



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 043**

51 Int. Cl.:
A23C 9/123 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08801453 .5**
96 Fecha de presentación : **06.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2173183**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2010**

54 Título: **Mejora del crecimiento de Bifidobacterias en productos de leche fermentada.**

30 Prioridad: **06.06.2007 EP 07109708**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.04.2011

73 Titular/es: **CHR. HANSEN A/S**
Bøge Allé 10-12
2970 Hörsholm, DK

72 Inventor/es: **Bezenger, Marie-Claude;**
Odinot, Jean-Marie y
Seimandi, Cécile

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 357 043 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).

ES 2 357 043 T3

DESCRIPCIÓN

Mejora del crecimiento de Bifidobacterias en productos de leche fermentada.

5 **Campo de la invención**

La presente invención consiste en mejorar el crecimiento de las Bifidobacterias por medio de cepas bacterianas seleccionadas en productos de leche fermentada.

10 **Antecedentes de la invención**

Los productos lácteos y específicamente los productos similares al yogur forman ampliamente la sección más importante del mercado de los productos probióticos. Los productos lácteos son productos excelentes para la entrega de bacterias probióticas útiles tales como las Bifidobacterias y su introducirlos en el tubo digestivo.

La Bifidobacterium BB-12[®] es una bacteria probiótica muy conocida. En el caso de la BB-12[®] la evidencia clínica disponible indica que se requiere al menos 10⁸ cfu de bacterias probióticas viables por gramo de producto lácteo fermentado. En consecuencia, es deseable tener al menos 10⁸ cfu de células vitales de bacterias probióticas por gramo de producto lácteo fermentado (por ejemplo un producto de yogur a base de leche fermentada).

El documento EP111392B1 divulga la selección de cepas de *Streptococcus thermophilus* de tipo salvaje que poseen una capacidad de absorción de un nivel de oxígeno relativamente alto mejorando así la supervivencia de una especie de Bifidobacterium estrictamente anaeróbica cuando este última se combina con la cepa de *Streptococcus* durante la fermentación de la leche.

Resumen de la invención

El problema que debe ser resuelto por la presente invención consiste en proveer un método para mejorar el crecimiento de la población de Bifidobacterias en la leche durante el proceso de fermentación para la producción de productos lácteos fermentados (por ejemplo un yogur) con el fin de obtener un alto contenido de células de Bifidobacterias en el producto final.

La solución se basa en el descubrimiento sorprendente de los presentes inventores de que una cepa de un *Streptococcus thermophilus* específico ST6008 (DSM 18111) mejora considerablemente el crecimiento de las Bifidobacterias durante la fermentación de la leche. Mediante el uso de esta cepa el producto lácteo fermentado resultante contendrá más de 10⁸ cfu/g de Bifidobacterias (directamente después de la fermentación). Por consiguiente, no es necesario añadir una cantidad extra de Bifidobacterias después del final de la fermentación para obtener un producto con 10⁸ cfu/g de Bifidobacterias.

Los inventores han testado una serie de diferentes *S. thermophilus* (16 en total) y descubierto que sólo la cepa identificada como cepa de *Streptococcus thermophilus* (ST6008) y depositada DSM18111 mejoraba considerablemente el crecimiento de las Bifidobacterias durante la fermentación de la leche. Efectivamente, otras cepas de *Streptococcus thermophilus* tienen una influencia negativa sobre el crecimiento de las Bifidobacterias.

Además, los inventores han observado de manera inesperada que ST6008 tiene una característica única, donde la cepa se puede agrega a la leche en cantidad muy elevada de cfu/g (y propagar a contenidos celulares muy altos) sin cambiar las características de los productos lácteos fermentados, como por ejemplo el pH y la post-acidificación. Las otras cepas ST testadas no tenían esta ventaja adicional.

En consecuencia, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para la preparación de un producto lácteo fermentado, como un producto comprendiendo al menos 10⁸ cfu de Bifidobacterias por gramo de producto lácteo fermentado, donde el método comprende:

- i) la inoculación de la leche con un cultivo (tal como un cultivo de yogur) comprendiendo al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus*, al menos una cepa de Bifidobacterium y opcionalmente al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus*, donde una de las cepas susodichas de *Streptococcus thermophilus* se selecciona en el grupo que consiste en: una cepa de *Streptococcus thermophilus* ST6008 con número de registro DSM18111, un mutante de ST6008, y una variante de ST6008;
- ii) la fermentación de la leche en condiciones adecuadas; y
- 65 iii) opcionalmente el envasado de una cantidad idónea del producto lácteo fermentado en un envase adecuado. Una forma de realización interesante se refiere a un método de preparación de un producto lácteo fermentado comprendiendo al menos 10⁸ cfu de Bifidobacterias por gramo de producto lácteo fermentado, donde el método comprende:

ES 2 357 043 T3

- i) la inoculación de la leche con un cultivo de yogur comprendiendo al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus*, al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* y al menos una cepa de Bifidobacterium, donde una de dichas cepas de *Streptococcus thermophilus* es una cepa de *Streptococcus thermophilus* ST6008 con el número de registro DSM18111;
- ii) la fermentación de la leche en condiciones adecuadas para obtener un producto lácteo fermentado con al menos 10⁸ cfu de Bifidobacterias por gramo de leche fermentada; y
- iii) la confección de una cantidad adecuada del producto lácteo fermentado en un envase adecuado.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a la cepa ST6008 y a mutantes/variantes de esta última, y a un cultivo (tal como un cultivo láctico) comprendiendo una cepa de la invención, opcionalmente junto a otra cepa, como una cepa de Bifidobacterium (por ejemplo BB-12). Una composición interesante comprende i) de 10⁵ a 10¹² cfu/g de BB-12 e ii) de 10⁵ a 10¹² cfu/g de ST6008.

Divulgación detallada

La presente invención se refiere, en su aspecto más amplio, a un método para la preparación de un producto lácteo fermentado, que comprende:

- i) la inoculación de la leche con una cepa de *Bifidobacterium*, y una cepa de *Streptococcus thermophilus* seleccionada en el grupo que consiste en: una cepa de *Streptococcus thermophilus* ST6008 con el número de depósito DSM18111, un mutante de ST6008 y una variante de ST6008 (como una cepa mutante/variante que tiene una o más (preferiblemente; todas) las características de la cepa de *S. thermophilus* ST6008, por ejemplo la cepa mutante y/o variante es capaz de impulsar el crecimiento de una cepa de Bifidobacterium);
- ii) la fermentación de la leche;
- iii) añadir opcionalmente otros microorganismos y/o aditivos a la leche fermentada; y
- iv) envasar opcionalmente el producto lácteo fermentado. En una forma de realización preferida actualmente, la fase i) comprende también la inoculación de la leche con una cepa de *Lactobacillus bulgaricus*.

Una otra forma de realización se refiere a un método de preparación de un producto lácteo fermentado, tal como un producto comprendiendo al menos 10⁸ cfu de Bifidobacterias por gramo de producto lácteo fermentado, donde el método comprende:

- i) la inoculación de la leche con un cultivo (tal como un cultivo de yogur) comprendiendo al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus*, al menos una cepa de Bifidobacterium y opcionalmente al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus*, donde dicha cepa de *Streptococcus thermophilus* se selecciona en el grupo que consiste en: una cepa de *Streptococcus thermophilus* ST6008 con un número de registro DSM18111, un mutante de ST6008, y una variante de ST6008;
- ii) la fermentación de la leche en condiciones adecuadas; y
- iii) opcionalmente el envasado de una cantidad idónea del producto lácteo fermentado en un envase adecuado.

Otra forma de realización se refiere a un método de preparación de un producto lácteo fermentado comprendiendo al menos 10⁸ cfu de Bifidobacterias por gramo de producto lácteo fermentado donde el método comprende:

- i) la inoculación de la leche con un cultivo de yogur comprendiendo al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus*, al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* y al menos una cepa de Bifidobacterium, donde dicha cepa de *Streptococcus thermophilus* es la cepa de *Streptococcus thermophilus* ST6008 con el número de registro DSM18111;
- ii) la fermentación de la leche en condiciones adecuadas para obtener un producto lácteo fermentado con al menos 10⁸ cfu de Bifidobacterias por gramo de leche fermentada; y
- iii) el envasado de una cantidad idónea del producto lácteo fermentado en un envase adecuado.

La cepa de Bifidobacterium pertenece preferiblemente a una especie seleccionada en el grupo que se constituye de *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bi-*

ES 2 357 043 T3

Bifidobacterium breve, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, y se prefiere actualmente que la cepa de *Bifidobacterium* sea una cepa de *Bifidobacterium animalis* de subespecie *Lactis*. Ejemplos de cepas son cepas seleccionadas en el grupo que se constituye de CHCC5445 (BB-12) con el número de registro DSM15954 CHCC7158 (HN019, número de depósito DSM17280), una cepa de *Bifidobacterium* depositada como ATCC 27536, una cepa de *Bifidobacterium infantis* Bbi99 (DSM 13692), BB-420 BI-04 CHCC2037, LAFTI B-94, DN 173 010, STB-2938, R0071, R0175, y BB-46, y de un mutante de cada una de estas cepas.

En una forma de realización útil, el producto lácteo fermentado obtenido contiene al menos 10^8 cfu de Bifidobacterias por gramo de producto lácteo fermentado al terminar la fermentación, y/o el producto lácteo fermentado contiene al menos 10^8 cfu/g de bifidobacterias después de 28 días de almacenamiento a + 6°C.

Según una forma de realización importante del presente método, la leche en la fase i) se inocula con 10^5 a 3×10^7 cfu/g de *Bifidobacterium* y/o con 10^4 a 3.5×10^6 cfu/g de *Streptococcus thermophilus*. La leche se puede inocular simultáneamente con las especies bacterianas. Esto se realiza adecuadamente mediante la inoculación de la leche con un cultivo láctico comprendiendo ambas especies bacterianas.

En otra forma de realización, la leche se inocula también con al menos una cepa bacteriana, tal como una cepa de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* (por ejemplo seleccionada en grupo que se constituye de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN224; *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN223 y una cepa mutante o variante de cada una de estas últimas). Se prefiere actualmente que este organismo auxiliar extra sea una cepa de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* seleccionada en el grupo que se constituye de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN224, *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN223.

Un producto obtenido con el presente método de la invención puede ser definido como “yogur”, es decir cuando la leche se inocula con una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* y una cepa de *Streptococcus thermophilus*.

El producto lácteo fermentado (como por ejemplo el yogur) se envasa adecuadamente en un envase estanco que contiene de 25 a 3000 ml del producto, como por ejemplo de 50 a 1000 ml.

La invención se refiere también a un cultivo (tal como un cultivo láctico) comprendiendo de 10^5 a 10^{12} cfu/g BB-12 y de 10^5 a 10^{12} cfu/g de ST6008. el cultivo puede comprender también de 10^5 a 10^{12} cfu/g de DN224 o DN223.

Un aspecto ulterior de la presente invención se refiere a un producto lácteo fermentado obtenible con el método de la invención, y a un producto lácteo fermentado comprendiendo una cepa de *Streptococcus thermophilus* seleccionada en el grupo que consiste en ST6008 (DSM18111); un mutante de ST6008 y una variante de ST6008. De preferencia actualmente, el producto lácteo fermentado de la invención comprende de 10^3 a 10^{10} cfu/g de la cepa de *Streptococcus thermophilus*. El producto lácteo fermentado de la presente invención puede comprender también de 10^3 a 10^{10} cfu/g de Bifidobacterias y/o de 10^3 a 10^{10} cfu/g de una cepa de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* (como por ejemplo DN224 o DN223).

En un último aspecto, la presente invención se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* seleccionada en el grupo que se constituye de ST6008 (DSM18111), un mutante de ST6008 y una variante de ST6008 (como una cepa de mutante/variante que tiene una o más (preferiblemente todas) características de la cepa *S. thermophilus* ST6008, por ejemplo la cepa de mutante/variante capaz de promover el crecimiento de una cepa de *Bifidobacterium* (esp. BB-12). La cepa puede tener una forma aislada, por ejemplo sustancialmente libre de otras cepas bacterianas.

Bifidobacterium

En una forma de realización preferida el *Bifidobacterium* es al menos un *Bifidobacterium* seleccionado en el grupo que consiste en *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. También se puede usar una mezcla que comprende dos o más de estas cepas citadas.

En la forma de realización preferida del método la cepa de *Bifidobacterium* es una cepa de *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis*. En particular, donde la cepa es una cepa de *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* BB-12 (CHCC5445) depositada con el número de registro DSM15954.

Otra cepa preferida de *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* es la cepa HN019 (también conocida como DR-10™ o HOWARU™). La cepa ha sido aislada de un producto de fórmula infantil disponible comercialmente designado Fernleaf DR- 10 bifidus que se ha vendido en Taiwán en el año 2000. Tiene el número de registro CHCC7158 en la colección de cultivos Hansen y se deposita con DSMZ con el número de adhesión DSM17280.

ES 2 357 043 T3

Medición cfu/g de bifidobacterias

La medición del contenido de células cfu/g de Bifidobacterias se efectúa calculando el número de Unidades de la Formación de Colonias (Colony Forming Unit - cfu) en diluciones en serie del producto fermentado a través del cálculo de la colonia en placas de agar, según los métodos estándar en la técnica. El medio de cultivo adecuado y la incubación se indican a continuación:

Medio de cultivo: MRS (de Man *et al.* 1960. J. Appl. Bacteriol. 23:130) sin ácido + 1% de didoxacilina (sigma D-9016) + 1% cisteína (MERCK n° 2839); e

Incubación: 3 días a 37°C en condiciones anaeróbicas.

Como mencionado en la presente, el uso de ST6008 provee la posibilidad de obtener más de 10^8 cfu/g de Bifidobacterias directamente del crecimiento de Bifidobacterias durante la fermentación. En consecuencia, al menos 10^8 cfu/g de Bifidobacterias de la fase ii) del primer aspecto se refiere a las cfu/g de Bifidobacterias obtenidas directamente después de la fermentación.

Como mostrado en los ejemplos de elaboración, el Bifidobacterium BB-12 tiene un buen índice de supervivencia durante el crecimiento junto a ST6008.

En consecuencia, en una forma de realización preferida, el producto lácteo fermentado tiene al menos 10^8 cfu/g de Bifidobacterias después de 1 día de almacenaje a +6°C, más preferiblemente al menos 10^8 cfu/g de Bifidobacterias después de 7 días de almacenaje a +6°C, aún más preferiblemente al menos 10^8 cfu/g de bifidobacterias después de 14 días de almacenaje a + 6°C, aún más preferiblemente al menos 10^8 cfu/g de bifidobacterias después de 21 días de almacenaje a + 6°C y más preferiblemente al menos 10^8 cfu/g de Bifidobacterias después de 28 días de almacenaje a +6°C.

Condiciones adecuadas de fermentación

En general, el experto en la técnica conoce las condiciones adecuadas de fermentación para fermentar la leche con las bacterias relativas indicadas aquí.

Las condiciones adecuadas de la presente son por ejemplo cuando la leche se inocula con las bacterias y se fermenta desde 38°C hasta 43°C con la temperatura óptima de 40°C, hasta alcanzar un pH de 4.4 a 4.6 (aproximadamente después de unas 8 horas).

El enfriamiento de la leche a +6°C detiene la fermentación y el crecimiento de las bacterias relativas mencionadas aquí tales como las Bifidobacterias.

En una forma de realización preferida el crecimiento mejorado descrito aquí se obtiene

por inoculación de 10^5 a 3×10^7 de cfu/g de Bifidobacterium; y

por inoculación simultáneamente de ST6008 en una concentración de 10^4 a 3.5×10^6 de cfu/g.

Si se desea, se puede añadir una cantidad extra de bacterias (por ejemplo una cantidad extra de Bifidobacterium) en algunos puntos de interés (por ejemplo después de terminar la fermentación).

Producto lácteo fermentado

Es conocido por el experto en la técnica que varios productos lácteos fermentados diferentes se pueden obtener mediante la fermentación de la leche.

En una forma de realización preferida el producto lácteo fermentado es un producto seleccionado en el grupo que consiste en yogur, yogur para beber, yogur cremoso, yogur firme y yogur en forma de bebida, leche amarga, suero de mantequilla, nata ácida, queso fresco y queso.

La leche fermentada comprendiendo al menos 10^8 cfu/g de Bifidobacterias tal y como se describe aquí se puede usar también en forma de aditivo de producto por ejemplo dispuesto en otros productos alimenticios comestibles tales como quesos cuajados, chocolates, zumos, productos cárnicos y productos de leche en polvo para bebés.

ES 2 357 043 T3

Lactobacillus Bulgaricus

En el presente contexto el *Lactobacillus bulgaricus* puede ser cualquier cepa de *Lactobacillus bulgaricus* adecuada (por ejemplo disponible comercialmente).

Es conocido por el experto en la técnica que se puede inocular en cantidades adecuadas para obtener una cantidad apropiada de *Lactobacillus bulgaricus* en el producto lácteo fermentado final.

10 Adición de otra especie de bacterias como por ejemplo cepas auxiliares

En el método descrito en la presente, se pueden añadir otras bacterias de interés. Tales bacterias se pueden añadir durante la fermentación o después de terminar la fermentación.

15 Ejemplos de estas bacterias adicionales incluyen una bacteria seleccionada en la lista que consiste en *Lactococcus* y *Lactobacillus*.

Un *Lactobacillus* preferido es una cepa de *Lactobacillus acidophilus* como LA-5® (comercialmente disponible de Chr. Hansen A/S, Dinamarca).

20 Como se describe en WO98/54337 (Chr. Hansen, patente concedida EP0985043 B1), un organismo auxiliar bacteriano de ácido láctico defectuoso en su metabolismo de piruvato se puede añadir durante la fermentación para obtener un número de mejoramientos, incluyendo la mejoría de la duración de vida de almacenamiento de las bacterias. Las cepas DN224 (depositadas como DSM 11037) y DN223 (depositadas como DSM 11036), que son defectuosas en su metabolismo de piruvato, se describen como ejemplo de organismos auxiliares bacterianos adecuados.

En consecuencia, en una forma de realización preferida un organismo auxiliar bacteriano de ácido láctico defectuoso en su metabolismo de piruvato se añade también a la leche para ser fermentado tal y como se describe en la presente.

30 En una forma de realización preferida el organismo auxiliar bacteriano de ácido láctico es una bacteria seleccionada en el grupo que consiste en la cepa *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN223 depositada con el número de registro DSM 11036 y la cepa de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN224 (depositada con el número DSM 11037). Más preferiblemente, el organismo auxiliar bacteriano de ácido láctico es DN224.

Una forma de realización se refiere a un cultivo comprendiendo:

- 40 i) de 105 a 1012 cfu/g de BB-12 y
- ii) de 105 a 1012 cfu/g ST6008
- iii) de 105 a 1012 cfu/g de DN224.

45 Organismos microbianos depositados [Solución Experta]

Cepa de *Streptococcus thermophilus* ST6008

50 Una muestra de la cepa ST6008 de *Streptococcus thermophilus* (ST) ha sido depositada por DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania) con el número de registro DSM 18111 con fecha de depósito del 29 marzo 2006. El depósito se ha realizado según las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Objetivos relativos al Procedimiento para el Depósito de Patentes.

55 El solicitante requiere que una muestra de los microorganismos depositados sea disponible sólo por emisión de una muestra para un experto autorizado por el Solicitante y/o por la Oficina de Patentes.

60 Definiciones

En el contexto presente, un cultivo láctico de yogur es un cultivo bacteriano que comprende al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* y al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus*. En conformidad con lo citado, un yogur es un producto lácteo fermentado obtenible por inoculación y fermentación de la leche con una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* y una cepa de *Streptococcus thermophilus*.

En el contexto presente, el término “envasado” (una cantidad adecuada de) leche fermentada en un envase adecuado se refiere simplemente al envasado final de la leche fermentada para obtener un producto que puede ser ingerido por

ES 2 357 043 T3

ejemplo por una persona. Podría ser el caso del producto lácteo fermentado cuando es un yogur de bebida envasado por ejemplo en un pequeño recipiente, por ejemplo de 100 ml.

5 En el contexto presente, el término “mutante” indicará una cepa derivada de una cepa de la invención por ejemplo a través de la ingeniería genética, la radiación y/o el tratamiento químico. Preferiblemente, el mutante es un mutante funcionalmente equivalente, por ejemplo un mutante que tiene sustancialmente las mismas propiedades de impulsión del crecimiento de *Bifidobacterium* como la cepa madre. Tal mutante es una parte de la presente invención. Especialmente, el término “mutante” se refiere a una cepa obtenida mediante la exposición de la cepa ST6008 de la invención a cualquier tratamiento de mutagenización usado convencionalmente que incluye el tratamiento con un mutágeno químico como por ejemplo el Etil metano sulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), la luz UV o un mutante presente espontáneamente.

15 En el contexto presente, el término “variante” indicará la cepa que es funcionalmente equivalente a la cepa madre. Por ejemplo, una variante de ST6008 indicará una cepa de *Streptococcus thermophilus* funcionalmente equivalente a ST6008, por ejemplo tiene las mismas o sustancialmente las mismas propiedades de impulsión al crecimiento de *Bifidobacterium* que la cepa madre. Tal variante es una parte de la presente invención.

20 Ejemplos

Ejemplo 1

Mejoramiento del crecimiento mediante el uso de Streptococcus thermophilus ST6008

25 *Método y materiales*

Cantidad de bacterias en 100 litros de leche

30 10 g de BB-12[®] de 10¹¹ cfu/g se añadieron a 100 litros de leche (10⁵ ml). Esto produce 10⁷ cfu/g de BB-12[®] en la leche. Para ST6008, mismo procedimiento, 2 g de ST6008 con 10⁹ a 10¹⁰ cfu/g en esos mismos 100 litros de leche, alcanzando así 2x10⁴ a 2x10⁵ cfu/g de ST6008 de concentración final. Para DN224, 10¹¹ cfu/g, 3 gramos añadidos (0 ml) a 100 litros (105 ml), el resultado es 3x10⁶ cfu/g.

35 Fermentación a 40°C hasta alcanzar un pH 4.55 durante aproximadamente 8 horas. El producto es después agitado y envasado en vasos, posteriormente almacenado a +6°C para estudiar la duración de vida de almacenamiento (hasta 45 días). Los experimentos se realizaron con muestras de yogur en una escala de 200 ml y 3 litros.

40

(Tabla pasa página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 357 043 T3

TABLA 1

Cultivos de yogur usados en los experimentos

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Nombre experimento	Nivel de inoculación de yogur culture	Nombre de cultivo de yogur	ST6008 2 g / 100 l leche	DN224 3g/100 l leche	Bifidobacterium BB-12 [®] 10g/100l leche final
CH YT1	20 g / 100 l leche	F-DVS YFL-702			x
CH YT1 + DN-224	20 g / 100 l leche	F-DVS YFL-702		x	x
YT especial incluyendo DN-224 y ST-6008	20 g / 100 l leche	YT especial			x
CH YT1 + ST-6008	20 g / 100 l leche	F-DVS YFL-702	x		x
CH YT2	20 g / 100 l leche	F-DVS Y-051054			x
CH YT2 + DN-224	20 g / 100 l leche	F-DVS Y-051054		x	x
CH YT2 + ST-6008	20 g / 100 l leche	F-DVS Y-051054	x		x

F-DVS YFL-702 es un cultivo de yogur comercialmente disponible en Chr. Hansen A/S, Dinamarca, que contiene *Lactobacillus bulgaricus*, y *Streptococcus thermophilus*.

YT especial: un cultivo de yogur experimental comprendiendo *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* ST6008, *Lactococcus lactis* DN224.

F-DVS Y-051054 es un cultivo de yogur comercialmente disponible de Chr. Hansen A/S, Dinamarca que contiene *Lactobacillus bulgaricus*, y *Streptococcus thermophilus*.

ES 2 357 043 T3

El cálculo de las células BB-12 se ha realizado por dilución de la muestra de yogur en un diluyente a base de triptona y por deposición sucesiva de las diluciones apropiadas en placas agar MRS sin ácido con la adición de 1% de dicloxacilina (Sigma D-9016) y 1% de cisteína HCl. Las placas agar fueron incubadas durante 3 días a 37 grados Celsius en condiciones anaeróbicas.

5

Resultados

Los resultados se muestran en la tabla 2.

10

TABLA 2

Crecimiento de BB-12[®] y estabilidad mejorados en un producto lácteo a base de leche fermentada

15

		D+1	D+7	D+14	D+21	D+28	D+45
200 ml a escala de laboratorio	CH YT1	4,30E+07	4,30E+07	4,70E+07	3,45E+07	7,50E+06	5,55E+06
	CH YT1 + DN-224	1,31E+08	8,80E+07	6,70E+07	7,55E+07	3,50E+07	2,69E+07
	Especial YT incluyendo DN-224/ST- 6008	2,73E+08	2,88E+08	1,37E+08	1,22E+08	1,30E+08	8,00E+07
Escala 3 L	CH YT1	8,50E+07	7,40E+07	5,90E+07	6,00E+07	3,70E+07	3,20E+07
	CH YT1 + DN-224	7,80E+07	9,20E+07	8,00E+07	7,20E+07	5,30E+07	2,40E+07
	CH YT1 + ST- 6008	1,37E+08	1,28E+08	1,20E+08	1,10E+08	1,04E+08	8,00E+07
	CH YT2	5,60E+07	1,55E+07	1,90E+07	1,30E+07	2,45E+07	2,40E+07
	CH YT2 + DN-224	1,11E+08	1,08E+08	9,20E+07	6,30E+07	5,50E+07	4,80E+07
	CH YT2 + ST- 6008	1,14E+08	1,17E+08	1,23E+08	9,60E+07	1,16E+08	5,90E+07
	YT especial incluyendo DN-224/ST- 6008	1,19E+08	1,22E+08	1,58E+08	1,25E+08	1,38E+08	1,02E+08

65

Los resultados demuestran que ST6008 mejora notablemente el crecimiento de BB-12. D+1, D+7, ..., D+45 designan la determinación del número de Bifidobacterias (cfu/g) después de 1, 7, ..., 45 días de almacenamiento a +6 grados

ES 2 357 043 T3

Celsius. El resultado muestra el crecimiento de BB-12 y la estabilidad ambos mejorados en un producto lácteo a base de leche fermentada preparada con un cultivo láctico comprendiendo ST6008 tal y como se describe en la presente, en comparación con cultivos lácticos comercialmente disponibles sin ST6008. Como se puede ver en la tabla 2, cuando se usa ST6008 se puede obtener más de 10^8 cfu/g de *Bifidobacterium* (aquí BB-12).

Crecimiento mejorado de BB-12 por adición de ST6008

La tabla 2 muestra claramente el efecto de mejora del crecimiento de ST6008 en una preparación de yogur CHYT1.

En una escala de 3 litros

Como se puede comprobar para CHYT1, directamente después del día D+1, los niveles de BB-12 son significativamente más elevados con el uso de ST6008 (1.37×10^8 cfu/g con ST6008) en comparación con 7.8×10^7 cfu/g sin ST6008. Este nivel 10^8 cfu/g además se mantiene después hasta 28 días en almacenamiento.

Un efecto similar se comprueba para CHYT2.

Conclusión

ST6008 mejora el crecimiento de la *Bifidobacterium* BB-12[®] durante la fermentación para al menos 10^8 cfu/g en productos lácteos fermentados.

Referencias

1. EP111392B1

2. WO98/54337 (Chr. Hansen)

3. **Saxelin** M. *et al.*: The technology of probiotics. *Trends in food science and technology*, vol. 10, 1991, pages 387- 392

4. **Martin-Diana** A. B. *et al.*: Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, vol. 13, 2003, pages 827-833

5. US 4588595 A (**Okonogi** Shigeo (JP) *et al.*)

6. US 2005/031735 A1 (**Serata** Masaki (JP) *et al.*)

7. US 4187321 A (**Mada** Mitsuo (JP) *et al.*)

8. US 5230912 A (**Yajima** Masako (JP) *et al.*)

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 111392 B1 [0004] [0062]

- WO 9854337 A [0043] [0062]

- EP 0985043 B1, Chr. Hansen [0043]

- US 4588595 A, Okonogi Shigeo [0062]

- US 2005031735 A1, Serata Masaki [0062]

- US 4187321 A, Mada Mitsuo [0062]

- US 5230912 A, Yajima Masako [0062]

Documentos no patentados citados en la descripción

- de **Man** *et al.* *J. Appl. Bacteriol.*, 1960, vol. 23, 130 [0026]

5 - **Saxelin** M. *et al.* The technology of probiotics *Trends in food science and technology*, 1991, vol. 10, 387-392 [0062]

10 - **Martin-Diana** A. B. *et al.* Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria *Int. Dairy J.*, 2003, vol. 13, 827-833 [0062]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para la preparación de un producto de leche fermentada, que comprende:

- 5 i) la inoculación de la leche con
una cepa de *Bifidobacterium*, y
10 una cepa de *Streptococcus thermophilus* seleccionado en el grupo que consiste en: una cepa de *Streptococcus thermophilus* ST6008 con número de depósito DSM18111, un mutante de ST6008 y una variante de ST6008;
- 15 ii) la fermentación de la leche;
- 15 iii) la adición opcional de microorganismos y/o aditivos posteriores a la leche fermentada; y
- iv) el envasado opcional del producto de leche fermentada.

20 2. Método según la reivindicación 1, donde la fase i) comprende también la inoculación de la leche con una cepa de *Lactobacillus bulgaricus*.

25 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la preparación de un producto de leche fermentada, tal como un producto que comprende al menos 10^8 cfu de Bifidobacterias por gramo de producto de leche fermentada, método comprendiendo:

- 30 i) la inoculación de la leche con un cultivo que incluye al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus*, al menos una cepa de *Bifidobacterium* y opcionalmente al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus*, donde dicha cepa de *Streptococcus thermophilus* se selecciona en el grupo constituido de: una cepa de *Streptococcus thermophilus* ST6008, un mutante de ST6008, y una variante de ST6008;
- 35 ii) la fermentación de la leche en condiciones adecuadas; y
- iii) el envasado opcional de una cantidad adecuada del producto de leche fermentada en un envase adecuado.

40 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la cepa de *Bifidobacterium* es una cepa de *Bifidobacterium animalis* subespecie *Lactis*.

5. Método según la reivindicación precedente, donde la cepa de *Bifidobacterium* se selecciona en el grupo que constituido de CHCC5445 con número de registro DSM 15954 (BB-12[®]), CHCC7158 con número de registro DSM 17280, y un mutante de cada una de estas cepas.

45 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el producto de leche fermentada contiene al menos 10^8 cfu de Bifidobacterias por gramo de producto de leche fermentada.

50 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el producto de leche fermentada contiene al menos 10^8 cfu/g de Bifidobacterias después de 28 días de almacenamiento a +6°C.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la leche de la fase i) se inocula con 10^5 a 3×10^7 cfu/g de *Bifidobacterium* y/o con 10^4 a 3.5×10^6 cfu/g de *Streptococcus thermophilus*.

55 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde en la fase i) la leche se inocula posteriormente con al menos una cepa bacteriana, tal como una cepa de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* (por ejemplo seleccionada en el grupo constituido de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN224, de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN223 y una cepa de un mutante o de una variante de cada una de éstas).

60 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el producto de leche fermentada se envasa en un envase estanco que contiene de 25 a 3000 ml del producto.

11. Cultivo comprendiendo:

- 65 i) de 10^5 a 10^{12} cfu/g de cepa de *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* BB-12[®] con número de registro DSM 15954 y

ES 2 357 043 T3

ii) de 10^5 a 10^{12} cfu/g de cepa de *Streptococcus thermophilus* ST6008.

12. Cultivo según la reivindicación precedente, que comprende también:

iii) de 10^5 a 10^{22} cfu/g de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN224 o *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN223.

13. Producto de leche fermentada que puede ser obtenido a través del método de cualquier reivindicación precedente.

14. Producto de leche fermentada comprendiendo una cepa de *Streptococcus thermophilus* seleccionada en el grupo que consiste en una cepa de *Streptococcus thermophilus* ST6008 con número de registro DSM18111, un mutante de ST6008, y una variante de ST6008.

15. Cepa de *Streptococcus thermophilus* seleccionada en el grupo que consiste en una cepa de *Streptococcus thermophilus* ST6008 con el número de registro DSM18111, un mutante de ST6008 y una variante de ST6008.