



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 361 296**

(51) Int. Cl.:

A23C 9/13 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00948307 .4**

(96) Fecha de presentación : **01.08.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1201132**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2002**

(54) Título: **Bebidas y alimentos lácteos fermentados y proceso para producir los mismos.**

(30) Prioridad: **03.08.1999 JP 11-220157**
14.01.2000 JP 2000-5485

(73) Titular/es: **KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA**
1-19, Higashishinbashi 1-chome
Minato-ku, Tokyo 105-8660, JP

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.06.2011

(72) Inventor/es: **Kuma, Yoshiharu;**
Akahoshi, Ryoichi;
Kudo, Tatsuyuki;
Kawami, Kojiro;
Shibata, Miku y
Hashimoto, Shinji

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.06.2011

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

Bebidas y alimentos lácteos fermentados y proceso para producir los mismos.

5 **Campo Técnico**

Esta invención se refiere a leches fermentadas, cada una de las cuales contiene un ingrediente lácteo fermentado y un factor de crecimiento de bacterias del ácido láctico seleccionado entre compuestos específicos y también a procesos para la producción de las leches fermentadas.

10 **Antecedentes**

Las leches fermentadas, tales como bebidas lácteas fermentadas, bebidas de bacterias del ácido láctico, yogurt, leches cultivadas y queso, con frecuencia se producen proporcionando leches animales, tales como leche de vaca, leche de cabra, leche de caballo y similares, como medio de cultivo y fermentándolas con bacterias del ácido láctico. Sin embargo, tales bacterias del ácido láctico generalmente tienen auxotrofía estricta y muchas cepas de las mismas no crecen bien en medios de cultivo compuestos únicamente de leches animales. Incluso con cepas bacterianas que tienen proliferabilidad relativamente buena, los medios de cultivo compuestos de leches animales en solitario se considera que necesitan cultivo continuado durante varios días si se desean ingredientes lácteos fermentados que tengan acidez suficiente para usarse en la producción de leches fermentadas.

En el cultivo para la producción de una leche fermentada en la que se le da la importancia al recuento de células viables de bacterias del ácido láctico, el cultivo prolongado, sin embargo, da origen a otro problema en el sentido de que conduce a una reducción en el recuento de células viables de las bacterias del ácido láctico. Por ejemplo, las leches fermentadas que usan leche fermentada del tipo de células viables, tales como yogurt, se consumen de forma exhaustiva como alimentos que promueven la salud que tienen efectos fisiológicos tales como efecto de control de la función intestinal y efecto inmunopotenciador. Para el mantenimiento de estos efectos fisiológicos a niveles elevados, es importante conservar bacterias útiles, tales como bacterias del ácido láctico, en un recuento de células viables tan elevado como sea posible en un estado viable y además mantener la actividad elevada (capacidad de producir ácido). Por otra parte, el sabor de un producto de fermentación es importante para una leche fermentada. Esto hace imposible elegir una cepa bacteriana desde el punto de vista de la proliferabilidad únicamente y, por el contrario, una cepa bacteriana puede tener que seleccionarse de acuerdo con su capacidad de producir productos de fermentación de buen sabor a pesar de su poca proliferabilidad.

35 Por lo tanto, en el cultivo de bacterias del ácido láctico es una práctica común añadir una o más sustancias diversas promotoras del crecimiento a un medio de cultivo con el fin de mejorar la eficacia del cultivo. Los ejemplos actualmente conocidos de sustancias promotoras del crecimiento o aquellas que se confirma que son eficaces para promover el crecimiento incluyen extracto de *Chlorella*, sales de hierro, vitaminas, proteolizados que contienen aminoácidos y péptidos y extracto de levadura. Los mismos se usan con el fin mencionado anteriormente. El documento WO 96/37113-A describe que una supervivencia de *Bifidobacterium bifidum* en una leche fermentada se puede mejorar usando un aditivo que contenga catequinas durante la fermentación.

45 Para la retención de la utilidad de las bacterias del ácido láctico, es necesario no sólo promover su crecimiento sino también inhibir la muerte de sus células y además, es necesario mantener un recuento de células viables elevado en el producto final durante el almacenamiento. Se observa una reducción marcada en la viabilidad de bacterias del ácido láctico especialmente cuando se produce una leche fermentada con bajo contenido de grasa tal como yogurt con bajo contenido de grasa usando leche en polvo desnatada o cuando la fermentación de ácido láctico avanza de forma excesiva. Este problema se hace más serio cuando se producen leches fermentadas de bajas calorías o leches fermentados de bajo pH. Con miras a mantener tales recuentos celulares viables, se añaden actualmente sustancias tales como *Chlorella*.

55 Sin embargo, la adición de tales sustancias con frecuencia influye sobre los sabores de los mismos productos y adicionalmente, implica un problema en el sentido de que los costes de los productos se aumentan. Adicionalmente, estas sustancias difícilmente pueden mantener las actividades elevadas de tales bacterias del ácido láctico aunque las mismas son capaces de mantener recuentos celulares viables elevados.

60 Un objeto de la presente invención es, por lo tanto, encontrar una sustancia novedosa promotora del crecimiento o que mejore la viabilidad que no tenga problemas con el sabor y, cuando se añade simplemente, pueda aumentar el recuento de células viables de bacterias del ácido láctico y también pueda mantener el recuento de células viables en el producto final y además proporcionar una leche fermentada que use la sustancia para mantener tantas células de las bacterias del ácido láctico como sea posible en un estado viable y también mantener elevada la actividad (capacidad productora de ácido) de las células.

Descripción de la invención

Los presentes inventores han procedido con la selección exhaustiva de sustancias que tengan la propiedad de conseguir la promoción del crecimiento y mejorar la viabilidad de bacterias del ácido láctico. Como resultado, se ha observado que los extractos de jengibre, té y cebolla de verdeo tienen la propiedad mencionada anteriormente y 5 también que su uso en la preparación de leches fermentadas no provoca problemas con el sabor, conduciendo a la finalización de la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una leche fermentada que comprende un ingrediente lácteo fermentado obtenido mediante la fermentación con bacterias del ácido láctico específicas y un factor de crecimiento de bacterias del ácido láctico seleccionado entre extracto de jengibre, extracto de té o extracto de cebolla de verdeo, como se ha definido en la reivindicación 1. 10

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una leche fermentada, que comprende cultivar bacterias del ácido láctico específicas en un medio de cultivo en el que están contenidos uno o más factores 15 del crecimiento de bacterias del ácido láctico seleccionados entre extracto de jengibre, extracto de té y extracto de cebolla de verdeo, como se define en la reivindicación 5.

La presente invención proporciona además un uso como se define en la reivindicación 9.

20 También se describe un método para mejorar la viabilidad de bacterias del ácido láctico en una leche fermentada, que comprende añadir un ingrediente seleccionado entre ácido oleico o un derivado del mismo a la leche fermentada.

Breve Descripción de los Dibujos

25 La Figura 1 es una representación de la relación entre la concentración de oleato de sodio añadido y el recuento de células viables tras la finalización del cultivo de bacterias del ácido láctico; y la Figura 2 es una representación de la relación entre el número de días almacenados y el recuento de células viables de las bacterias del ácido láctico.

Mejores Modos de Realizar la Invención

30 La expresión "leches fermentadas" como se usa en el presente documento incluye bebidas tales como leche fermentada y bebidas fermentadas de bacterias del ácido láctico como se especifica en Ordenanza del Ministerio de Salud y Bienestar Social, el Gobierno de Japón sobre la Leche y Productos Relacionados; y yogurt duro, yogurt suave y yogurt simple y además kéfir, queso y similares.

35 Por otra parte, la expresión "factor de crecimiento de bacterias del ácido láctico" como se usa en el presente documento significa una sustancia que puede promover el crecimiento de bacterias del ácido láctico para aumentar 40 su recuento de células viables tras el cultivo y además puede elevar la viabilidad de las bacterias del ácido láctico para mantener su recuento de células viables posteriormente a la formación de una leche fermentada, la cual se ha obtenido mediante la fermentación, en un producto final.

45 La leche fermentada de acuerdo con la presente invención sólo es necesario que contenga un factor de crecimiento de bacterias del ácido láctico, que se selecciona entre extracto de jengibre, extracto de té o extracto de cebolla de verdeo, en un ingrediente lácteo fermentado obtenido mediante la fermentación con bacterias del ácido láctico seleccionadas entre *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* o *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris*. Se prefiere añadir el factor de crecimiento de las bacterias del ácido láctico antes de la fermentación del ácido láctico, aunque no se impone ninguna limitación con 50 respecto al momento de su adición. Por lo tanto, se puede añadir durante el transcurso de la fermentación del ácido láctico o después de la finalización de la fermentación del ácido láctico. Además, el factor de crecimiento de las bacterias del ácido láctico se puede añadir en partes.

55 Entre los factores de crecimiento de bacterias del ácido láctico que se pueden añadir al ingrediente lácteo fermentado en la presente invención, el extracto de jengibre significa un extracto obtenido mediante la extracción de jengibre, tal cual o después de someterlo a procesamiento tal como pelado y/o triturado, en un disolvente orgánico tal como etanol, acetato de etilo, glicerina o propilenglicol o un disolvente mezclado de los mismos. Por otra parte, el extracto de té significa un extracto de té obtenido mediante el procesamiento de las hojas de la planta del té que es un arbusto de hoja perenne del género *Camellia*, concretamente, un extracto de té no fermentado, de té medio fermentado o de té fermentado, específicamente un extracto obtenido mediante la extracción de té verde, té negro, té oolong, té de jazmín o similar en agua o en un disolvente orgánico tal como etanol, acetato de etilo, glicerina o propilenglicol o un disolvente mezclado de los mismos. Adicionalmente, el extracto de cebolla de verdeo significa un extracto obtenido mediante la extracción de cebolla de verdeo, tal cual o después de someterla a un procesamiento tal como picado o triturado, en agua o en un disolvente orgánico tal como etanol, acetato de etilo, glicerina o propilenglicol o un disolvente mezclado de los mismos. La cebolla de verdeo que se proporciona para la extracción 60 65

puede ser cebolla de verdeo de plantación profunda (cebolla de verdeo *Nebuka*), de la cual únicamente una parte blanca de la envuelta de la hoja, denominándose en general dicha parte blanca "raíz", es comestible o una cebolla de verdeo de hoja (cebolla de verdeo *Ha*) de la cual una parte verde también es comestible.

- 5 Entre los disolventes de extracción descritos anteriormente, se prefiere agua, especialmente un disolvente ácido a base de agua. El uso de un disolvente ácido a base de agua se considera que da como resultado la extracción de una gran cantidad de componentes trazas (sustancias) que están contenidas en el extractivo y se cree que tienen efecto promotor del crecimiento para las bacterias del ácido láctico. Un extracto disponible a partir del uso de un disolvente ácido a base de agua de este tipo, incluso cuando se añade en una cantidad pequeña, puede producir un efecto promotor del crecimiento excelente, de forma que su influencia sobre el sabor se puede minimizar.

Como el disolvente para la extracción y preparación del extracto de jengibre, el extracto de té o el extracto de cebolla de verdeo, se prefieren los disolventes a base de agua tales como agua y alcohol de agua. Es particularmente preferido conducir la extracción usando un disolvente a base de agua de un pH no mayor de 4,0. No se impone ninguna limitación particular sobre un ácido para uso en esta extracción ácida siempre y cuando el mismo se emplee en alimentos. Los ejemplos ilustrativos del ácido son ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido láctico y ácido acético. No se impone ninguna limitación particular sobre las condiciones para la extracción, pero se prefiere extraer a 60°C o más pero 120°C o menos, preferiblemente a 80°C o más pero 100°C o menos durante 30 a 60 minutos.

20 De los extractos de jengibre, extracto de té y extracto de cebolla de verdeo disponibles como se han descrito anteriormente, se prefieren los extractos de té por su efecto promotor del crecimiento elevado sobre las bacterias del ácido láctico, prefiriéndose particularmente el extracto de té oolong. Estos extractos se pueden usar de forma única o en combinación. Cuando se combinan varios de los extractos, los mismos se pueden mezclar entre sí después de que los mismos se obtienen por separado o dos o más de jengibre, té y cebolla de verdeo se mezclan entre sí, seguido por la extracción.

30 Con respecto a estos extractos, las soluciones inmediatamente después de la extracción se pueden usar tal cual. Como una alternativa, las mismas se pueden también usar en forma de extractos concentrados obtenidos mediante un método tal como ultrafiltración o centrifugación o en forma de extractos en polvo obtenidos mediante el secado tal como secado por pulverización o liofilización.

35 No se impone ninguna limitación particular sobre el ácido oleico o sus derivados (denominado en lo sucesivo en el presente documento "ácido oleico o similares") de los factores de crecimiento de bacterias del ácido láctico utilizables en combinación con la presente invención. Son ejemplos ilustrativos, además del ácido oleico libre y sales inorgánicas del ácido oleico, ésteres de sacarosa, glicéridos, ésteres de sorbitán, ésteres de propilenglicol y similares, que se usan ampliamente como emulsificantes y contienen ácido oleico como sus restos de ácido graso. Los ejemplos específicos pueden incluir oleato de sodio, oleato de potasio, oleato de glicerilo, oleato de poliglicerilo, oleato de sorbitán, oleato de polipropilenglicol y oleato de sacarosa. De éstos, se prefieren oleato de monoglicerilo y monooleato de poliglicerilo ya que los mismos son altamente eficaces para aumentar el recuento de células viables a la finalización del cultivo y también para mejorar la viabilidad de las células. El oleato de sacarosa y similares también se prefieren desde el punto de vista de las propiedades físicas tales como solubilidad. Estos factores del crecimiento de bacterias del ácido láctico se pueden usar solos o en combinación.

45 A propósito, un material alimentario que contiene una gran cantidad de ácido oleico o similar también se puede usar como un sustituto del factor de crecimiento. Sin embargo, se ha de destacar que incluso entre aquellos que contienen ácido oleico en sus estructuras, aquellos que lo contienen en una forma tal como lisolecitina pueden no ser capaces de producir el efecto provechoso de mantener el recuento y la actividad de células viables en la leche fermentada.

50 La cantidad del factor de crecimiento de bacterias del ácido láctico, que se selecciona entre extracto de jengibre, extracto de té o extracto de cebolla de verdeo o ácido oleico o un derivado del mismo, que se tiene que añadir al ingrediente lácteo fermentado varía dependiendo del tipo de factor del crecimiento de bacterias del ácido láctico que se tenga que usar, la cepa de bacterias del ácido láctico a usarse, el tipo de medio de cultivo a usarse, el propósito de aplicación del producto cultivado y así sucesivamente. Por lo tanto, se desea determinar de forma empírica su cantidad.

60 En el caso de extracto de jengibre, extracto de té o extracto de cebolla de verdeo (denominado en lo sucesivo en el presente documento "el extracto o similares"), por ejemplo, se prefiere que se añada como un extracto del 10% de sólidos solubles (10° Brix) en una cantidad de aproximadamente el 0,02% al 2,0% p (denominado en lo sucesivo en el presente documento sencillamente como "%"), en particular desde aproximadamente el 0,1% al 1,0% siempre y cuando el extracto se obtenga usando agua caliente. Una cantidad mayor del 2,0% no se espera que produzca un efecto promotor del crecimiento adicional y, cuando se producen diversas bebidas o alimentos usando el cultivo, puede influir más o menos sobre sus sabores. Por otra parte, una cantidad más pequeña del 0,02% conduce a alguna reducción en el efecto promotor del crecimiento.

- En el caso de un extracto obtenido mediante extracción ácida, se prefiere añadirse como un extracto del 10% de sólidos solubles (10° Brix) en una cantidad de desde aproximadamente el 0,01% al 2,0%, en particular desde aproximadamente el 0,05% al 1,0% por razones similares a las mencionadas anteriormente. Un extracto extraído mediante ácido tiene un efecto promotor del crecimiento elevado y puede mostrar un efecto excelente incluso cuando se añade a la mitad de la cantidad del extracto de agua caliente.
- Adicionalmente, se pueden añadir preferiblemente ácido oleico o similares en una cantidad tal que la concentración final después de la formación de un producto final varíe desde 15 µg/ml hasta 60 µg/ml, especialmente desde 15 µg/ml hasta 40 µg/ml con respecto al ácido oleico. Una cantidad más pequeña de 5 µg/ml conduce a un efecto débil de la prevención de muerte de células después de la formación en el producto final, mientras que una cantidad mayor de 60 µg/ml da origen a problemas en el sentido de que el coste del producto aumenta y el contenido de grasa en el producto final también aumenta y adicionalmente da como resultado un índice de crecimiento de las células reducido.
- Por otra parte, el ingrediente lácteo fermentado obtenido mediante fermentación del ácido láctico (denominado en lo sucesivo en el presente documento "el ingrediente lácteo fermentado") se puede obtener fermentando un medio lácteo animal con bacterias del ácido láctico. Como un material para el medio lácteo animal, es posible usar leche fresca tal como leche de vaca, leche de cabra o leche de caballo o un producto lácteo tal como leche entera en polvo desnatada, leche entera en polvo o crema fresca. También se pueden añadir al medio aditivos para el medio de cultivo ordinario para las bacterias del ácido láctico. Los ejemplos de tales aditivos pueden incluir vitaminas tales como vitamina A, vitaminas B, vitamina C y vitamina E, diversos péptidos, diversos aminoácidos y sales tales como calcio y magnesio.
- El ácido oleico o un derivado del mismo tal como un factor del crecimiento de las bacterias del ácido láctico tiene un efecto elevado para la prevención de la muerte de especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*. En la invención, el extracto de jengibre, extracto de té o extracto de cebolla de verdeo se usa como un factor de crecimiento de las bacterias del ácido láctico con *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* y *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris* por una razón similar.
- Independientemente del factor de crecimiento de bacterias del ácido láctico que se use, se prefiere especialmente *Lactobacillus casei*. Además, también se pueden usar en combinación células que se comen comúnmente, tales como *Bifidobacterium* y levadura.
- El ácido oleico o similares, que es un factor del crecimiento para las bacterias del ácido láctico, muestra un efecto particularmente bueno cuando se prepara una leche fermentada con bajo contenido de grasa usando leche en polvo desnatada, concretamente, leche desnatada líquida o leche desnatada en polvo, se usa como un medio de cultivo para el ingrediente lácteo fermentado de la leche fermentada. La producción de una leche fermentada con bajo contenido de grasa de este tipo se puede conducir específicamente añadiendo a un ingrediente lácteo, que se compone de leche desnatada como un material principal, ácido oleico o similares en una cantidad tal que su concentración final después de la formación en un producto final se vuelva 15 µg/ml o mayor con respecto al ácido oleico y después fermentando el ingrediente lácteo con bacterias del ácido láctico o fermentando un ingrediente lácteo, que está compuesto de leche desnatada como un material principal, con bacterias del ácido láctico y después añadiendo ácido oleico o similares en la cantidad descrita anteriormente. El uso del primer proceso se prefiere particularmente, debido a que el recuento de células viables en el momento de la finalización del cultivo es elevado y la viabilidad de las células es elevada. En estos procesos, la fermentación se practica inoculando el ingrediente lácteo con las bacterias del ácido láctico y cultivando las bacterias a una temperatura de aproximadamente 35 a 37°C durante 3 a 5 días.
- El uso combinado de uno o más extractos seleccionados entre extracto de jengibre, extracto de té y extracto de cebolla de verdeo con ácido oleico o similares en la presente invención también hace posible conseguir de forma sinérgica la promoción del crecimiento de las bacterias del ácido láctico y una mejora en su viabilidad. Está disponible un efecto excelente especialmente cuando se usan en combinación extractos de té y ácido oleico o similares, siendo más preferido el uso combinado de extracto de té oolong y ácido oleico o similares. Cuando se usan en combinación dos o más de los factores de crecimiento de las bacterias del ácido láctico de la presente invención como se ha descrito anteriormente, los mismos se pueden añadir en cantidades similares a las que se ha descrito anteriormente.
- Los ejemplos de las leches fermentadas de la presente invención, que se pueden obtener como se ha descrito anteriormente, pueden incluir bebidas o alimentos mediante el uso de diversas bacterias del ácido láctico, por ejemplo, bebidas lácteas fermentadas, bebidas de bacterias del ácido láctico, yogurt, leches cultivadas, kéfir, queso y similares, de los cuales tipos ilustrativos pueden ser de tipo simple, de tipo saborizado, de tipo de fruta, de tipo dulce, de tipo suave, de tipo bebida, de tipo duro, de tipo congelado y similares.
- Tras la producción de la leche fermentada, es posible usar sabores tales como de tipo yogurt, de tipo baya, de tipo naranja, de tipo membrillo (Chino), de tipo perilla, de tipo cítrico, de tipo manzana, de tipo menta, de tipo uva, de tipo

albaricoque, pera, crema de leche, melocotón, melón, plátano, tropical, de tipo de hierbas, té negro y de tipo café; azúcares tales como sacarosa, azúcar isomerizada, glucosa, fructosa, palatinosa, trehalosa, lactosa y xilosa; alcoholes de azúcar tales como sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, paratinit, jarabe de malta de reducción de espesor y jarabe de maltosa de reducción de espesor; emulsificantes tales como ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de glicerina y lecitina; y espesantes (estabilizantes) tales como agar, gelatina, carragenina, goma guar, goma de xantano, pectina y goma de algarrobill. También es posible añadir diversas vitaminas tales como vitamina A, vitaminas B, vitamina C y vitamina E; y minerales tales como calcio, hierro y cinc.

5 El factor de crecimiento de bacterias del ácido láctico seleccionado entre extracto de jengibre, extracto de té, extracto de cebolla de verde o ácido oleico o un derivado del mismo tiene un efecto promotor del crecimiento o un efecto mejorador de la viabilidad para las bacterias del ácido láctico. De éstos, el extracto de jengibre, el extracto de té y el extracto de cebolla de verde son excelentes especialmente en el efecto promotor del crecimiento para las bacterias del ácido láctico. El ácido oleico y sus derivados, por otra parte, tienen un efecto tanto promotor del crecimiento como un efecto mejorador de la viabilidad para bacterias del ácido láctico, pero su efecto de mejora de la viabilidad es mayor.

Aplicabilidad Industrial

10 El extracto de jengibre, extracto de té o extracto de cebolla de verde o ácido oleico o el derivado del mismo, que se añade en la leche fermentada de acuerdo con la presente invención tiene un efecto promotor del crecimiento excelente y un efecto mejorador de la viabilidad para las bacterias del ácido láctico y adicionalmente está libre de un sabor que pueda implicar un problema particular. Por consiguiente, la leche fermentada con el factor de crecimiento tiene utilidad elevada como una bebida o alimento que es excelente para promover la salud y está libre de un deterioro en el sabor.

15 25 Especialmente en un producto lácteo fermentado con bajo contenido de grasa que usa el ácido oleico o un derivado del mismo como un factor del crecimiento de las bacterias del ácido láctico, se evita la muerte de las células incluso cuando se cultivan a partir de la fase estacionaria hasta la fase de muerte y adicionalmente, se puede mostrar un efecto de prevención de la muerte excelente durante el almacenamiento refrigerado después de la formación en un producto final y también para aumentos de temperatura durante el almacenamiento. Se permite que tantas bacterias del ácido láctico como aproximadamente 1×10^8 ufc/ml permanezcan como células viables. Aun cuando el producto final se almacena a 10°C durante 2 semanas, se puede mantener un índice de viabilidad del 20% o más elevado. Cuando el cultivo de la leche fermentada con bajo contenido de grasa se permite que avance hasta la fase estacionaria o la fase de muerte de las bacterias del ácido láctico, el uso de *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*,
30 35 *Streptococcus thermophilus* o similares generalmente hace posible asegurar tal recuento de células viables e índice de viabilidad de las bacterias del ácido láctico como se ha mencionado anteriormente aun cuando el pH del producto final cae hasta aproximadamente 3,6 a 3,8, aunque el pH óptimo y tolerancia a ácido de las células varía dependiendo de la cepa bacteriana y del tiempo de cultivo y similares por lo que varían dependiendo de las células. Además, el uso de leche desnatada para la provisión de un producto fermentado y la adición de ácido oleico o un derivado del mismo puede limitar el contenido de grasa al 0,1% p aproximadamente en el producto final, de forma que el producto final se puede comercializar como leche fermentada con bajo contenido de grasa de bajas calorías.

Ejemplos

40 45 La presente invención se describirá en lo sucesivo en el presente documento con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos. Los Ejemplos 9, 10 y 11 son ejemplos de referencia.

Ejemplo 1

50 Preparación de extractos (1)

Té verde, té oolong, jengibre lavado y triturado y cebolla de verde lavada y triturada se extrajeron por separado durante 60 minutos en alícuotas (10 veces los pesos de los materiales respectivos) de agua caliente de 90°C, mediante lo cual se prepararon extractos respectivos. Los mismos se concentraron por separado en un evaporador y se obtuvieron extractos de [sólidos solubles al 10% (10° Brix)].

Ejemplo 2**Comparación de grados de proliferación de bacterias del ácido láctico (1)**

- 5 Usando alícuotas de una solución de leche en polvo desnatada al 20% como un medio basal, el extracto de jengibre, extracto de té verde, extracto de té oolong y extracto de cebolla de verdea, que se obtuvieron en el Ejemplo 1, se añadieron al 0,1% como factores de crecimiento de bacterias del ácido láctico, respectivamente y los grados de proliferación de las bacterias del ácido láctico se estudiaron. Descritos específicamente, los medios esterilizados se inocularon con el 1% de un iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029, seguido por el cultivo a 37°C durante 48 horas.
- 10 Después del cultivo, los grados de proliferación de las bacterias del ácido láctico se compararon usando como índices las acideces de los cultivos resultantes (títulos determinados mediante toma de muestras de porciones de 10 ml de los cultivos y después titulando los ácidos orgánicos en las muestras con soda cáustica 0,1 N a la vez que usando fenolftaleína como un indicador). Los resultados se muestran en la Tabla 1. Con fines de comparación, se añadió "MEAST" (marca registrada para autolisado de levadura de cerveza; producto de ASAHI BEER FOOD, LTD) al 0,15% y el cultivo se condujo de forma similar. Esta cantidad de "MEAST" es prácticamente el límite superior de cantidad añadida a la que el efecto dañino al sabor del producto cultivado es aun permisible.
- 15

Tabla 1

| Factor de crecimiento de bacterias del ácido láctico | Acidez |
|--|--------|
| Ninguno | 9,5 |
| "MEAST" | 11,8 |
| Extracto de jengibre | 12,8 |
| Extracto de té verde | 13,0 |
| Extracto de té oolong | 13,1 |
| Extracto de cebolla de verdea | 12,9 |

- 20 Como es evidente a partir de la Tabla 1, los efectos promotores del crecimiento para las bacterias del ácido láctico mediante la adición del extracto del jengibre, extracto de té verde, extracto de té oolong y extracto de cebolla de verdea fueron más apreciables que aquel mostrado en el medio al que se añadió "MEAST".

Ejemplo 3

- 25 **Comparación del grado de proliferación de las bacterias del ácido láctico entre las acideces de soluciones de extracción.**
- 30 Usando agua caliente (90°C) y soluciones de ácido cítrico (90°C) de pH 3,0, 4,0 y 5,0, se prepararon extractos de té oolong en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1. Los mismos se concentraron por separado en un evaporador, mediante lo cual se obtuvieron extractos de [sólidos solubles al 10% (10° Brix)].
- 35 Los extractos individuales obtenidos de esta manera se añadieron a alícuotas de un medio de leche en polvo desnatada al 20% de forma que sus concentraciones se volvieron el 0,1%. Los medios resultantes se inocularon con *Lactobacillus casei* YIT9029, seguido por cultivo a 37°C durante 48 horas. Las acideces de los cultivos obtenidos de esta manera se midieron de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

| Disolvente de extracción | Acidez |
|------------------------------------|--------|
| Agua caliente | 13,7 |
| Solución de ácido cítrico (pH 3,0) | 17,2 |
| Solución de ácido cítrico (pH 4,0) | 17,1 |
| Solución de ácido cítrico (pH 5,0) | 15,5 |

- 40 Como se muestra en la Tabla 2, los extractos obtenidos mediante la conducción de la extracción con soluciones ácidas de pH 5,0 y menores, especialmente pH 4,0 y menores mostraron un efecto promotor del crecimiento marcado para las bacterias del ácido láctico.

Ejemplo 4

- 45 **Preparación de extractos (2)**
- Té verde, té negro, té oolong, jengibre y cebolla de verdea se trajeron por separado en alícuotas de una solución de ácido cítrico de pH 4,0. En las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, se prepararon los extractos respectivos.
- 50 Los mismos se concentraron por separado en un evaporador y se obtuvieron extractos de [sólidos solubles al 10% (10° Brix)].

Ejemplo 5**Comparación de grado de proliferación entre bacterias del ácido láctico (2)**

- 5 Usando alícuotas de una solución de leche en polvo desnatada al 16% como un medio basal, el extracto de jengibre, extracto de té verde, extracto de té negro, extracto de té oolong y extracto de cebolla de verdea, que se obtuvieron en el Ejemplo 4 se añadieron al 0,1% como factores de crecimiento de bacterias del ácido láctico, respectivamente. Los medios esterilizados a los que se ha añadido los extractos respectivos se inocularon con el 1% de iniciadores de diversas bacterias del ácido láctico mostradas en la Tabla 3, seguido por el cultivo a 37°C durante 48 horas.
- 10 Después del cultivo, las acideces de los cultivos resultantes se estudiaron para determinar los grados de proliferación de las bacterias del ácido láctico de una manera similar al Ejemplo 2. Con fines de comparación, se usaron los medios basales a los que se añadió el 0,15% de "MEAST" (marca registrada para autolisado de levadura de cerveza; producto de ASAHI BEER FOOD, LTD.). Los resultados se muestran en la Tabla 3.
- 15

Tabla 3

| Cepa celular ensayada | Factor de crecimiento de bacterias del ácido láctico | | | | | | |
|------------------------------------|--|---------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|
| | Ninguno | "MEAST" | Extracto de jengibre | Extracto de té verde | Extracto de té negro | Extracto de té oolong | Extracto de cebolla de verdea |
| <i>Lc, lactis</i> YIT2013 | 7,3 | 7,8 | 8,2 | 8,5 | 8,0 | 7,9 | 8,3 |
| <i>Lc, cremoris</i> YIT2002 | 1,6 | 5,8 | 7,1 | 7,6 | 8,8 | 8,3 | 9,5 |
| <i>St, thermophilus</i> YIT2001 | 8,9 | 10,3 | 10,2 | 10,2 | 9,9 | 9,8 | 10,0 |
| <i>L, bulgaricus</i> YIT0098 | 17,5 | 20,3 | 19,0 | 18,1 | 19,2 | 19,5 | 17,8 |
| <i>L, helveticus</i> YIT0100 | 20,2 | 23,3 | 21,1 | 20,8 | 20,9 | 20,8 | 21,8 |
| <i>L, jugulti</i> YIT0085 | 10,1 | 15,3 | 13,8 | 14,0 | 13,5 | 13,0 | 12,0 |
| <i>L, salivalius</i> YIT0039 | 8,6 | 11,8 | 12,8 | 12,5 | 10,9 | 11,8 | 12,4 |
| <i>L, fermentum</i> YIT0031 | 2,4 | 8,5 | 7,2 | 7,2 | 6,9 | 7,0 | 6,8 |
| <i>L, acidophilus</i> YIT0070 | 10,6 | 13,5 | 13,8 | 14,1 | 14,6 | 15,0 | 14,2 |
| <i>L, gasseri</i> YIT0168 | 5,5 | 10,5 | 13,0 | 13,5 | 13,8 | 14,0 | 13,1 |
| <i>L, gasseri</i> YIT0192 | 3,3 | 10,0 | 10,2 | 10,9 | 11,2 | 11,8 | 10,7 |
| <i>L, casei</i> YIT0078 | 10,1 | 12,0 | 17,0 | 17,2 | 17,3 | 17,5 | 17,0 |
| <i>L, casei</i> YIT9029 | 9,5 | 11,8 | 16,5 | 16,7 | 16,9 | 17,1 | 16,6 |

(Nota 1) Lc: *Lactococcus*, St: *Streptococcus*, L: *Lactobacillus*
 (Nota 2) Los valores en la tabla indican acideces.

Como se puede prever claramente a partir de la Tabla 3, el efecto promotor del crecimiento para las bacterias del ácido láctico mediante la adición de estos extractos se observó con respecto a sustancialmente todas las cepas celulares ensayadas como en el caso de la adición de "MEAST" aunque varió dependiendo de las cepas celulares. Especialmente, el efecto del extracto de té oolong fue elevado. Además, este efecto fue más notable a medida que la cepa celular mostraba un crecimiento más bajo en el medio basal. Incluso con bacterias del ácido láctico que no crecen bien en medio lácteo animal, los cultivos de acidez elevada y recuento viable elevado se pueden obtener en poco tiempo debido a que se permite que las bacterias crezcan activamente debido al efecto promotor del crecimiento de estos extractos. Además, estos extractos produjeron un efecto más elevado que "MEAST" cuando los

mismos se usaron en combinación con Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus lactis subespecie Lactis y Lactococcus lactis subespecie cremoris.

5 A partir de una comparación entre los extractos de té, el extracto de té oolong se observó que mostraba un efecto promotor del crecimiento superior para cualquiera de las bacterias del ácido láctico que los otros extractos de té, es decir, el extracto de té verde y el extracto de té negro.

Ejemplo 6

10 Comparación de grados de proliferación de las bacterias del ácido láctico (3)

Usando alícuotas de una solución de leche en polvo desnatada al 16%, que contenía el 10% de azúcar líquido glucosa-fructosa [sólidos solubles al 10% (70° Brix)], como un medio basal, se añadieron el mismo extracto de jengibre, extracto de té oolong y extracto de cebolla de verdea que los empleados en el Ejemplo 4 al 0,5%, respectivamente, mediante lo cual se proporcionaron los medios de ensayo. Después de la esterilización con calor, los medios respectivos se inocularon con el 0,5% de un iniciador de Lactobacillus casei YIT9029, seguido por cultivo a 37°C.

20 Se tomaron perfiles de las variaciones en la acidez.

Con respecto al medio de ensayo individual, se realizaron investigaciones para determinar el número de días cultivados (el número de días requeridos) necesarios para alcanzar la misma acidez que la acidez última (28) en el cultivo en el medio basal en solitario (control) y también para los recuentos de células viables de los cultivos cuando sus acideces alcanzaron 28. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

25 Tabla 4

| Factor de crecimiento de bacterias del ácido láctico | Número de días necesarios (días) | Recuento de células viables (células/ml) |
|--|----------------------------------|--|
| Ninguno | 6,5 | $3,5 \times 10^9$ |
| Extracto de jengibre | 4,0 | $4,0 \times 10^9$ |
| Extracto de té oolong | 3,5 | $7,2 \times 10^9$ |
| Extracto de cebolla de verdea | 3,8 | $5,2 \times 10^9$ |

Como es evidente a partir de la Tabla 4, el crecimiento de las bacterias se promovió mediante la adición de los extractos. Entre los extractos, el efecto del extracto de té oolong fue elevado.

30 **Ejemplo 7**

Producción y evaluación organoléptica de leches fermentadas

35 A cada una de las alícuotas (600 ml) de los cultivos respectivos obtenidos en el Ejemplo 6 se añadió azúcar líquido glucosa-fructosa (400 ml) y agua esterilizada (1,5 l) y las mezclas resultantes se homogeneizaron, mediante lo cual se produjeron leches fermentadas. Con respecto a los cuatro tipos de leches fermentadas de las bacterias del ácido láctico, se condujo un ensayo de palatabilidad mediante 20 panelistas con mucha experiencia. A través de un ensayo de discriminación de tres puntos, no se observó que existiera diferencia entre las muestras respectivas a las que se había añadido extractos y el control.

40 Además, también hubo un indicio de que los sabores de los extractos empleados como factores de crecimiento para las bacterias del ácido láctico coincidían bien con el sabor del producto de fermentación de leche animal mediante las bacterias del ácido láctico. Por lo tanto, se confirmó que, cuando esos extractos se usaron en cultivos para la producción de leches fermentadas tales como leches fermentadas de bacterias del ácido láctico, las leches fermentadas no tenían un sabor deteriorado.

45 **Ejemplo 8**

50 Dependencia de la cantidad del efecto de extracto de té oolong extraído con agua sobre el sabor y la promoción del crecimiento

55 Una solución de leche en polvo desnatada al 20% que contenía el 10% de azúcar líquido glucosa-fructosa [sólidos solubles al 75% (75° Brix)] se usó como un medio basal. A las alícuotas del medio basal, se añadieron el extracto de té oolong extraído con agua caliente obtenido en el Ejemplo 3 y un extracto de té oolong extraído con agua caliente de pH 4,0 en cantidades diversas. Después de la esterilización con calor, cada una de las muestras de medio se inoculó con el 0,5% de bacterias del ácido láctico L. casei YIT9029, seguido por cultivo a 37°C hasta acidez de 30. Los tiempos de cultivo y los recuentos de células viables en el momento en el que la acidez alcanzó 30 se registraron. Como un control, se usó un cultivo obtenido mediante la conducción de cultivo en el medio basal en

solitario.

A continuación, a cada una de las alícuotas de 480 ml de los cultivos obtenidos de esta manera se les añadió azúcar líquido glucosa-fructosa (400 ml) y agua esterilizada (1620 ml), mediante lo cual se produjeron 13 tipos de leches fermentadas de las bacterias del ácido láctico. Con respecto a esas bebidas fermentadas, sus sabores se examinaron por 10 panelistas con mucha experiencia. Los resultados del examen de sabor se muestran junto con los tiempos de cultivo y los recuentos de células viables en la Tabla 5.

Tabla 5

| | Cantidad de extracto añadida (%) | Tiempo de cultivo (horas) | Recuento de células viables (células/ml) | Resultados de examen de sabor |
|---|----------------------------------|---------------------------|--|--------------------------------|
| Extracto extraído con agua caliente | 0,01 | 140 | $4,6 \times 10^9$ | Extremadamente |
| | 0,05 | 133 | $5,3 \times 10^9$ | Extremadamente |
| | 0,10 | 112 | $6,0 \times 10^9$ | Extremadamente |
| | 0,50 | 102 | $6,3 \times 10^9$ | Bueno |
| | 1,00 | 89 | $6,7 \times 10^9$ | Ligero sabor a té |
| | 2,00 | 85 | $7,1 \times 10^9$ | Sabor astringente y sabor a té |
| Extracto extraído con agua caliente de pH 4,0 | 0,01 | 130 | $5,5 \times 10^9$ | Extremadamente |
| | 0,05 | 113 | $6,2 \times 10^9$ | Extremadamente |
| | 0,10 | 95 | $7,0 \times 10^9$ | Extremadamente |
| | 0,50 | 84 | $7,2 \times 10^9$ | Bueno |
| | 1,00 | 82 | $7,4 \times 10^9$ | Ligero sabor a té |
| | 2,00 | 80 | $7,4 \times 10^9$ | Sabor astringente y sabor a té |
| Control | - | 156 | $3,5 \times 10^9$ | Extremadamente bueno |

Como se muestra en la Tabla 5, se confirmó que la adición del 0,01% o más de cualquiera de los extractos acortaba el tiempo de cultivo y adicionalmente aumentaba el recuento de células viables. Los extractos no produjeron ningún efecto adicional incluso cuando se añadieron en cantidades mayores del 0,5%. También se confirmó que el sabor permaneció siendo bueno hasta el 0,5% de cualquiera de los extractos pero el sabor de cada extracto se sintió cuando se añadió en cantidades del 1% y superiores.

Ejemplo 9

Relación entre la cantidad de ácido oleico libre en medio de yogurt con bajo contenido de grasa y el recuento de células viables a la finalización del cultivo de bacterias del ácido láctico

Se preparó un medio de yogurt con bajo contenido de grasa con la composición del leche en polvo desnatada al 20% (producto de YOTSUBA MILK PRODUCTS CO., LTD.) y glucosa al 3%. Se añadió oleato de sodio a índices del 0,003, 0,005, 0,01, 0,02 y 0,03 % p a alícuotas del medio, respectivamente, seguido por esterilización a 100°C durante 60 minutos. Las muestras de medio se inocularon con el 0,5% de *Lactobacillus casei* YIT9029, seguido por cultivo a 37°C durante aproximadamente 200 horas. Al momento de la finalización del cultivo, se midieron los recuentos de células viables. Los recuentos de células viables (ufc/ml) se obtuvieron cada uno propagando el cultivo correspondiente, que se había diluido en extracto de levadura al 0,1% según fuera necesario, en una placa de agar Rogosa con un gira placas, incubando la placa de agar a 37°C durante 3 días y después realizando el recuento de las colonias resultantes mediante un contador de colonias láser. Los resultados se muestran en la Figura 1. A partir de la Figura 1, se ha hecho evidente que el recuento de células viables tras la finalización del cultivo de *Lactobacillus casei* aumenta mediante la adición de ácido oleico.

Ejemplo 10

Efecto de mejora sobre la viabilidad de bacterias del ácido láctico en producto final almacenado mediante la adición de oleato de sodio

A alícuotas del medio de yogurt con bajo contenido de grasa del Ejemplo 9, se añadió oleato de sodio a índices del 0,003, 0,005 y 0,01 % p respectivamente. Cada una de las muestras de medio se inoculó con bacterias del ácido láctico, seguido por cultivo para estudiar el efecto del oleato de sodio sobre la viabilidad de las bacterias del ácido láctico. El cultivo se condujo a 37°C hasta pH 3,6 a pH 3,8. Otras condiciones y la cepa celular fueron las mismas que en el Ejemplo 9.

Por una parte, se esterilizó azúcar líquido fructosa-glucosa al 70% a 100°C durante 30 minutos y el azúcar líquido obtenido de esta manera se proporcionó como un jarabe. Los cultivos y alícuotas del jarabe, los cuales se habían obtenido como se ha descrito anteriormente, se mezclaron a una proporción de 1:1 y las mezclas resultantes se llenaron en recipientes para obtener productos de yogur con bajo contenido de grasa (las concentraciones de ácido oleico en los productos fueron 15 µg/ml, 25 µg/ml y 50 µg/ml, respectivamente). Además, como un control, se produjo yogur con bajo contenido de grasa al que no se había añadido oleato de sodio.

Los productos obtenidos de esta manera se almacenaron a 10°C durante 14 días. Durante el almacenamiento, el recuento de células viables de los productos respectivos se investigó a lo largo del paso del tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 2. Se ha vuelto claro a partir de los resultados de la Figura 2 que se conserva una viabilidad elevada incluso después de un almacenamiento de 7 días mediante la adición de oleato de sodio tras el cultivo, a diferencia de la tendencia general de una disminución sustancial en el recuento de células viables cuando el almacenamiento de un producto supera 7 días (las variaciones en el recuento de células viables en el día 0 del almacenamiento de los productos refleja los recuentos de células viables en los cultivos).

Ejemplo 11

A alícuotas del medio de yogur con bajo contenido de grasa del Ejemplo 9, se añadieron oleato de sodio y diversos emulsificantes, los cuales se muestran en la Tabla 6, respectivamente, de forma que sus concentraciones se volvieron el 0,01% con respecto al contenido de ácido oleico. Esas muestras de medio se inocularon con el 0,5% de *Lactobacillus casei* YIT9029, seguido por cultivo para determinar los efectos de estos aditivos sobre el recuento de células viables de las bacterias del ácido láctico en el momento de la finalización del cultivo y también sobre la viabilidad de las bacterias del ácido láctico. El cultivo se condujo a 37°C hasta pH 3,6 a 3,8. Otras condiciones se ajustaron como en el Ejemplo 9.

Tabla 6

| | Aditivo | Observaciones |
|---|------------------------------|--------------------------|
| 1 | Ácido oleico | |
| 2 | Oleato de sodio | |
| 3 | Oleato de glicerilo | Monoglicérido ≥90% |
| 4 | Monooleato de pentaglicerilo | |
| 5 | Trioleato de pentaglicerilo | |
| 6 | Monooleato de hexaglicerilo | |
| 7 | Decaoleato de decaglicerilo | |
| 8 | Oleato de sacarosa | Oleato de sacarosa ≥ 70% |
| 9 | Oleato de glicerilo | Triglicérido |

Después de que esos cultivos se almacenaron a 5°C durante 5 días, los mismos se mezclaron con alícuotas del jarabe del Ejemplo 10 a una proporción de 1:1. Las mezclas resultantes se llenaron en recipientes para obtener productos de yogur con bajo contenido de grasa. Además, como un control, se produjo yogur con bajo contenido de grasa sin ácido oleico añadido.

Los productos obtenidos de esta manera se almacenaron a 10°C durante 14 días. Durante el almacenamiento, el recuento de células viables de los productos respectivos se investigó a lo largo del paso del tiempo. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7

| Control | Recuento de células viables (ufc/ml) | | | Viabilidad el Día 14 |
|---------|--------------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| | DÍA 1 | DÍA 7 | DÍA 14 | |
| 1 | 1,3x10 ⁹ | 7,2x10 ⁸ | 5,3x10 ⁸ | 40,8% |
| 2 | 1,2x10 ⁹ | 7,3x10 ⁸ | 5,2x10 ⁸ | 43,3% |
| 3 | 1,1x10 ⁹ | 7,7x10 ⁸ | 5,0x10 ⁸ | 45,5% |
| 4 | 1,2x10 ⁹ | 8,1 x10 ⁸ | 5,0x10 ⁸ | 41,7% |

| Control | Recuento de células viables (ufc/ml) | | | Viabilidad el Día 14 |
|---------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| 5 | $5,6 \times 10^8$ | $2,5 \times 10^8$ | $1,2 \times 10^8$ | 21,4% |
| 6 | $1,3 \times 10^9$ | $7,3 \times 10^8$ | $4,8 \times 10^8$ | 36,9% |
| 7 | $6,5 \times 10^8$ | $2,0 \times 10^8$ | $1,4 \times 10^8$ | 21,5% |
| 8 | $1,1 \times 10^9$ | $6,1 \times 10^9$ | $4,3 \times 10^8$ | 39,1% |
| 9 | $5,9 \times 10^8$ | $2,2 \times 10^8$ | $1,4 \times 10^8$ | 23,7% |
| Control | $3,2 \times 10^8$ | $1,6 \times 10^8$ | $2,6 \times 10^7$ | 8,1% |

A partir de los resultados de la Tabla 7 se ha observado que el yogur con bajo contenido de grasa con ácido oleico añadido muestra una viabilidad del 20% o mayor incluso después de almacenarse a 10°C durante 2 semanas. También se ha observado que el uso de ácido oleico en la forma de ácido oleico libre, una sal de oleato o un éster de oleato puede proporcionar un recuento de células viables especialmente bueno tras la finalización del cultivo y también una viabilidad particularmente buena.

Ejemplo 12

10 Efectos de factores individuales sobre el mantenimiento del recuento de células viables de bacterias del ácido láctico

15 Alícuotas (160 g) de leche en polvo desnatada, alícuotas (30 g) de glucosa y los ingredientes indicados con "+" en la Tabla 8 se disolvieron en alícuotas de agua caliente para producir volúmenes totales de 1000 ml, respectivamente [en el caso de los ingredientes indicados con "+", se usó el 0,1% del extracto obtenido en el Ejemplo 4 como un extracto de té oolong; 100 ppm, con respecto al ácido oleico, de oleato de monoglicerilo como ácido oleico; y el 0,1% de "MEAST" (marca registrada para autolisado de levadura de cerveza; producto de ASAHI BEER FOOD, LTD.) como un extracto de levadura]. Esas muestras de medio se esterilizaron a 100°C durante 30 minutos y después se permitió que se enfriaran hasta 37°C. Las mismas se inocularon con el 0,1% de *Lactobacillus casei* YIT9029, seguido por cultivo hasta pH 3,6. De este modo se obtuvieron soluciones fermentadas de las bacterias del ácido láctico, respectivamente.

20 Las soluciones se homogeneizaron por separado a 150 kg/cm² y después se mezclaron con alícuotas (4.000 ml) de jarabe de azúcar al 13,8% esterilizado. Las mezclas resultantes se llenaron en recipientes de poliestireno y se sellaron, mediante lo cual se obtuvieron bebidas fermentadas de las bacterias del ácido láctico. Después de almacenarse a 10°C durante 14 días, se midió su recuento de células viables. Los resultados de esta medición también se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

| | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 4 | Muestra 5 | Muestra 6 | Muestra 7 | Muestra 8 |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|
| Extracto de té oolong* | - | - | - | - | + | + | + | + |
| Ácido oleico** | - | - | + | + | - | - | + | + |
| Extracto de levadura | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Recuento de células iables por ml Índice | $1,1 \times 10^8$ 8,04 | $1,5 \times 10^8$ 8,20 | $1,6 \times 10^8$ 8,95 | $1,7 \times 10^8$ 9,11 | $3,3 \times 10^8$ 9,23 | $3,2 \times 10^8$ 9,26 | $1,9 \times 10^{10}$ 9,20 | $1,8 \times 10^9$ 9,26 |

* Extracto de té oolong del Ejemplo 4

** Oleato de monoglicerilo

30 A partir de los resultados de la Tabla 8, se preparó la Tabla ortogonal mostrada en la Tabla 9 de acuerdo con el método descrito en las páginas 292 a 300 en "Gendai Tokei Jitsumu Koza (Contemporary Statistics Practical Series) Text II" [publicado por Zaidan Hojin Jitsumu Kyoiku Kenkyusho (Practical Education Research Foundation)], y se calcularon las contribuciones porcentuales de los ingredientes individuales al mantenimiento del recuento de células viables de las bacterias del ácido láctico durante el almacenamiento. En la Tabla 9, a representa el extracto de té oolong, b ácido oleico y c el extracto de levadura; ab, ac y bc cada uno indican el uso combinado de los dos ingredientes correspondientes; y abc designa el uso combinado de los tres ingredientes.

Tabla 9

| | a | b | ab | c | ac | bc | abc | |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| ① | 32,65 | 33,24 | 34,79 | 34,02 | 34,05 | 34,08 | 34,05 | |
| ② | 35,59 | 35,00 | 33,45 | 34,22 | 34,19 | 34,16 | 34,19 | |
| ① + ② | 68,24 | 68,24 | 68,24 | 68,24 | 68,24 | 68,24 | 68,24 | |
| d = ② - ① | 2,94 | 1,76 | -1,34 | 0,20 | 0,14 | 0,08 | 0,14 | |
| d/8 | 0,37 | 0,22 | -0,17 | 0,03 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | |
| d x d/8 | 1,08 | 0,39 | 0,22 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,70 |
| Contribución (%) | 63,45 | 22,74 | 13,18 | 0,29 | 0,14 | 0,05 | 0,00 | |

5 Se ha confirmado a partir de la Tabla 9 que el extracto de té oolong y el oleato de monoglicero ambos contribuyen al mantenimiento del recuento de células viables. También se ha observado que el mantenimiento del recuento de células viables se puede potenciar de forma sinérgica cuando se usan en combinación té oolong y oleato de monoglicero.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una leche fermentada que comprende un ingrediente lácteo fermentado obtenido mediante la fermentación con una o más bacterias del ácido láctico seleccionadas entre *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, y *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris* y un factor del crecimiento de bacterias del ácido láctico seleccionado entre extracto de jengibre, extracto de té o extracto de cebolla de verdea, en la que dicho extracto de té se ha obtenido mediante extracción ácida.
- 10 2. La leche fermentada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho extracto de jengibre o extracto de cebolla de verdea se ha obtenido mediante extracción ácida.
- 15 3. Una leche fermentada de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha extracción ácida se ha conducido a un pH no mayor de 4,0 y a una temperatura no menor de 80°C.
- 20 4. La leche fermentada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cantidad de grasa es del 0,05 al 0,5%.
- 25 5. Un proceso para la producción de una leche fermentada, que comprende cultivar, en un medio de cultivo en el que están contenidos uno o más factores de crecimiento de bacterias del ácido láctico que se seleccionan entre extracto de jengibre, extracto de té y extracto de cebolla de verdea, una o más bacterias del ácido láctico seleccionadas entre *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, y *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris*, en el que dicho extracto de té se ha obtenido mediante extracción ácida.
- 30 6. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho extracto de jengibre o extracto de cebolla de verdea se ha obtenido mediante extracción ácida.
- 35 7. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, en el que dicha extracción ácida se ha conducido a un pH no mayor de 4,0 y una temperatura no menor de 80°C.
- 30 8. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicha leche fermentada contiene grasa en una cantidad de desde el 0,05 al 0,5%.
- 35 9. Uso de un factor de crecimiento de bacterias del ácido láctico seleccionado entre extracto de jengibre, extracto de té y extracto de cebolla de verdea para promover el crecimiento y la mejora de la viabilidad de una o más bacterias del ácido láctico seleccionadas entre *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, y *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris* en la preparación de leche fermentada.

FIG. 1

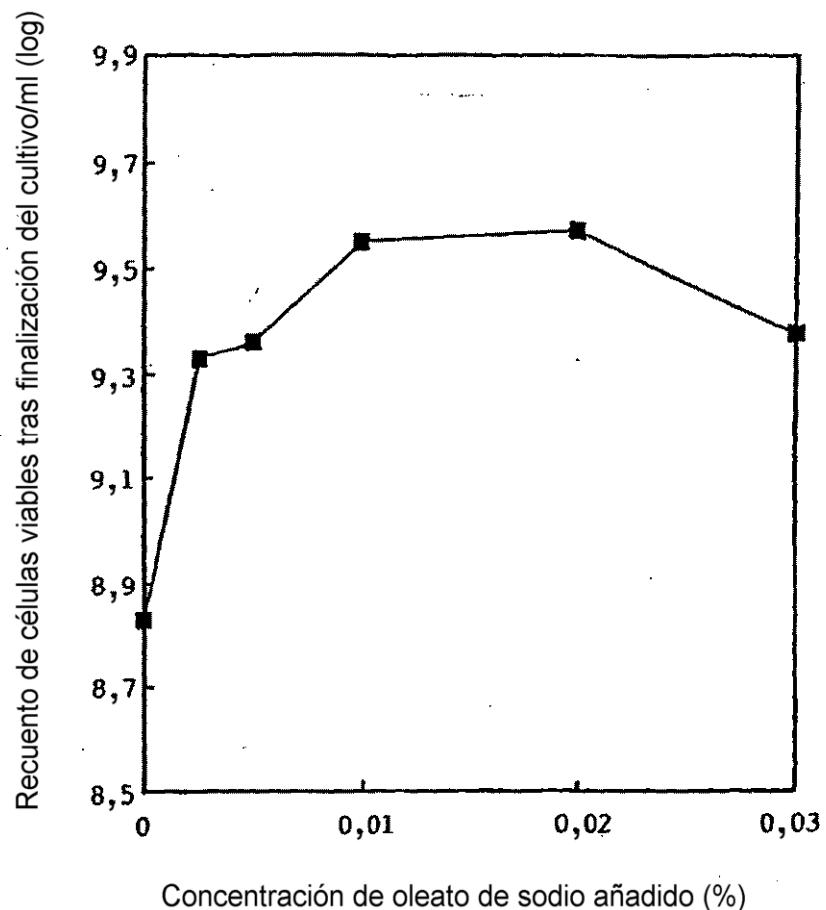


FIG. 2

