

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 495**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2014 PCT/JP2014/060811**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14171477**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2014 E 14785480 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2987853**

54 Título: **Bacteria que pertenece al género Lactobacillus**

30 Prioridad:

17.04.2013 JP 2013086575

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

21.09.2017

73 Titular/es:

**SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)
1-40 Dojimahama 2-chome, Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-8203, JP**

72 Inventor/es:

**FUKUSHIMA, EIJI y
OKADA, SANAE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 633 495 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

Bacteria que pertenece al género *Lactobacillus*

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una bacteria que pertenece al género *Lactobacillus*. Más específicamente, la presente invención se refiere a una *Lactobacillus pentosus* novedosa.

Técnica anterior

10 Algunas bacterias del ácido láctico y bifidobacterias tienen excelentes actividades fisiológicas tales como una actividad que regula el intestino y actividad inmunoestimulante, y se han usado en diversas aplicaciones dependiendo de las propiedades de las especies bacterianas. Entre ellas, recientemente se han desarrollado estudios sobre los efectos de la dieta tomando estas bacterias, y se han realizado muchos informes.

15 Por ejemplo, la publicación de patente 1 notifica que la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 degrada un lípido (triacilglicerol) que es causante de obesidad, bloqueando de ese modo su absorción en el cuerpo. Además, se ha sabido que *L. brevis* KB290, que es un tipo de bacteria del ácido láctico vegetal, llega a los intestinos en un estado vivo, mostrando de ese modo excelentes tasas de viabilidad intestinal y capacidad de supervivencia en el tracto intestinal (sin embargo, el número de bacterias excretadas es menor que el número de bacterias ingeridas) (véase la publicación no de patente 1). Además, la publicación no de patente 2 ha notificado que la cepa de *Lactobacillus acidophilus* L-92 se recoge de las heces en una cantidad del 93% del número de bacterias ingeridas, de modo que la cepa tiene una excelente capacidad de supervivencia en el tracto intestinal, y la publicación no de patente 3 ha notificado que se examina la capacidad de supervivencia de *L. gasseri* SBT2055 en el tracto intestinal, y se administran 100 g de una leche fermentada que contiene de 1×10^6 a 5×10^6 ufc/g de las bacterias, y como resultado, se detectan las bacterias en las heces como máximo a 1×10^5 ufc/g más o menos.

20 Por otro lado, en cuanto a las bifidobacterias, se ha notificado que la cepa de *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* GCL2505 no solo tiene capacidad de supervivencia en el tracto intestinal en la que la cepa llega a los intestinos en un estado vivo tras la ingesta oral, sino que también muestra una capacidad de proliferación notable dentro del tracto intestinal (véase la publicación de patente 2). La publicación no de patente 4 ha notificado que cuando se administra *B. animalis* ssp. *lactis* DN-173 010 a adultos, se detecta el 20% más o menos de la DN-173 010 en las deposiciones, en relación con el número de bacterias ingeridas.

Referencias de la técnica relacionadaPublicaciones de patente

30 Publicación de patente 1: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2011-206057

Publicación de patente 2: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2011-172506

Publicaciones no de patente

Publicación no de patente 1: "Physiological Function of Lactic Acid Bacteria for Human Health", 31 de agosto de 2007, CMC Publishing CO., LTD., 160-162

35 Publicación no de patente 2: Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria, 2001, 12, "Isolation and characterization of a *Lactobacillus acidophilus* strain L92 that can survive in in human gastrointestinal tract", 28-35

Publicación no de patente 3: Microbiol. Immunol., 2006, 50, "Monitoring and survival of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in the human intestinal tract.", 867-870

40 Publicación no de patente 4: J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2008,14, "Survival of *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 in the faecal microbiota after administration in lyophilized form or in fermented product - a randomized study in healthy adults", 128-136

Sumario de la invenciónProblemas a resolver por la invención

45 Convencionalmente, se examinan diversos probióticos para determinar la capacidad de supervivencia en el tracto intestinal tal como se describió anteriormente. Sin embargo, en cuanto a las bacterias del ácido láctico, solo se ha notificado que el número de bacterias que sobreviven en el tracto intestinal es del mismo nivel o inferior al número de bacterias ingeridas, o no se mide el número de bacterias que sobreviven en el tracto intestinal.

50 Además, puesto que la absorción de grasas tiene lugar principalmente en el intestino delgado, incluso si *Bifidobacterium*, que prolifera habitualmente en el intestino grueso, muestra capacidad de proliferación en el tracto intestinal, el bloqueo de la absorción de grasas no es suficiente. Además, se sabe que las bacterias del ácido láctico

actúan aguas arriba del intestino grueso, pero no se han realizado aún informes sobre las especies bacterianas que muestran capacidad de proliferación en el tracto intestinal.

Un objeto de la presente invención es proporcionar bacterias del ácido láctico que muestran capacidad de proliferación en el tracto intestinal.

5 Medios para solucionar los problemas

La presente invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus pentosus* TUA4337L (número de registro: NITE BP-1479), caracterizada porque la cepa tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal.

Efectos de la invención

10 Las bacterias del ácido láctico de la presente invención presentan excelentes efectos de proliferación en el tracto intestinal. Además, cuando se ingieren las bacterias del ácido láctico de la presente invención, se presentan algunos excelentes efectos que potencian la actividad fisiológica de las células bacterianas, tal como que las bacterias del ácido láctico sobreviven en el tracto intestinal y proliferan, continuando de ese modo los efectos de bloqueo de la absorción de grasas, lo que a su vez da como resultado la obtención de efectos altamente dietéticos.

Breve descripción de los dibujos

15 [Figura 1] La figura 1 es un gráfico que muestra los resultados del examen en disoluciones intestinales artificiales.
 [Figura 2] La figura 2 es un gráfico que muestra la transición de aumentos de peso, en el que las marcas “*” en la figura muestran que hay una diferencia significativa ($p < 0,05$) basándose en el grupo con dieta rica en grasas.
 [Figura 3] La figura 3 es un gráfico que muestra la cantidad de triglicéridos en sueros, en el que las marcas “*” en la figura muestran que hay una diferencia significativa ($p < 0,05$) basándose en el grupo con dieta rica en grasas.

20 Modos para llevar a cabo la invención

Las bacterias del ácido láctico de la presente invención son una cepa de *Lactobacillus pentosus* TUA4337L, caracterizada porque la cepa tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal. En este caso, la expresión “tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal” o “proliferación en el tracto intestinal” tal como se usa en el presente documento significa que la cepa, tras haber sobrevivido en el tracto intestinal, prolifera en el intestino delgado y/o el intestino grueso, y preferiblemente el intestino delgado, y el grado de capacidad de proliferación puede evaluarse como “que es proliferativo” en un caso en el que el valor numérico es diez veces o más la DO_{660} en la inoculación cuando se cultiva la cepa en una disolución intestinal artificial a 37°C durante 6 horas.

30 Los presentes inventores han examinado la capacidad de proliferación de aproximadamente 480 tipos de bacterias del ácido láctico, de las que son propietarios los presentes inventores, en disoluciones intestinales artificiales, y han administrado suspensiones de las bacterias que pertenecen a *Lactobacillus pentosus* seleccionadas a partir de las mismas a animales. Como resultado, los presentes inventores han descubierto que la cepa de *Lactobacillus pentosus* TUA4337L es significativamente mayor en el número de bacterias excretadas que el número de bacterias administradas. De ese modo, se ha perfeccionado la presente invención.

35 La cepa de *Lactobacillus pentosus* TUA4337L está depositada en el Depósito de Microorganismos de Patente, Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, Agencia Administrativa Incorporada (2-5-8 Kazusakamatar, Kisarazushi, Chibaken, Japón) con la referencia de identificación de NRIC 0883, con el número de registro de NITE BP-1479 fechado con una fecha de depósito internacional de 10 de diciembre de 2012. La cepa de *Lactobacillus pentosus* TUA4337L se denomina a continuación en el presente documento simplemente como cepa TUA4337L.

40 Las características bacteriológicas de la cepa TUA4337L se muestran en las tablas 1 y 2. La actividad de asimilación de azúcar de la tabla 2 es el resultado de mediciones usando un kit de identificación de bacterias API 50CH (BIOMETRIEUX). En este caso, “+” significa un azúcar asimilado, y “-” significa un azúcar sin asimilar en la tabla 2.

[Tabla 1]

Tabla 1

Morfología bacteriana	<i>Bacillus</i>
Tinción de Gram	Positiva
Movilidad	Ausente
Esporas	Ausentes
Esporas finales	Ausentes
Reacción de catalasa	Negativa
Crecimiento a 15°C	O
Crecimiento a 40°C	O

Crecimiento aerobio	O
Crecimiento anaerobio	O
pH en el crecimiento	3,0 – 12,5

[Tabla 2]

Actividad de asimilación de azúcar		Actividad de asimilación de azúcar		Actividad de asimilación de azúcar	
Glicerol	+	D-Manitol	+	D-Rafinosa	+
Eritritol	-	D-Sorbitol	+	Almidón	-
D-Arabinosa	-	Metil- α D-glucopiranosido	+	Glicógeno	-
L-Arabinosa	+	N-Acetilglucosamina	+	Xilitol	-
D-Ribosa	+	Amigdalina	+	Gentiobiosa	+
D-Xilosa	+	Arbutina	+	D-Turanosa	+
L-Xilosa	-	Citrato férrico-Asculina	+	D-Lixosa	-
D-Adonitol	-	Salicina	+	D-Tagatosa	-
Metil- β D-xilopiranosido	-	D-Celobiosa	+	D-Fucosa	-
D-Galactosa	+	D-Maltosa	+	L-Fucosa	-
D-Glucosa	+	D-Lactosa	+	D-Arabitól	-
D-Fructosa	+	D-Melibiosa	+	L-Arabitól	-
D-Manosa	+	D-Sacarosa	+	Gluconato	+
L-Sorbosa	-	D-Trehalosa	+	2-Cetogluconato	-
Dulcitol	-	Inulina	-	5-Cetogluconato	-
Inositol	-	D-Melecitosa	-		

Tal como se describe en detalle en los ejemplos expuestos a continuación, la cepa TUA4337L tiene las características de aumentar el número de bacterias excretadas en comparación con el número de bacterias ingeridas, en otras palabras, que tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal. Además, en cuanto a la capacidad de proliferación en el tracto intestinal, el número de bacterias tras un cultivo de 6 horas en una disolución intestinal artificial a 37°C es preferiblemente 10 veces o más, más preferiblemente 15 veces o más, incluso más preferiblemente 20 veces o más, y todavía incluso más preferiblemente 25 veces o más, del número de bacterias al inicio del cultivo de las bacterias usadas como patrón.

Además, la secuencia del gen *recA* (SEQ ID NO: 1) codificada a partir de ADN extraído de la cepa TUA4337L tiene el 99% de homología con la secuencia del gen *recA* de la cepa de *Lactobacillus pentosus* IG1. En este caso, la homología, tal como se usa en el presente documento, se muestra como un grado de similitud mediante puntuaciones que usan, por ejemplo, un programa de búsqueda BLAST que usa el algoritmo desarrollado por Altschul *et al.* (The Journal of Molecular Biology, 215, 403-410 (1990)).

El medio para cultivar la cepa TUA4337L no está particularmente limitado, y el medio incluye medios que contienen fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, nutrientes orgánicos comunes y similares. Además, el cultivo puede realizarse con un medio de agar o un medio líquido. La temperatura de cultivo es preferiblemente de desde 10° hasta 45°C, más preferiblemente desde 15° hasta 42°C, incluso más preferiblemente desde 28° hasta 38°C, e incluso más preferiblemente desde 35° hasta 37°C, y un pH proliferativo es preferiblemente un pH de desde 3,0 hasta 12,5, y más preferiblemente un pH de desde 3,5 hasta 12,0.

La cepa bacteriana de la presente invención incluye las propias bacterias del ácido láctico, incluyendo bacterias viables y bacterias muertas, y en diversas formas tales como inclusiones de bacterias del ácido láctico y células procesadas de bacterias del ácido láctico. Las bacterias viables pueden obtenerse a partir de inclusiones de bacterias del ácido láctico tales como un medio de cultivo que contiene bacterias del ácido láctico. Las bacterias muertas pueden obtenerse, por ejemplo, sometiendo bacterias viables a calentamiento, irradiación con ultravioleta, tratamiento con formalina, un tratamiento con ácido o similares. Las bacterias viables o bacterias muertas resultantes pueden producirse adicionalmente para dar células procesadas sometiendo las bacterias a molienda, trituración, o similares. En este caso, las bacterias del ácido láctico en cada una de las formas anteriores son preferiblemente bacterias viables desde el punto de vista de presentar de manera completa los efectos de proliferación en el tracto intestinal, y las bacterias muertas pueden mezclarse con las mismas.

Las bacterias del ácido láctico anteriores incluyen, por ejemplo, bacterias viables, bacterias húmedas, bacterias secas, y similares. Las inclusiones de bacterias del ácido láctico anteriores incluyen, por ejemplo, suspensiones de bacterias del ácido láctico, células cultivadas de bacterias del ácido láctico (incluyendo células bacterianas, sobrenadante y componentes del medio), y medios cultivados que contienen bacterias del ácido láctico (obtenidas retirando el contenido en sólidos de las células de bacterias cultivadas). Además, las células de bacterias del ácido láctico procesadas anteriores incluyen, por ejemplo, células molidas, células trituradas, células licuadas (extractos etc.), concentrados, células de tipo pasta, células secadas (células secadas por pulverización, células secadas por congelación, células secadas a vacío, células secadas en tambor, etc.), células diluidas, y similares.

Ejemplos

La presente invención se describirá específicamente a continuación en el presente documento mediante los ejemplos, sin pretender limitar el alcance de la presente invención a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 <Examen usando la capacidad de proliferación en disolución intestinal artificial como índice>

5 Entre las bacterias del ácido láctico de las que son propietarios los presentes inventores, se evaluó la capacidad de proliferación en una disolución intestinal artificial para aproximadamente 480 cepas que eran principalmente bacterias del ácido láctico vegetales (incluyendo cepas JCM).

10 Concretamente, en primer lugar, se inoculó cada una de las bacterias del ácido láctico a partir de una disolución madre en glicerol en un medio MRS (Difco Laboratories) (10 ml) en una cantidad del 1% v/v cada una, y se cultivaron las células bacterianas a 35°C durante de 16 a 17 horas. A continuación, se midió la DO₆₆₀ de cada medio de cultivo (absorbancia a 660 nm) con un espectrofotómetro UV-1600 (Shimadzu Corporation), y se inoculó una disolución de 100 µl preparada con el medio MRS, de modo que la DO₆₆₀ de cada medio de cultivo sería de 10, en una disolución intestinal artificial (10 ml) de la composición mostrada a continuación en el presente documento. Después de eso, se cultivaron las células bacterianas a 37°C durante 6 horas mientras se agitaba suavemente, y entonces se midió la DO₆₆₀ para obtener la cantidad de proliferación (DO₆₆₀ tras 6 horas/DO₆₆₀ en la inoculación). Los resultados representativos del examen se muestran en la tabla 3 y la figura 1.

<Disolución intestinal artificial (pH 6,45)>

Medio MRS	9 ml
Disolución de ácido biliar al 10% p/v (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	1 ml
20 Pancreatina al 1% p/v (de porcino: SIGMA)	100 µl

En este caso, se usaron la disolución de ácido biliar y la disolución de pancreatina, que se esterilizaron tratando la disolución con un filtro de 0,22 µm (membrana de PVDF, fabricada por Millipore).

[Tabla 3]

Tabla 3

Género, especie	Cepa	DO ₆₆₀ tras 6 horas	Cantidad de proliferación (veces) (DO ₆₆₀ tras 6 horas/DO ₆₆₀ en la inoculación)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	TUA4337L (presente invención)	2,93	29,3
	JCM1558	0,73	7,3
	1	1,55	15
	2	1,79	17,9
	3	1,54	15,4
	4	1,90	19,0
	5	1,68	16,8
	6	1,93	19,3
	7	1,60	16,0
	8	1,60	16,0
	9	1,78	17,8
	10	0,78	7,8
	11	1,68	16,8
	12	1,42	14,2
	13	1,37	13,7
<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	1,53	15,3
	16	1,63	16,3
	17	1,70	17,0
	18	1,42	14,2
	19	1,59	15,9
<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM1059	0,68	6,8
	20	1,18	11,8
	21	0,63	6,3
	22	0,58	5,8

	23	0,61	6,1
	24	0,65	6,5
<i>Lactobacillus casei</i>	JCM1134	0,14	1,4
	25	0,94	9,4
	26	0,10	1,0
	27	0,12	1,2
	28	0,12	1,2
	29	0,11	1,1
	30	0,13	1,3
<i>Lactobacillus fermentum</i>	JCM1173	0,27	2,7
	31	0,45	4,5
	32	0,45	4,5
	33	0,69	6,9
	34	0,93	9,3
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132		0,19	1,9
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> JCM1012		0,06	0,6
<i>Lactobacillus gasseri</i> JCM1131		0,08	0,8
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM1120		0,07	0,7
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM1136		0,17	1,7

Como resultado, puede observarse que la cantidad de proliferación es más probable que sea alta en *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum*, entre las que la cepa de *Lactobacillus pentosus* TUA4337L tiene una cantidad de proliferación especialmente alta y una excelente capacidad de proliferación en el tracto intestinal.

Ejemplo 2 <Evaluación de la capacidad de proliferación *in vivo* en el tracto intestinal>

- 5 A ratones sometidos a una dieta rica en grasas a voluntad se les administró la cepa TUA4337L preparada tal como sigue, y se cuantificó el número de bacterias excretadas. Concretamente, a ratones C57BL/6J (de 10 semanas de edad, machos) se les administró una única dosis con aproximadamente $1,0 \times 10^9$ células de bacterias del ácido láctico (correspondiente a 250 μ l de suspensión celular bacteriana) a las 10 de la mañana (n=5), usando la muestra de administración preparada tal como sigue.
- 10 <Preparación de muestras de administración (muestras que contienen bacterias viables)>
- [1] inocular la cepa TUA4337L a partir de una disolución madre en glicerol en un medio MRS (30 ml) en una cantidad del 1% v/v;
- [2] cultivar las células bacterianas (35°C, 20 horas);
- [3] centrifugar el medio de cultivo (8.000 rpm, 5 min) para retirar el sobrenadante, y suspender en 30 ml de PBS(-);
- 15 [4] centrifugar la suspensión de [3] (8.000 rpm, 5 min) para retirar el sobrenadante, y resuspender en 5 ml de PBS(-);
- [5] contar el número de bacterias con un microscopio; y
- [6] dispensar una disolución que contiene 20.000.000.000 células a un tubo de centrifugación de 15 ml, centrifugar (8.000 rpm, 5 min) la disolución para retirar el sobrenadante, y después de eso suspender en 5 ml de un alimento líquido (dieta rica en grasas de 60 kcal %FAT: dieta de investigación) para preparar una suspensión celular bacteriana (el alimento líquido se preparó con PBS(-)).
- 20 Después de eso, se recogieron todas las deposiciones de partes de dos días en 4 momentos divididos (la tarde del día que empezó la prueba, la mañana y la tarde del día siguiente, y la mañana del día después del último día), se cuantificó el número de bacterias para todas las deposiciones mediante el siguiente método, y se calculó la tasa de aumento de la cepa TUA4337L en el intestino en cada uno de los ratones (el número de bacterias para todas las deposiciones/el número de bacterias administradas). Los resultados se muestran en la tabla 4.
- 25 <Método para medir el número de bacterias según PCR en tiempo real>
- [1] añadir 1 ml de PBS(-) a 100 mg de deposiciones (en base de peso húmedo), y luego desbaratar las deposiciones con una espátula;
- 30 [2] recoger una porción de 100 mg de las deposiciones en un tubo Eppendorf (marca registrada), centrifugar (15.000 rpm, 5 min) las deposiciones para retirar el sobrenadante, y suspender la precipitación en 1 ml de PBS(-) (repetiéndose los procedimientos de centrifugar y suspender dos veces);
- [3] retirar el sobrenadante de la suspensión de [2], y después de eso extraer el ADN de la suspensión con un kit (QIAamp ADN Stool Mini Kit: QIAGEN)

(llevándose a cabo la rotura celular repitiendo los procedimientos tres veces de añadir 300 mg de perlas de vidrio (de 150 a 212 μm : SIGMA), 300 μl de fenol/cloroformo/ alcohol isoamílico (25:24:1) y 900 μl de tampón ASL (reactivos en el kit) a las deposiciones, centrifugar la mezcla con MULTI-BEADS SHOCKER MB-200 (YASUI KIKAI) a 3.000 rpm durante 1 minuto y dejar reposar en hielo durante 1 minuto); y

- 5 [4] cuantificar las bacterias del ácido láctico en el contenido del tracto intestinal según PCR en tiempo real en las condiciones mostradas a continuación en el presente documento:

((Condiciones para la PCR en tiempo real))

- 10 (1) Se mezclan diez microlitros de SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio), 0,8 μl de cada cebador (10 μM), 0,4 μl de tinte de referencia ROX II, 6 μl de agua estéril y 2 μl de una disolución de ADN, para preparar una mezcla de reacción líquida para PCR. Como cebadores, se usan los siguientes cebadores que detectan específicamente ADNr 16S de *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum* (siendo las secuencias de ADNr 16S de *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum* el 100% idénticas).

Cebador 1: 5'-GCAAGTCGAACGAACTCTGGTATT-3' (SEQ ID NO: 2)

Cebador 2: 5'-CGGACCATGCGGTCCAA-3' (SEQ ID NO: 3)

- 15 (2) Se realiza la PCR con el sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems), que comprende, posteriormente a un tratamiento a 95°C durante 30 segundos, llevar a cabo un total de 60 ciclos de reacciones, en los que un ciclo consiste en 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 34 segundos. El número de copias por un gramo del contenido del tracto intestinal se obtiene a partir de la intensidad de fluorescencia obtenida, la cantidad total de contenido del tracto intestinal y la cantidad de dilución.

- 20 (3) Por separado, se obtiene el número de copias de ADNr 16S por célula, y se convierte el número de copias en el número de bacterias. En este caso, se confirma en los ratones a los que no se administraron las bacterias del ácido láctico que no se detectan ni *Lactobacillus pentosus* ni *Lactobacillus plantarum* según la PCR en tiempo real anterior.

[Tabla 4]

Tabla 4

Individuo n.º	Número de bacterias de TUA4337L en las deposiciones (células)	Tasa aumentada (número de bacterias por deposiciones totales/número de bacterias administradas)
1	3,6 x 10 ⁹	3,6
2	1,9 x 10 ⁹	1,9
3	2,6 x 10 ⁹	2,6
4	1,6 x 10 ⁹	1,6
5	1,4 x 10 ⁹	1,4
Media	2,2 x 10 ⁹	2,2

- 25 Como resultado, pudo observarse que el número de bacterias en la excreción de la cepa de *Lactobacillus pentosus* TUA4337L es mayor que el número de bacterias ingeridas. A partir de estos hallazgos se sugirió que la cepa de *Lactobacillus pentosus* pasaba a través del estómago en un estado viable, proliferaba en el tracto intestinal y se excretaba.

Ejemplo 3 <Efectos del bloqueo del aumento de peso>

- 30 Se agruparon ratones C57BL/6J (de 8 semanas de edad, machos) en cuatro grupos de un grupo con dieta común, un grupo con dieta rica en grasas, un grupo con dieta rica en grasas + bacterias viables y un grupo con dieta rica en grasas + bacterias muertas (n = 10 cada uno), y a cada uno de los grupos se les proporcionaron de manera continua las dietas tal como se muestra en la siguiente tabla 5 durante 32 días, y se midieron diariamente los pesos corporales y se calculó una media. La transición en la media se muestra en la figura 2. En este caso, se realizaron comparaciones entre grupos usando una prueba de la t con un nivel significativo de 0,05.

- 35 Concretamente, en cuanto a la dieta, a cada grupo de la tabla 5 se le proporcionó cada alimento sólido a voluntad. Al grupo con dieta rica en grasas + bacterias viables se le administró una muestra de administración preparada de la misma manera que en el ejemplo 2. Al grupo con dieta rica en grasas + bacterias muertas se administró una muestra de administración preparada tal como sigue de modo que las bacterias del ácido láctico estuvieran contenidas en una cantidad de aproximadamente 1.000.000.000 células por día. Por otro lado, al grupo con dieta común se le administraron 250 μl de PBS(-) que no contenía las bacterias del ácido láctico, y al grupo con dieta rica en grasas se le administraron 250 μl de un alimento líquido que no contenía las bacterias del ácido láctico.

[Tabla 5]

Tabla 5

Grupo	Dieta	
	Dieta sólida	Bacterias del ácido láctico administradas
Grupo con dieta común	10 kcal %FAT	-
Grupo con dieta rica en grasas	60 kcal %FAT	-
Grupo con dieta rica en grasas + bacterias viables	60 kcal %FAT	Bacterias viables de TUA4337L
Grupo con dieta rica en grasas + bacterias muertas	60 kcal %FAT	Bacterias muertas de TUA4337L

* 10 kcal %FAT (dieta de investigación)

60 kcal %FAT (dieta de investigación)

<Preparación de muestras de administración (muestras que contienen bacterias muertas)>

5 [1] inocular la cepa TUA4337L en una cantidad del 1% v/v a partir de una disolución madre en glicerol en un medio MRS (30 ml);

[2] cultivar las células bacterianas (35°C durante 20 horas);

[3] centrifugar el medio de cultivo (8.000 rpm, 5 min) para retirar el sobrenadante, y después de eso suspender en 30 ml de PBS(-);

10 [4] centrifugar la suspensión de [3] (8.000 rpm, 5 min) para retirar el sobrenadante, y después de eso resuspender en 5 ml de PBS(-);

[5] contar el número de bacterias con un microscopio;

[6] dispensar una disolución que contiene 20.000.000.000 células a un tubo de centrifugación de 15 ml, centrifugar la disolución (8.000 rpm, 5 min) para retirar el sobrenadante, después de eso añadir 5 ml de un fluido gástrico adicional (NaCl 125 mM, KCl 7 mM, pH 1,0) a la misma, agitar la mezcla y dejar reposar durante 60 minutos; y

15 [7] centrifugar la disolución de [6] (8.000 rpm, 5 min) para retirar el sobrenadante, y después de eso suspender en 5 ml de un alimento líquido (60 kcal %FAT) para preparar una suspensión celular bacteriana.

20 Como resultado, el grupo al que se le administraron bacterias viables de TUA4337L mostró un efecto significativo de bloqueo del aumento de peso, en comparación con el control (el grupo con dieta rica en grasas). Además, la administración de bacterias viables fue más eficaz que la administración de bacterias muertas. Se considera que la cepa de *Lactobacillus pentosus* TUA4337L proliferó en el tracto intestinal, influyendo de ese modo de manera eficaz en el huésped.

Ejemplo 4 <Efectos del bloqueo de la absorción de grasas>

25 Se siguió proporcionando a cada uno de los constituyentes del grupo del grupo con dieta común, el grupo con dieta rica en grasas y el grupo con dieta rica en grasas + bacterias viables en el ejemplo 3 (n = 12 cada uno) el mismo contenido de dietas que en el ejemplo 3 durante 2 semanas. Después de eso, se dejó en ayunas a los grupos durante la noche, y se les administró un aceite de oliva (nacalai tesque) (5 ml/kg), y se diseccionaron adicionalmente tras 3 horas para recoger sueros de la vena cava. Se midieron los triglicéridos (TG) en los sueros con un dispositivo Triglyceride E-Test Wako (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.). Los resultados se muestran en la figura 3. En este caso, se realizaron comparaciones entre grupos mediante un juicio de diferencia significativa mediante una prueba de la t con un nivel significativo de 0,05.

35 Como resultado, se encontró que el grupo con dieta rica en grasas mostraba una clara probabilidad de aumentar los TG en sangre en comparación con el grupo con dieta común. Por tanto, se considera que si se continúa ingiriendo una dieta rica en grasas, el cuerpo absorbería más fácilmente una grasa. Además, se encontró que el grupo al que se administraron bacterias viables de TUA4337L había bloqueado el aumento de TG en sangre, en comparación con el control (grupo con dieta rica en grasas). Por tanto, se considera que uno de los mecanismos de los efectos de bloqueo de los aumentos de peso es el bloqueo de la absorción de grasas, que era eficaz incluso un día después de la administración de las bacterias viables de TUA4337L, de modo que se considera que presentan efectos de manera continua.

Aplicabilidad industrial

40 Puesto que las bacterias del ácido láctico de la presente invención tienen capacidad de proliferación en el tracto intestinal, cuando se ingieren en el cuerpo, las bacterias del ácido láctico sobreviven en el tracto intestinal y

proliferan, pudiendo bloquear de ese modo la absorción de grasas de manera continua, y pudiendo bloquear los aumentos de peso de manera eficaz, de modo que las bacterias del ácido láctico pueden usarse adecuadamente para los fines de efectos dietéticos.

Texto libre de secuencias

5 SEQ ID NO: 1 de la lista de secuencias es una secuencia de nucleótidos de *recA* de *Lactobacillus pentosus* TUA4337L.

SEQ ID NO: 2 de la lista de secuencias es una secuencia de nucleótidos de un cebador específico para *Lactobacillus pentosus/plantarum*.

10 SEQ ID NO: 3 de la lista de secuencias es una secuencia de nucleótidos de un cebador específico para *Lactobacillus pentosus/plautarum*.

Lista de secuencias

<110> SUNTORY HOLDINGS LIMITED

<120> Bacteria que pertenece al género *Lactobacillus*

<130> Y2629 EP S3

15 <140> Documento EP 14785480.6

<141> 16-04-2014

<150> Documento JP 2013-86575

<151> 17-04-2013

<160> 3

20 <170> PatentIn versión Ver. 3.3

<210> 1

<211> 535

<212> ADN

<213> *Lactobacillus pentosus* 4337L

25 <220>

<223> un gen que codifica para *recA* de *Lactobacillus pentosus* 4337L

<400> 1

gcgattatgc	ggatgggtga	cgctgcccag	acgaccattt	caacaatttc	cagcgggtca	60
ctagccttag	atgacgcatt	aggcgttgg	ggttaccac	gtggccgaat	cgttgaaatt	120
tatggccctg	aaagttccgg	taaaacgacc	gttgactac	acgcggtcgc	tgaagttcaa	180
aagcaaggcg	ggacggccgc	ctatatcgat	gctgaaaacg	ccttggatcc	ggtttacgcg	240
gaacatttag	gtgtcaacat	tgatgatttg	ttactttcac	aaccagatac	tggtgaacaa	300
ggtcttgaaa	tcgcggatgc	tttagtttcc	agtggcgcgg	ttgatattctt	agttgtcgat	360
tcagttgcgg	cgtagtagacc	acgggcccga	attgaaggtg	aaatgggtga	cgcccacgtt	420
ggnttacaag	cccggttaat	gncacaagcg	ttgcggaagt	tatccgggac	tttgaacaag	480
acaaagacca	tcgcactatt	tattaaccaa	attcgtgaaa	aagttggcgt	gatgt	535

<210> 2

30 <211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador para *Lactobacillus pentosus*

<400> 2

gcaagtcgaa cgaactctgg tatt

<211> 17

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador para *Lactobacillus pentosus*

<400> 3

cggacatgc ggtccaa

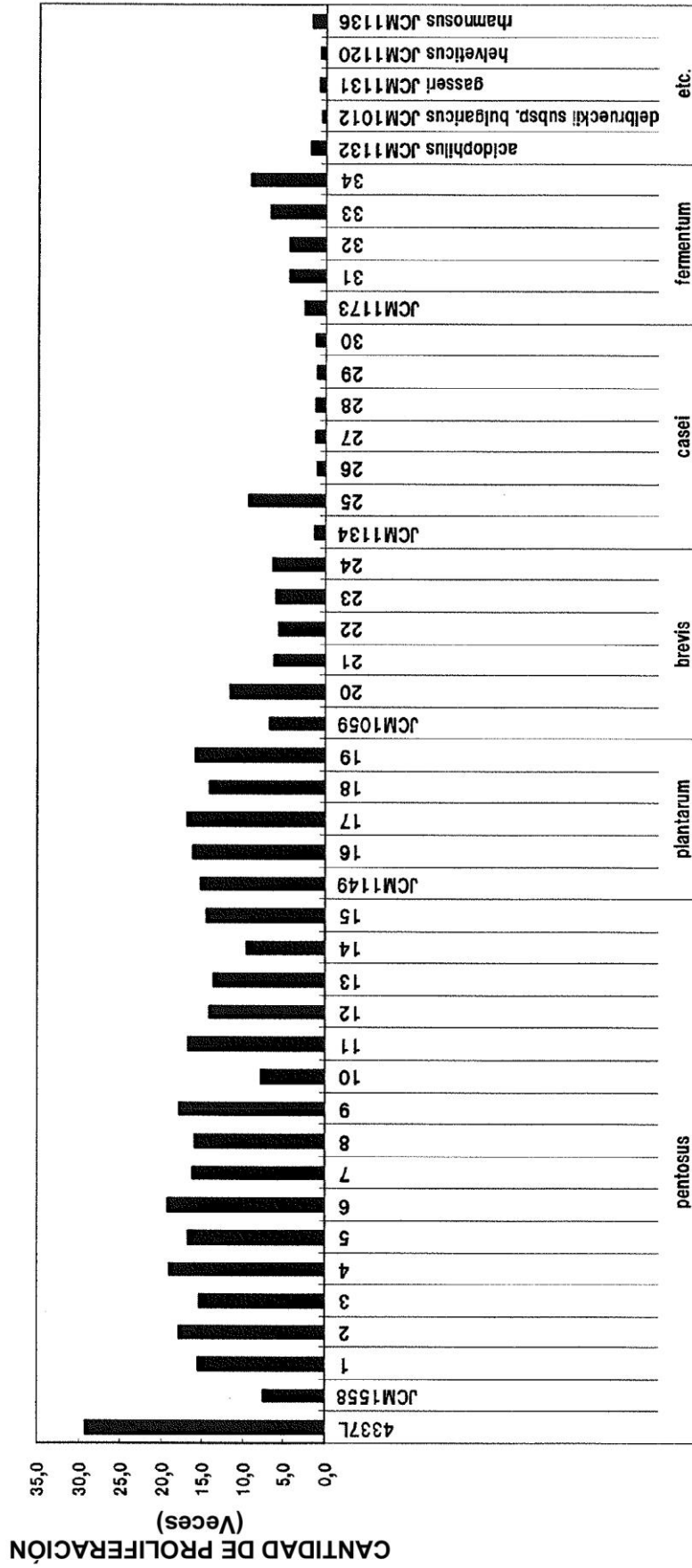
10

REIVINDICACIONES

1. *Lactobacillus pentosus* TUA4337L depositada con el número de registro NITE BP-1479, caracterizada porque la cepa tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal.

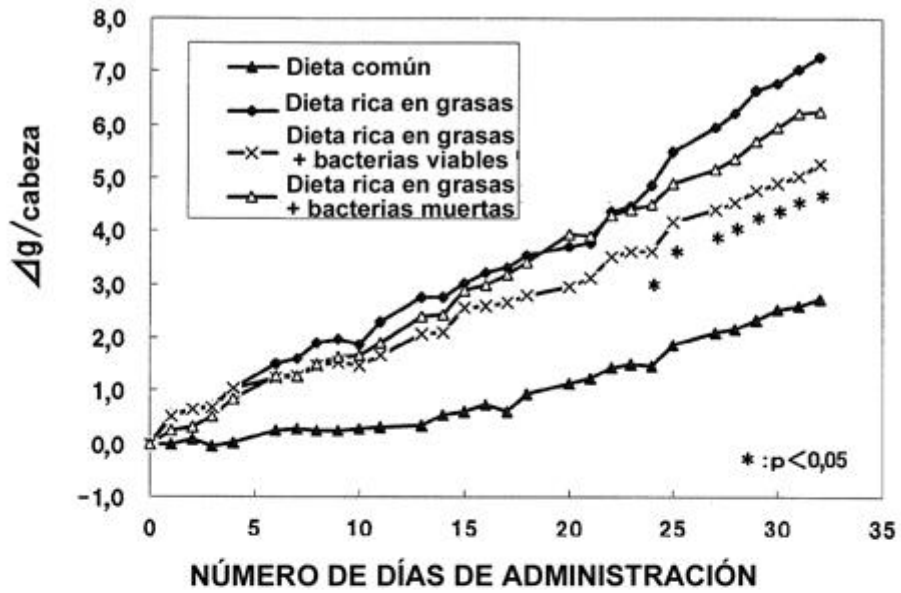
[FIG. 1]

FIG. 1



[FIG. 2]

FIG. 2



[FIG. 3]

FIG. 3

