o 7.  
30
10. Un método para cuantificar un recuento de bacterias viables de *Bifidobacterium breve* YIT 12272 que tiene el número de registro FERM BP-11320, que comprende la realización de una reacción PCR por el uso de una muestra tratada con un colorante permeable a la membrana y el cebador como se define en la reivindicación 6 o 7.  
35

FIG. 1

```

AGCCAGTTTC GAGGTATGGC CGGTACTACC ACGCGAACCC GGGCGGTGGA ACAGCCTCCA 60
AAGGGTGAAG GTGTTTCATCG CTTGCCTCCC GCGTTGATGT CGTGACCGAC GGCTGCAGCA 120
GCGTTGGCGT CGGCATCCGG CTGATGCAGC CTACCGTCTT GCATCATTAC GGTTCCGGCCA 180
CAGAAGCCAG CGACGTTGGG ATCGTGGTT ACGACCACTA CCGCAGCGCC GTTATCAGGC 240
GCTGCGGCCA TCAGGATGCC CATCACCTCA CGTCCGGTGG TCTGATCGAG GGCACCGGTC 300
GGTTCGTCGG CGAATACCAC GGCTGGTTTC ACGGCGAGCG CACGGGCGAT GGCATGCGC 360
TGCATCTGAC CGCCGCTCAT CTCCTCCGGC CGTTATTGG CGAGGGCAGG AAGGCCCATG 420
CGTTCAGCC AGAGAATCGC GGTGTGGTG GCGGTGCGGT ATGGCATGCC GTCGAGCATC 480
ATCGGCAGTG CGATATTTTC GACTGCCGGC AATTCGGGAA GCAGCTGGCC GGATTGGAAG 540
ACAAAACCGA AAGCGTTGCG GCGCAGCTTG GTGCGGCCGG CATCGCTCAT GGCATCCAGA 600
TTCGAGCCAC GGAAGGTCAC TGTGCCGGCG GTCGGCTTGA TGATGCCGGC GAGCGCGTGC 660
AGCAGCGTGG ACTTGCCGGA GCCAGACGGG CCCATGACAG CAACCGTCTC ACCCTCAGCC 720
AATGCGAAGC TCACGTGGTT CAGGGCAAGT GTGTGCATGG TTGGCATGGC AAAACCGGGC 780
TGAACATTGG CAGCGGGAAC CCGCAGCACT GTTCCGGCCG GCATCACACC GGTAAACGCCA 840
TGACCGGCCT GCGCACGGGC CATACTGGCG GTGTAGTCCA TGATCAAGTC ATGTGCCTCG 900
ATCACCGGAG ACCACTGCTG CCGTGCCTCC TGTGTTGCA CTGCTCCGG TCGGCTCTGA 960
GTCTGCTGAA ATTGCTGTGT TGCTGTATTC ATACTCCCGA GAGTACGGAT CGAGCAGAAG 1020
CCTGACCATC AGGCTGCGGT ATGAACCTTT TCAACCGCCC CACCCACCTC TCATCCGCAA 1080
GGATTAGAGA TTCGCAGTCG ATGCGACAAT ACTTTTATCA ATGGCAATGT GGATAACTTC 1140
GGAAACTGGC T

```



FIG. 2

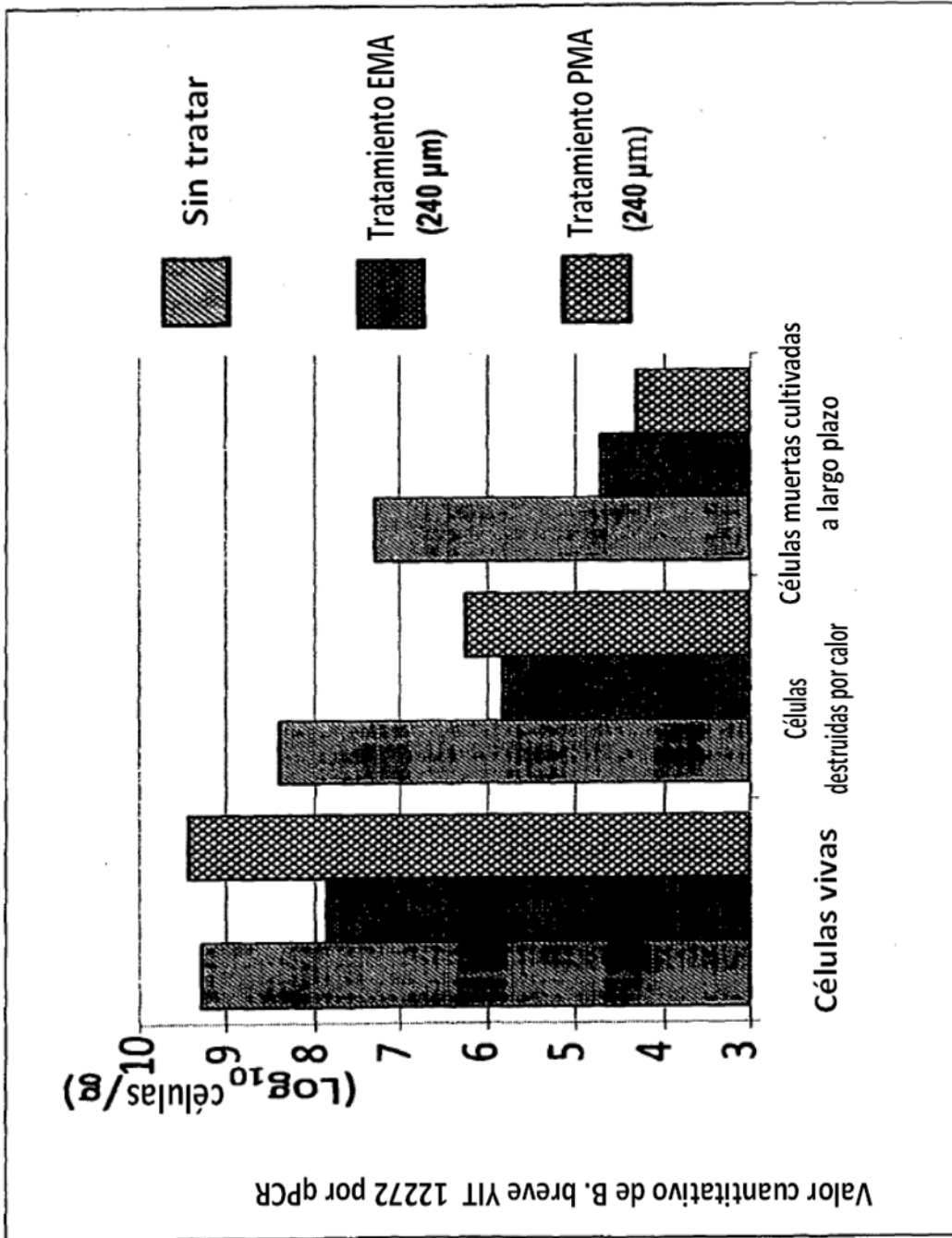


FIG. 3

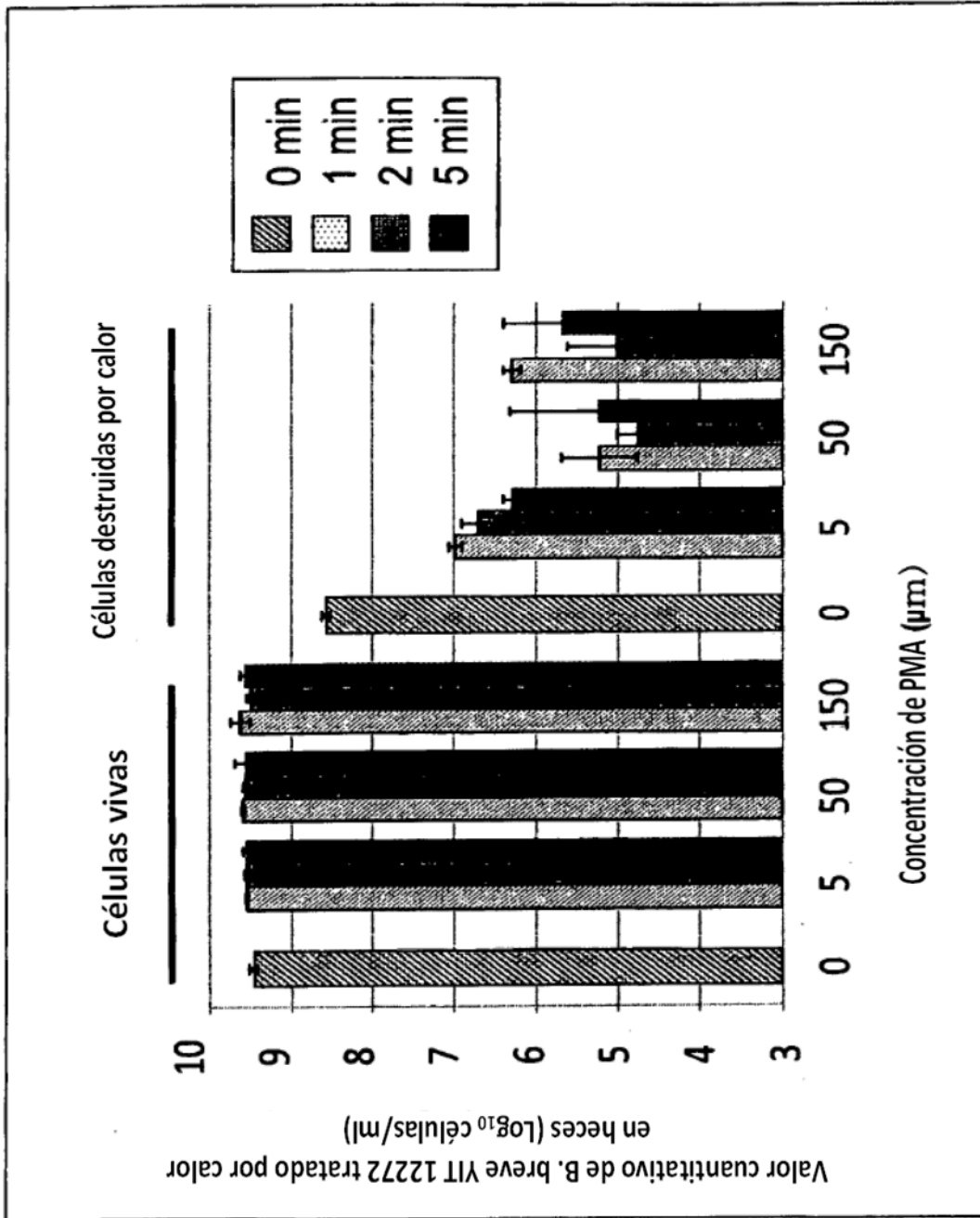


FIG. 4

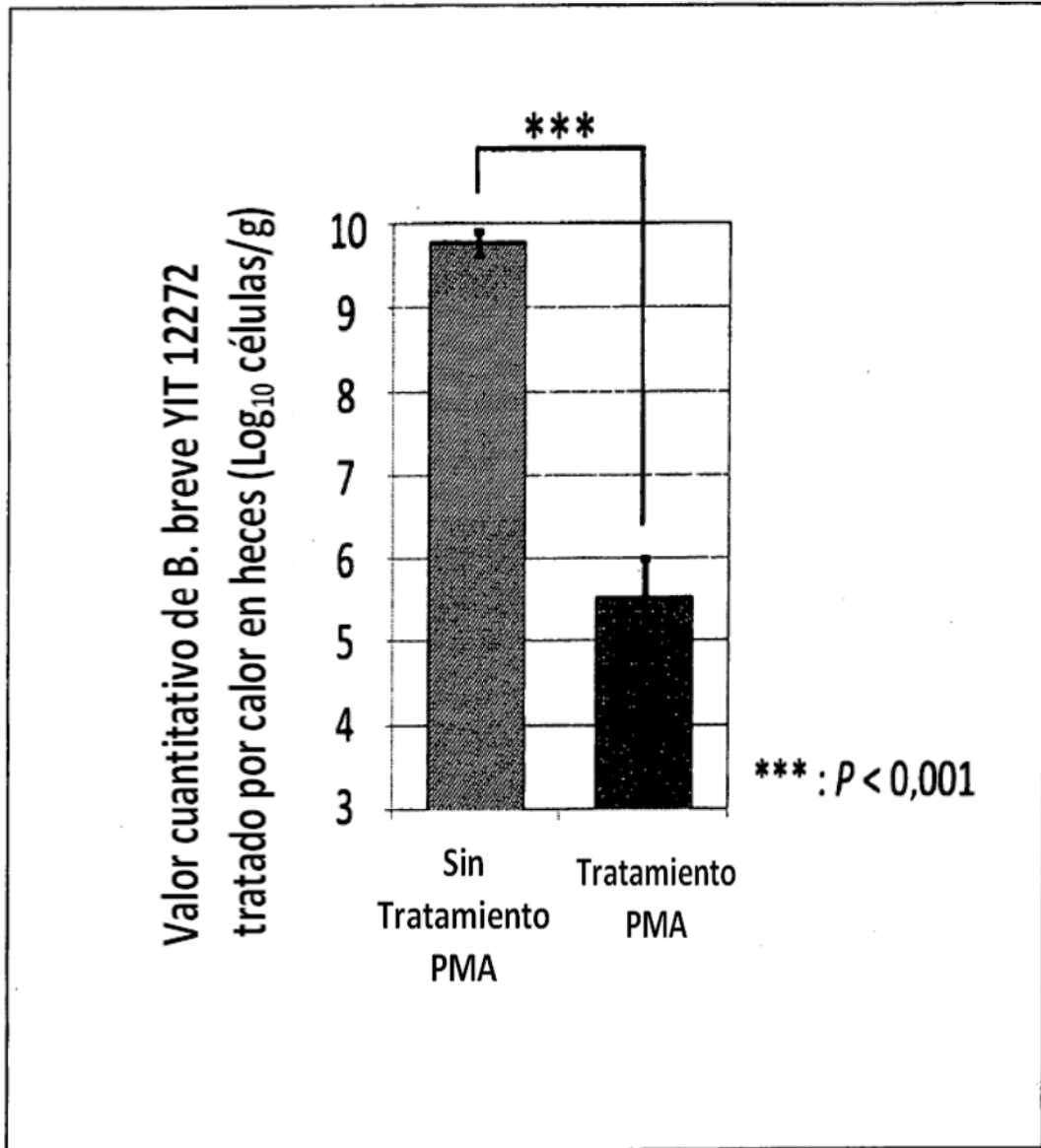


FIG. 5

