

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 133**

51 Int. Cl.:  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12R 1/225** (2006.01)  
**A23C 11/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08764463 .9**
- 96 Fecha de presentación: **21.05.2008**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2154238**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.02.2010**

54 Título: **Nueva cepa de bacteria ácido láctica, bebidas/comestibles fermentados, y procedimiento para la producción de bebidas/comestibles fermentados**

30 Prioridad:  
**31.05.2007 JP 2007145678**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.04.2012**

73 Titular/es:  
**KAGOME CO., LTD**  
**14-15, NISHIKI 3-CHOME, NAKA-KU**  
**NAGOYA-SHI, AICHI 460-0003, JP**

72 Inventor/es:  
**SUZUKI, Shigenori;**  
**TAKEDA, Masahiko;**  
**INOUE, Takuro;**  
**KAWASAKI, Rika;**  
**ARAKAWA, Chinatsu;**  
**KATO, Ikuo y**  
**YAKABE, Takafumi**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

ES 2 379 133 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

Nueva cepa de bacteria ácido láctica, bebidas/comestibles fermentados, y procedimiento para la producción de bebidas/comestibles fermentados.

5

**Antecedentes de la invención**Campo de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa de bacteria ácido láctica, a productos bebibles o comestibles fermentados, y a procedimientos para producir las bebidas o los comestibles fermentados.

Se reivindica prioridad a la solicitud de patente japonesa nº 2007-145678, presentada en el 31 de mayo de 2007.

15 Descripción de la técnica relacionada

Las bacterias ácido lácticas se han utilizado para producir varios productos bebibles y comestibles fermentados, y algunas de las bacterias *per se* poseen unas actividades fisiológicas excelentes, tales como actividad reguladora intestinal y actividad inhibitoria contra las bacterias patógenas. Dichas bacterias ácido lácticas útiles se utilizan para la producción del producto bebible o comestible, y además unos productos bebibles o comestibles fermentados excelentes, concebidos para resultar beneficiosos para la salud de una persona, pueden producirse conservando las bacterias ácido lácticas vivientes en los productos bebibles o comestibles fermentados.

Por otra parte, se han desarrollado intensamente, comestibles y bebidas que procesan materias primas vegetativas tales como vegetales, debido a que una ingestión vegetal insuficiente que pertenece a los hábitos dietéticos occidentales, ha resultado un gran problema.

En dicha situación, han captado la atención los productos bebibles o comestibles que son producidos mediante fermentación de materias primas vegetativas con las bacterias ácido lácticas. Estos productos bebibles o comestibles fermentados proporcionan un sabor distintivo excelente, y no solo pueden cubrir dicha ingesta vegetal insuficiente, sino que proporcionan también bacterias ácido lácticas útiles en una situación viable.

Se han dado a conocer procedimientos para productos bebibles o comestibles fermentados, que son producidos mediante la fermentación de materias primas vegetativas con bacterias ácido lácticas. Por ejemplo, se dan a conocer un procedimiento de fermentación ácido láctico añadiendo productos lácteos a materias primas vegetativas (véase documentos de patente 1 y 2), un procedimiento de fermentación ácido láctico añadiendo azúcar (en particular, lactosa) a materias primas vegetativas (véanse documentos de patente 3 y 4), y un procedimiento para utilizar bacterias ácido lácticas que pueden fermentar materias primas vegetativas, (véanse documentos de patente 5, 6 y 7).

40

- Documento de patente 1: solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación nº Sho 60-248131
- Documento de patente 2: solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación nº Hei 1-179646
- Documento de patente 3: solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación nº Hei 1-247035
- Documento de patente 4: solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación nº Hei 7-236417
- 45 - Documento de patente 5: solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación nº Hei 5-84065
- Documento de patente 6: solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación nº Hei 5-84066
- Documento de patente 7: solicitud de patente japonesa abierta al público nº 2007-37503

Sin embargo, los procedimientos existentes presentan un problema que limita las condiciones de la fermentación. Ya que el contenido de lactosa es muy bajo, es difícil que las habas de soja fermenten completamente sin utilizar lactosa. Por tanto, es difícil ajustar el sabor de los productos bebibles y comestibles fermentados, si se utilizan las habas de sojas como principales materias primas. Sin suficiente fermentación, también es difícil que se forme cuajo, por ejemplo, es difícil producir productos sólidos de fermentación que presenten un aroma ajustado, y es un problema que los productos obtenidos de la fermentación tengan una variedad limitada.

55

Además, existen problemas porque el aroma de los productos bebibles y comestibles fermentados que utilizan bacterias ácido lácticas que pueden fermentar con materias primas vegetativas, no está suficientemente mejorado, y además la estabilidad de la calidad durante el almacenamiento en refrigeración es insuficiente.

Contrariamente, las bacterias del ácido láctico, que pertenecen a *Lactobacillus pentosus* tal como la cepa de *Lactobacillus pentosus* JCM1558<sup>T</sup>, pueden fermentar las habas de soja sin utilizar lactosa. Sin embargo, no existen cepas que presenten tanta capacidad de formación del cuajo como estabilidad de la calidad durante el tiempo de almacenamiento refrigerado. Además, existe un problema, que el producto fermentado presenta olores de tipo adobo.

65

**Sumario de la invención**

5 La presente invención se ha obtenido considerando la situación anterior, con el objetivo que consiste en proporcionar nuevas bacterias ácido lácticas que muestren un aroma excelente, menos variación en la calidad después del almacenamiento refrigerado, y una alta capacidad de formación de cuajo durante la fermentación, que proporcionen bebidas o comestibles fermentados producidos mediante fermentación utilizando las nuevas bacterias ácido-lácticas, y proporcionando procedimientos para producir productos bebibles o comestibles fermentados utilizando las nuevas bacterias ácido lácticas.

10 La presente invención incluye los aspectos siguientes:

- (1) *Lactobacillus pentosus* cepa FERM BP-10958.
- 15 (2) Procedimiento para producir un producto bebible o comestible fermentado que incluye la etapa de fermentación, utilizando *Lactobacillus pentosus* según (1).
- (3) Producto bebible o comestible obtenido mediante fermentación utilizando *Lactobacillus pentosus* según (1).
- 20 (4) Composición que incluye un cultivo biológicamente puro de *Lactobacillus pentosus* según (1)

Los productos bebibles o comestibles que poseen un aroma excelente y una menor variación de calidad después del almacenamiento refrigerado, pueden producirse utilizando las bacterias ácido lácticas de la presente invención. Los comestibles sólidos y los productos bebibles fermentados pueden producirse debido a que la capacidad de formar cuajo es elevada si las habas de soja se utilizan como materiales.

25 **Descripción breve de las figuras**

La figura 1 es una imagen de la presente cepa. La figura 1A muestra una imagen colonial, y la figura 1B muestra su imagen teñida.

30 La figura 2 es un gráfico del contejo bacteriano viable de un cultivo de los ejemplos y de los ejemplos comparativos. La figura 2A muestra los resultados de la medición al comienzo y al final del cultivo. La figura 2B muestra los resultados de la medición durante la refrigeración.

35 La figura 3 es un gráfico del pH del cultivo de los ejemplos y de los ejemplos comparativos. La figura 3A muestra los resultados de la medición al comienzo y al final del cultivo. La figura 3B muestra los resultados de la medición durante la refrigeración.

40 La figura 4 es un gráfico de la acidez expresada en términos del ácido láctico del cultivo de los ejemplos y de los ejemplos comparativos. La figura 4A muestra los resultados de la medición al comienzo y al final del cultivo. La figura 4B muestra los resultados de la medición durante la refrigeración.

**Descripción detallada de la invención**

45 A continuación, la presente invención se explicará con mayor detalle.

<Obtención de la cepa FERM BP-10958 de *Lactobacillus pentosus*>

50 El sibazuke recogido en la zona de Ohara de Sakyo-ku de Kyoto, se fragmentó finamente en cubos de 5 mm o más pequeños, utilizando un escalpelo esterilizado, diluyéndose asépticamente 10 veces con una solución salina progresiva en 8 etapas, para obtener una serie de 8 muestras de dilución.

Se añadió 1 ml de las muestras de dilución gota a gota a una placa de Petri, utilizándose un medio MRS de agar que contenía 0,5% (peso/vol) de carbonato cálcico, para producir asépticamente una placa de agar, mediante un procedimiento de vertido en placa, seguido por un cultivo anaeróbico de 30°C durante 48 horas.

60 Después del cultivo, se observó la morfología estereoscópica de las colonias formadas en el centro del agar, pinchándose una colonia lenticular blanca con un diámetro de aproximadamente 1 mm, que se cultivó asépticamente mediante picado en un medio para almacenamiento (conteniendo el medio de MRS agar 0,5% (peso/vol) de carbonato cálcico precipitado) para inoculación, cultivándose entonces anaeróticamente a 30% durante 24 horas.

El cuerpo bacteriano que se desarrolló en el medio mediante de picado, para almacenamiento, se pinchó con una aguja de platino y se suspendió en 1 ml de una solución salina fisiológica.

65 La solución salina fisiológica suspendida y un medio MRS agar que contenía 0,5% (peso/vol) de carbonato cálcico precipitado, se utilizaron para producir asépticamente una placa plana de agar, de acuerdo con un procedimiento de

vertido en placa, llevándose a cabo entonces un cultivo anaeróbico a 30°C durante 48 horas.

Después del cultivo, se observó la morfología estereoscópica de las colonias formadas en el centro del agar, pinchándose una colonia lenticular con un diámetro de aproximadamente 1 mm, cultivándose asépticamente mediante picado en un medio para almacenamiento (el medio de MRS agar conteniendo 0,5% (peso/vol) de carbonato cálcico precipitado) para inoculación, cultivándose entonces anaeróbicamente a 30°C durante 24 horas.

El cuerpo bacteriano desarrollado en el cultivo de picado para almacenamiento, se pinchó asépticamente con una aguja de platino, se veteó en un medio para vetear cultivos (medio BL agar), cultivándose entonces anaeróbicamente a 30°C durante 48 horas.

Después del cultivo, se examinó la morfología superficial de las colonias y una colonia redondeada y de borde suave que emergía de forma semicircular y con un tono coloreado del centro al borde que se convertía en castaño rojizo o blanco, fue seleccionada para obtener *Lactobacillus pentosus* FERM BP-10958 (que en adelante es denominada a veces como "actual"). Una imagen capturada de esta cepa se muestra en la figura 1, en este momento. Las condiciones para capturar imágenes son las siguientes: Imagen de la colonia: Se tomó una fotografía próxima a una distancia de 3 cm de la lente; utilizando una cámara digital COOLPIX 4500 fabricada por Nikon Corporation). Imagen teñida: se tomó una fotografía utilizando una cámara digital DP70 (fabricada por Olympus Corporation) y un microscopio BX51 (fabricado por Olympus Corporation) y una lente del objetivo de inmersión de aceite con un aumento de 100x.

<Identificación de la cepa FERM BP-10958 de *Lactobacillus pentosus*.>

(Propiedades morfológicas).

Las propiedades morfológicas de la presente cepa se analizaron mediante observación microscópica de las colonias cultivadas en cada medio mencionado anteriormente. Los resultados revelaron que la presente cepa tenía una morfología celular en forma de bastoncillo y ni las esporas ni la motilidad que la de la cepa JCM1558<sup>T</sup> (a la que en adelante a veces se abreviará como "cepa tipo").

(Propiedades fisiológicas)

Las propiedades fisiológicas de la presente cepa se evaluaron mediante un procedimiento habitualmente conocido, y se compararon con las de la cepa tipo. Los resultados son presentados en la tabla 1

Tal como se muestra en la tabla 1, la presente cepa mostró las mismas propiedades fisiológicas que las de la cepa tipo.

Tabla 1

	Cepa tipo	La presente cepa
Capacidad de tinción Gram	+	+
Catalasa	-	-
Producción de ácido a partir de glucosa	+	+
Producción de gas a partir de glucosa	+	+
Crecimiento	15°C	+
	45°C	-
"+" indica positivo y "-" indica negativo		

(Capacidad de degradación de los hidratos de carbono).

La capacidad de degradación de varios tipos de hidratos de carbono de la presente cepa, se evaluaron utilizando el equipo para el ensayo de identificación bacteriano, Api 50 CH (fabricado por bio Merieux, S.A.), y se compararon con las de la cepa tipo. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y Tabla 3.

Como resulta evidente a partir de las tablas 2 y 3, las diferencias en la capacidad de asimilación de la D-xilosa y la D-rafinosa se observaron entre la presente cepa y la cepa tipo (la diferencia se muestra por "\*" en las tablas)

Tabla 2

Nº	Sustrato	Cepa tipo	La presente cepa
0	Control	-	-
1	Glicerol	+	+
2	Eritritol	-	-
3	D-arabinosa	-	-
4	L-arabinosa	+	+
5	Ribosa	+	+
6	D-xilosa*	+	-
7	L-xilosa	-	-
8	Adonitol	-	-
9	$\beta$ -metil-D-xilosa	-	-
10	Galactosa	+	+
11	D-glucosa	+	+
12	D-fructosa	+	+
13	D-mannosa	+	+
14	L-sorbosa	-	-
15	Rhamnosa	-	-
16	Dulcitol	-	-
17	Inositol	-	-
18	Mannitol	+	+
19	Sorbitol	+	+
20	$\alpha$ -metil-D-manósido	-	-
21	$\alpha$ -metil-D-glucosido	-	-
22	N-acetil-glucosamina	+	+
23	Amigdalina	+	+
24	Arbutina	+	+
"+" indica positivo y "-" indica negativo			

Tabla 3

5

Nº	Sustrato	Cepa tipo	La presente cepa
25	Esculina	+	+
26	Salicina	+	+
27	Cellobiosa	+	+
28	Maltosa	+	+
29	Lactosa	+	+
30	Melibiosa	+	+
31	Sacarosa	+	+
32	Trehalosa	+	+
33	Inulina	-	-
34	Melezitosa	-	-
35	D-rafinosa*	-	+
36	Almidón	-	-
37	Glicógeno	-	-
38	Xilitol	-	-
39	Genitiobiosa	+	+
40	D-turanosa	-	-
41	D-lixosa	-	-
42	D-tagatosa	-	-
43	D-fucosa	-	-
44	L-fucosa	-	-
45	D-arabito	-	-
46	L-arabitol	-	-
47	Ácido glucónico	-	-
48	2-ácido cetoglucónico	-	-
49	5-ácido cetoglucónico	-	-
"+" indica positivo y "-" indica negativo			

(Secuencia nucleótida)

La secuencia nucleótida (secuencia parcial) del 16S rADN de la presente cepa se determinó mediante un procedimiento conocido habitualmente. Entre las secuencias nucleótidas determinadas, la secuencia nucleótida desde el extremo 5' (posición 1) a la posición 495, se muestra en SEC. ID nº 1. La secuencia nucleótida determinada se sometió a la investigación homóloga del DNA Data Bank of Japan (BLAST), administrado por el Center for Information Biology y el DDBJ, National Institute of Genetics, Research Organization of Information and Systems, Inter-University Research Institute Corporation.

Como resultado, la secuencia nucleótida que se muestra en SEC. ID nº 1 de esta cepa, mostró un 99% o más de homología con respecto a la cepa tipo, en la cual una base en la posición 22 era desconocida, mientras el resto era el mismo que en la cepa tipo.

Como se muestra en los resultados anteriores, comparando la presente cepa y la cepa tipo, la secuencia nucleótida de 16S rADN mostró una homología del 99% o más, siendo iguales las propiedades morfológicas y fisiológicas, aunque las capacidades de degradación de los hidratos de carbono eran distintas. Además, la presente cepa fue marcadamente superior a la cepa tipo en la capacidad de cuajar durante el cultivo. Así, la presente cepa es aparentemente distinta de las cepas convencionales de bacterias ácido lácticas que pertenecen a *Lactobacillus pentosus*.

A partir de lo expuesto anteriormente, la presente cepa constituye una cepa nueva de bacterias ácido lácticas que pertenecen a *Lactobacillus pentosus*.

<Cepa de bacterias ácido lácticas>

La cepa FERM BP-10958 de *Lactobacillus pentosus* en la presente invención se depositó en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Central 6, 1-1 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón, (número de código postal 305-8566)), como número de registro FERM BP-10958 (número de registro doméstico FERM P-21248) el 9 de marzo de 2007.

Las bacterias ácido lácticas en la presente invención poseen una capacidad superior formadora con respecto a la fermentación de las habas de soja. En un procedimiento existente, la adición de lactosa al medio era necesaria para formar cuajo con la fermentación de las habas de soja, porque ésta contiene tan poca lactosa que las habas de soja era difícil que fermentaran.

Sin embargo, las bacterias ácido lácticas en la presente invención pueden fermentar rápidamente las habas de soja sin añadir lactosa, por lo que las bacterias ácido lácticas son útiles para preparar yogures sólidos.

Las bacterias ácido lácticas en la presente invención son útiles especialmente para la fermentación de materias primas vegetativas. Los ejemplos que pueden utilizarse de las materias primas vegetativas pueden incluir vegetales, frutos, y alubias.

Los ejemplos de vegetales pueden incluir tomates, pimientos rojos, lechugas, zanahorias, coles, coles chinas, rábanos blancos, espinacas coliflor, cebollas, berenjena, PETIT VERT (marca de un cruzamiento de col de Bruselas y col rizada), setas Shiitake, y setas shimeji.

Los ejemplos de frutos pueden incluir pomelos, naranjas, fresas, piñas, arándanos, granadas, frutos de kiwi, guavas, mangos, acerolas, melocotones, peras, papayas, melones, sandías, plátanos e higos.

Los ejemplos de semillas pueden incluir maíz (malta) y arroz, y ejemplos de alubias pueden incluir alubias de soja y guisantes.

En la presente invención, estas materias primas vegetativas pueden utilizarse solas o en combinación de dos o más tipos. La combinación óptima puede seleccionarse apropiadamente según el producto objeto.

Las bacterias ácido lácticas en la presente invención se precultivan preferentemente antes de ser utilizadas para la fermentación. El precultivo puede llevarse a cabo mediante un procedimiento habitualmente conocido. Sus ejemplos incluyen un procedimiento en el que un medio comercializado para las bacterias ácido lácticas se disuelve en agua destilada a una concentración predeterminada, seguido por esterilización en un autoclave y entonces, las bacterias ácido lácticas en la presente invención, se inoculan en ese medio y se someten a precultivo durante un tiempo predeterminado. Las materias primas vegetativas que se han mencionado anteriormente y el jugo preferentemente concentrado pueden utilizarse en lugar de un medio comercializado para las bacterias ácido lácticas. En el precultivo, las bacterias ácido lácticas pueden inocularse en un medio sólido, pero resulta preferido un medio líquido.

La condición fermentativa de las bacterias ácido lácticas en la presente invención puede seleccionarse apropiadamente según los materiales que van a utilizarse y el objetivo. Preferentemente, la cantidad de la

inoculación de las bacterias ácido lácticas en la presente invención es de 0,1 a 10% en volumen, siendo la temperatura de fermentación de 20 a 40°C, y el tiempo de 3 a 72 horas.

<Comestibles o bebidas fermentados, y procedimientos para producir las bebidas o los comestibles fermentados>

Las bebidas o comestibles fermentados de la presente invención son producidos por la fermentación de las bacterias del ácido láctico de la presente invención mencionadas anteriormente.

El procedimiento para producir las bebidas o comestibles fermentados de la presente invención es un procedimiento de fermentación con las bacterias del ácido láctico de la presente invención mencionadas anteriormente.

Si los materiales son fermentados con las bacterias del ácido láctico de la presente invención, el producto fermentado puede utilizarse directamente como bebida o comestible fermentado o puede ser tratado o fermentado tal como se requiera, para utilizarse como una bebida o comestible fermentado. La condición fermentativa es la misma que la descrita anteriormente.

Los materiales de fermentación no están limitados especialmente, aunque las materias primas vegetativas anteriormente descritas resultan preferidas. La combinación óptima puede seleccionarse apropiadamente según la calidad deseada.

Además, para los materiales de fermentación, los materiales de procesamiento apropiado pueden también utilizarse. Por ejemplo, las materias primas vegetativas pueden utilizarse en forma de un líquido molido o de forma pulverizada, o en forma procesada tal como una forma concentrada, diluida o secada. Específicamente, cuando las habas de soja se utilizan, puede utilizarse una forma de leche de habas de soja, o una suspensión de pequeñas gotitas. En la presente invención, los materiales de fermentación en forma líquida son especialmente apropiados para el uso.

Los materiales complementarios pueden añadirse a los productos bebibles y comestibles fermentados de la presente invención, en un grado en que el efecto de la presente invención no se altera. Ejemplos de materiales complementarios son otros materiales alimenticios que se utilizan generalmente para alimentos que ajusten el pH, especias y soluciones azucaradas.

Por ejemplo, la adición de lactosa no es indispensable para la fermentación de las judías de soja con las bacterias ácido lácticas de la presente invención, pero la lactosa puede añadirse con la finalidad de ajustar el aroma de los comestibles fermentados y de los productos bebibles. La lactosa, por ejemplo, puede añadirse mediante la adición de leche seca no grasa.

Comparados con los productos bebibles o comestibles fermentados producidos mediante fermentación, utilizando las cepas convencionales de las bacterias ácido lácticas que pertenecen a *Lactobacillus pentosus*, los productos bebibles o comestibles fermentados de la presente invención presentan menos olores de tipo adobo, son más fragantes y más favorables en términos de sensualidad. Además, los productos bebibles o comestibles tienen excelentes cualidades de mantenimiento, ya que los productos presentan un cambio pequeño de propiedades tales como el pH y la acidez, conservando los productos un aroma excelente en el almacenamiento refrigerado.

### Ejemplos

A continuación, la presente invención se explicará con mayor detalle mediante los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a éstos.

<Características fermentativas del medio de habas de soja>

(Ejemplos)

Se diluyó con agua destilada jugo concentrado de zanahoria con un 42% de Brix, de forma que se ajustara su pH a 6,4 y el Brix al 12%. El medio de zanahoria así producido se inoculó con 1% (vol/vol) de una suspensión bacteriana crioconservada de la presente cepa, cultivándose a 30°C durante 18 horas, para realizar la activación. Entonces, el producto resultante se volvió a cultivar bajo ciertas condiciones, utilizándose como una solución precultivo.

A continuación, fueron inoculados 50 ml de un medio que contenía polvo de habas de soja al 25% (peso/vol) comercializado, glucosa al 2% (peso/vol) y fructosa al 4% (peso/vol), 1% (peso/vol) de la solución precultivo mencionada anteriormente, llevándose a cabo entonces a 30°C durante 9 horas el cultivo.

Entonces el cultivo se refrigeró a 5°C o 10°C durante 21 días.

Para la refrigeración, las características de la fermentación del medio se evaluaron tal como se describe a continuación. El conteo bacteriano viable en el cultivo, y el pH y la acidez del cultivo se sometieron a ensayo al principio, al final y durante el tiempo de refrigeración del cultivo de la forma siguiente; observándose visualmente el

cuajo del cultivo de la forma siguiente. Además, la evaluación sensitiva del aroma del cultivo, se realizó en un total de 20 individuos formados por 10 hombres y 10 mujeres.

(Ejemplos comparativos)

5 Los cultivos y evaluaciones se llevaron a cabo de modo similar a los ejemplos descritos anteriormente, excepto porque la cepa tipo se utilizó en vez de la presente cepa

(Procedimiento de medición)

10 (1) Contaje bacteriano viable en el cultivo

15 Se vertió 1 ml del cultivo seriado de dilución en placas de Petri. Las placas de vertido se prepararon añadiendo aproximadamente 20 ml del medio MRS de agar (fabricado por OXOID Limited), a las placas de Petri. Éstas se incubaron a 30°C durante 2 días, realizándose un contaje bacteriano viable mediante contaje de las colonias formadas.

(2) pH del cultivo.

20 El pH se determinó con un medidor de pH F-52 (fabricado por HORIBA Limited).

(3) Acidez del cultivo.

25 La acidez del cultivo se determinó mediante un procedimiento de titulación. Es decir, se pesaron aproximadamente 5 g de muestra, y aproximadamente 500 µl de fenolftaleína se añadieron a la muestra. Se añadió gota a gota a la muestra 0,1 N de hidrato sódico, finalizándose la adición cuando la solución era de un ligero color rojo. La acidez se calculó con el título, utilizando la ecuación siguiente.

30 Fórmula para computación: Porcentaje de acidez (%) = (normalidad de la solución de hidrato sódico) x (título de la solución de hidrato sódico (L)) x (1 g de peso equivalente de ácido láctico) ÷ (peso de la muestra) x 100.

(4) Cuajo del cultivo

35 Se invirtió un recipiente antes de la inoculación y después del cultivo, y si el cuajo no caía hacia abajo después de 60 segundos, se indicó "O". Si el cuajo caía antes de 60 segundos, se indicó "Δ", y si no se formó el cuajo, se indicó "X" en una tabla.

(Resultados de la Evaluación)

40 Los resultados de la evaluación se muestran en las figuras. La figura 2 es un gráfico que muestra un contaje bacteriano viable en el cultivo. La figura 3 es un gráfico que muestra el pH del cultivo. La figura 4 es un gráfico de la acidez del cultivo. La figura 2A-figura 4A muestra los resultados de la medición al comienzo y al final del cultivo, y la figura 2B-figura 4B muestra los resultados de la medición para el período de refrigeración.

45 (A) Al comienzo y al final del cultivo

No existen grandes diferencias entre la presente cepa y la cepa tipo con respecto a la tasa de crecimiento del contaje bacteriano viable.

50 Tampoco existen grandes diferencias entre la presente cepa y la cepa tipo con respecto a cambios del pH y acidez al comienzo y al final del cultivo.

55 Contrariamente a esto, se mostró que la presente cepa presentaba una mejor capacidad de formación del cuajo que la cepa tipo. El resultado se consideró que estaba causado por factores distintos que los efectos del ácido producido. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

(Tabla 4)

Cuajo	Antes de la inoculación	Después del cultivo
Cepa tipo	X	Δ
Presente cepa	X	O

60 Cuando un aroma del cultivo en un punto final se evaluó sensorialmente (Evaluación sensorial 1), el cultivo de la cepa tipo dio lugar a un olor de tipo adobo. Sin embargo, el cultivo de esta cepa no presentaba olor de tipo adobo, y el resultado fue favorable en términos de sensualidad. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

(Tabla 5)

(Evaluación sensitiva 1)	
	Número de personas que evaluaron el aroma como favorable
Cepa tipo	1
Presente cepa	19
* Muestra una diferencia significativa con un nivel de significación del 0,1%	

## (B) Almacenamiento refrigerado

5 El contaje bacteriano viable del cultivo de la cepa tipo no disminuyó tanto cuando el cultivo se almacenó a 10°C. Sin embargo, el contaje bacteriano viable disminuyó claramente cuando el cultivo se almacenó a 5°C. En contraste, el contaje bacteriano viable del cultivo de la presente cepa disminuyó claramente cuando se almacenó no sólo a 5°C, sino también a 10°C.

10 A 5°C y 10°C de temperatura de almacenamiento, los cambios de pH y acidez del cultivo de esta cepa, fueron menores que los de la cepa tipo.

15 Con cultivos de esta cepa y de la cepa tipo, el aroma de una muestra, que se congeló justamente después del cultivo, se guardó y se descongeló, y el aroma de una muestra, que se almacenó a 10°C durante 21 días, se evaluaron sensorialmente (Evaluación sensible 2). Con el cultivo de esta cepa, el aroma de la muestra después del almacenamiento refrigerado no cambió casi nunca, y tanto la muestra del final del cultivo como la muestra después del almacenamiento resultaron preferidas. Comparado con éste, con el cultivo de la cepa tipo, el aroma cambió considerablemente después del almacenamiento, y el aroma no resultó preferido. Los resultados se muestran en la

20 Tabla 6.

A partir de los resultados anteriores, se confirmó que esta cepa fue más sensible a la temperatura que la cepa tipo y que casi no cambió la calidad cuando el cultivo se almacenó a una temperatura baja.

25 (Tabla 6)

(Evaluación sensorial 2)	
	Número de personas que evaluaron el aroma justo después del cultivo, como favorable
Cepa tipo	17 (*)
Esta cepa	13
* Esto muestra una diferencia significativa con un nivel de 0,1% de significación	

30 Tal como se describe anteriormente, se confirmó que las bacterias ácido lácticas de la presente invención, presentaban una capacidad excelente formadora de cuajo si las habas de soja se utilizaban para los materiales, y que podían producirse unos productos bebibles y comestibles fermentados, que tenían cualidades excelentes y un aroma deseable durante el almacenamiento refrigerado mediante las bacterias ácido lácticas de la presente invención.

35 La presente invención puede utilizarse para producir productos bebibles y comestibles fermentados.

**Listado de secuencias**

<110> KAGOME CO., LTD

40 <120> Nueva cepa de bacteria ácido láctica, bebidas o comestibles fermentados, y procedimiento para producir bebidas o comestibles fermentados

<130> B08572 -AD/SL/CAL

45 <140> EP 08764463.9

<141> 2008-05-21

<150> JP 2007-145678

<151> 2007-05-31

50 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

ES 2 379 133 T3

<210> 1  
<211> 495  
<212> ADN  
<213> *Lactobacillus pentosus* FERM BP-10958

5

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> n e s a, c, g, o t

10

<400> 1  
  
cgtggctttc tggtaaata cngtcaatac ctgaacagtt actctcagat atgttcttct 60  
ttaacaacag agttttacga gccgaaacct ttcttcactc acgggcggtt gctccatcag 120  
actttcgtcc attgtggaag attccctact gctgcctccc gtaggagttt gggccgtgtc 180  
tcagtcccaa tgtggccgat taccctctca ggtcggctac gtatcattgc catggtgagc 240  
cgttacccca ccatctagct aatcgcgccg gggaccatcc aaaagtgata gccgaagcca 300  
tctttcaaac tcggaccatg cggccaagt tggatgacgg tattagcatc tgttccagg 360  
tgttatcccc cgcttctggg caggtttccc acgtgttact caccagtctg ccactcactc 420  
aaatgtaaat catgatgcaa gcaccaatca ataccagagt tcgttcgact tgcatgtatt 480  
aggcacgccg ccagc 495

15

**REIVINDICACIONES**

1. Ceba de *Lactobacillus pentosus* FERM BP-10958.
- 5 2. Procedimiento para producir un producto bebible o comestible fermentado que comprende la etapa que consiste en: fermentar las materias primas utilizando el *Lactobacillus pentosus* según la reivindicación 1, para obtener un producto bebible o comestible fermentado.
- 10 3. Producto bebible o comestible fermentado obtenido mediante fermentación utilizando el *Lactobacillus pentosus* según la reivindicación 1, en el que dicho producto bebible o comestible comprende el *Lactobacillus pentosus* según la reivindicación 1.
4. Composición que comprende:
- 15 un cultivo biológicamente puro del *Lactobacillus pentosus* según la reivindicación 1.

FIG. 1A

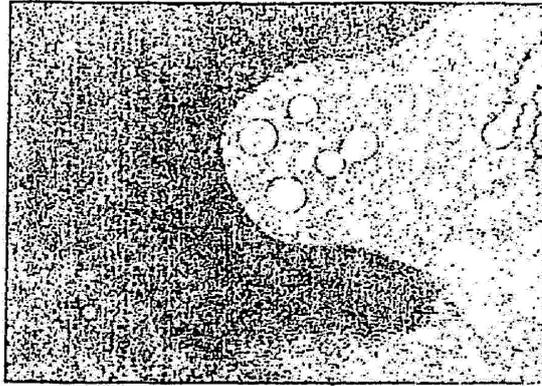


FIG. 1B

IMAGEN TEÑIDA

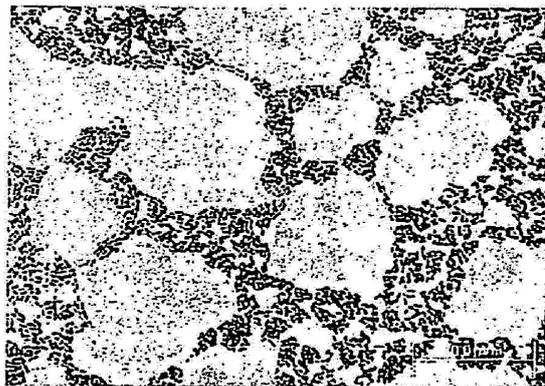


FIG. 2A

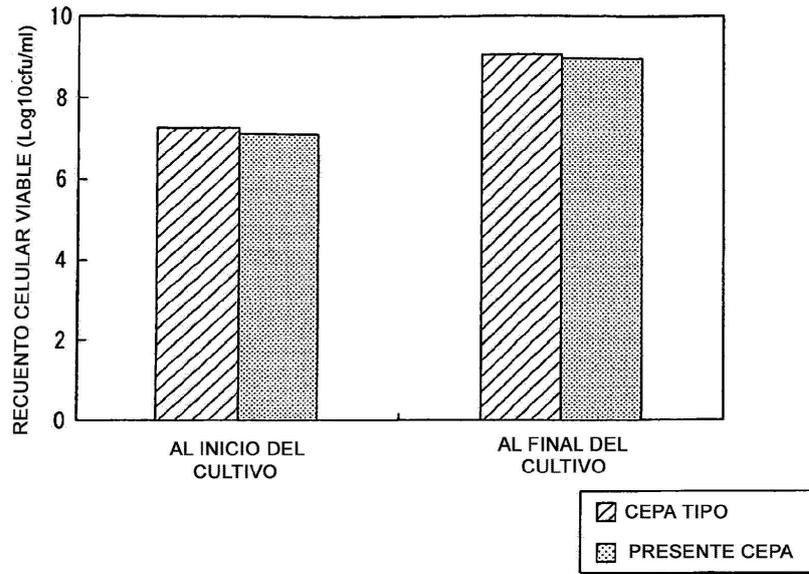


FIG. 2B

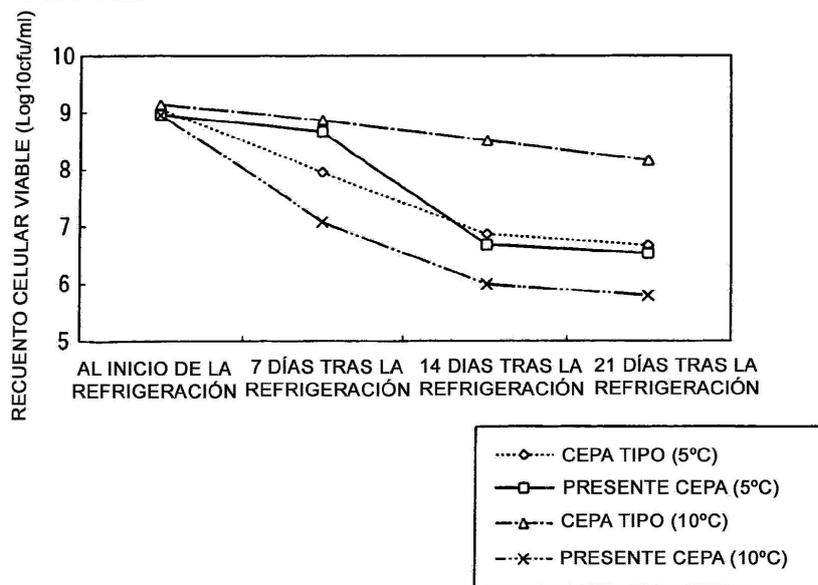


FIG. 3A

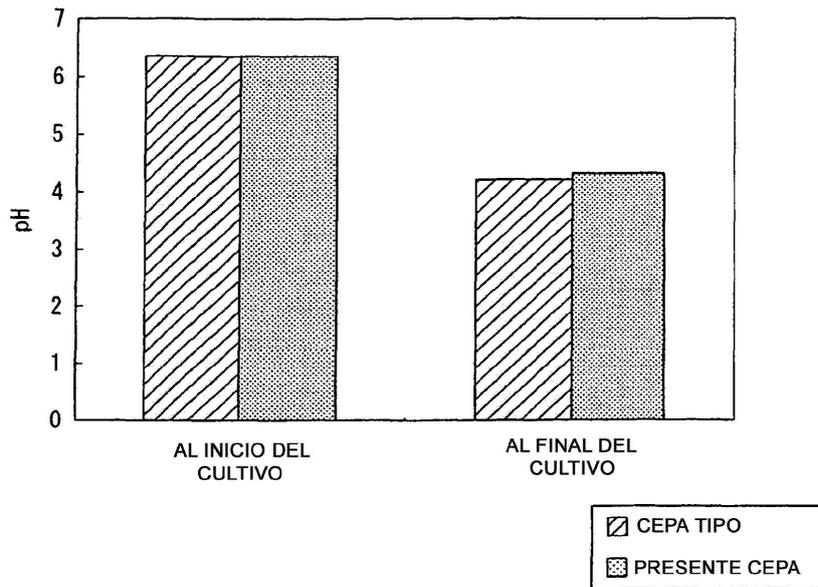


FIG. 3B

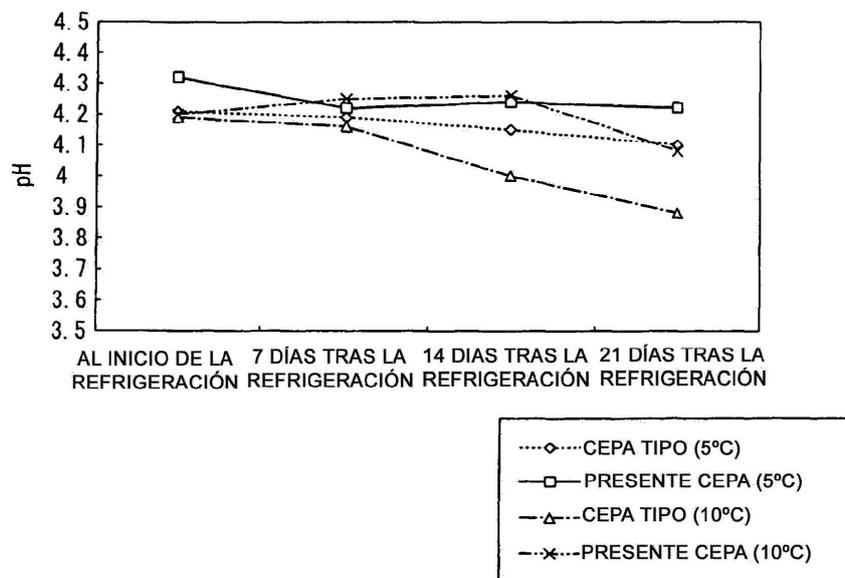


FIG. 4A

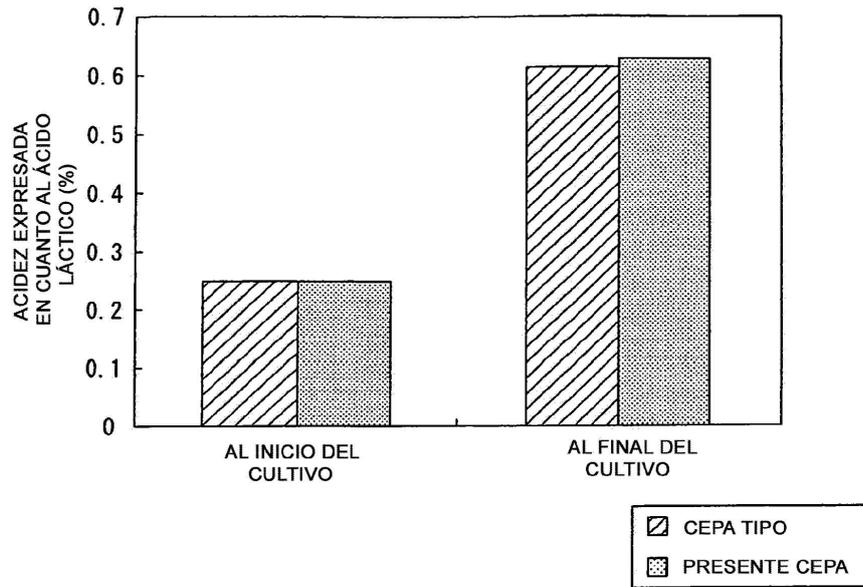


FIG. 4B

