

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 510**

51 Int. Cl.:
A23C 9/152 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09724345 .5**
96 Fecha de presentación: **11.03.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2258206**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.12.2010**

54 Título: **Bebida ácida de bacterias de ácido láctico y método para producir la bebida ácida de bacterias de ácido láctico**

30 Prioridad:
27.03.2008 JP 2008082285

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.07.2012

73 Titular/es:
Morinaga Milk Industry Co., Ltd.
33-1 Shiba 5-chome
Minato-ku Tokyo 108-8384, JP

72 Inventor/es:
SHIMIZU, Kanetada;
MURAKAMI, Kazuya;
TAKAHASHI, Sachiko;
HIRANO, Yuta;
ITOU, Tatsuya y
SUSAKI, Naoki

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 384 510 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

Bebida ácida de bacterias de ácido láctico y método para producir la bebida ácida de bacterias de ácido láctico

Antecedentes de la invención

Ámbito de la invención

5 La presente invención se refiere a una bebida ácida de bacterias de ácido láctico y a un método para producir la bebida ácida de bacterias de ácido láctico. En particular, la invención se refiere a una bebida ácida de bacterias de ácido láctico que tiene un sabor favorable y excelente supervivencia de las bifidobacterias durante el almacenamiento, así como a un método para producir tal bebida ácida de bacterias de ácido láctico.

10 Se reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente Japonesa nº 2008-82285, presentada el 27 de marzo de 2008, cuyo contenido se incorpora en ésta por referencia.

Descripción de la técnica relacionada

15 Las bifidobacterias son bacterias que crecen en el intestino grueso de los seres humanos y exhiben efectos fisiológicamente ventajosos tales como inhibir las bacterias patógenas y regular las funciones intestinales y, debido a que juegan un importante papel para mantener la salud de las personas, el uso de bifidobacterias en todas formas de productos alimenticios está muy difundido. En particular, las bebidas ácidas de bacterias de ácido láctico que incluyen cultivos de bifidobacterias que contienen principalmente leche como medio de cultivo proporcionan un alto valor nutricional y son muy populares.

20 No obstante, las bifidobacterias tienen propiedades bacterianas diferentes de las típicas bacterias de ácido láctico en que (1) son bacterias anaeróbicas obligadas que no crecen en ambientes donde exista oxígeno, y (2) tienen baja resistencia al ácido. De acuerdo con esto, el almacenamiento a largo plazo dentro de ambientes de bajo pH, tales como dentro de leche fermentada o bebidas de bacterias de ácido láctico, es difícil, y mantener un elevado recuento bacteriano vivo de bifidobacterias dentro de tales bebidas es problemático.

25 De acuerdo con esto, se han llevado a cabo ensayos en los que se añade fibra dietética para mejorar las propiedades de almacenamiento de las bifidobacterias. El documento de patente 1 describe que, añadiendo bifidobacterias a una solución de leche cruda que contiene fibra dietética insoluble añadida y, después, cultivando las bifidobacterias, la tasa de supervivencia para las bifidobacterias tras almacenamiento a 5°C durante 10 días es superior a la obtenida cuando no se añade fibra dietética insoluble.

30 Además, el documento de patente 2 describe que añadir un producto de descomposición de la fibra dietética soluble en agua galactomanano antes de la fermentación fomenta el crecimiento de las bifidobacterias y también mejora las propiedades de almacenamiento y supervivencia de la leche fermentada resultante (véase el documento de patente 2). El documento de patente 2 describe que no se observaron efectos cuando se añadió el producto de descomposición de galactomanano después de la fermentación, alcanzándose sólo los efectos cuando la adición se llevó a cabo antes de la fermentación. Además, estos efectos se limitaron a los productos de descomposición de galactomanano, y el documento describe que no se obtuvieron efectos cuando se añadieron inulina o dextrina indigestible antes de la fermentación.

35 [Documento de patente 1]

Solicitud de patente japonesa sin examinar, Primera publicación nº Sho 60-164432

[Documento de patente 2]

Publicación internacional nº WO 05/110107

40 Sumario de la invención

45 No obstante, las bebidas de bacterias de ácido láctico normalmente deben ser capaces de ser almacenadas durante 2 semanas o más tiempo a 10°C. De acuerdo con esto, la mejora en la tasa de supervivencia para las bifidobacterias tras almacenamiento a 5°C durante 10 días obtenida en el documento de patente 1 está lejos de ser totalmente satisfactoria. Además, el uso de fibra dietética insoluble también es problemático puesto que imparte una sensación arenosa áspera al producto.

50 Además, en un método tal como el descrito en el documento de patente 2, donde se añade un producto de descomposición de galactomanano antes de la fermentación, debido a que la fermentación de las bifidobacterias debe llevarse a cabo en presencia del producto de descomposición de galactomanano, una etapa de fermentación separada es una necesidad absoluta. Como resultado, se requieren instalaciones a gran escala que incluyen un tanque de fermentación, significando que el método no es apropiado para métodos de producción para bebidas de bacterias de ácido láctico que no requieren una etapa de fermentación, tales como los métodos en los que se añaden bifidobacterias congeladas o en polvo a una leche ácida.

La presente invención tiene en consideración las anteriores circunstancias con un objeto de crear una bebida ácida de bacterias de ácido láctico que tenga un sabor favorable y una tasa de supervivencia mejorada para las bifidobacterias.

Con el fin de alcanzar el anterior objeto, la presente invención adopta los aspectos descritos a continuación.

5 [1] Una bebida ácida de bacterias de ácido láctico que incluye bifidobacterias e inulina, en la que la inulina no está fermentada por las bifidobacterias.

[2] Una bebida ácida de bacterias de ácido láctico según [1] anterior, en la que una cantidad de la inulina está dentro de un intervalo desde 1 hasta 10% en masa.

10 [3] Una bebida ácida de bacterias de ácido láctico según [1] o [2] anteriores, que tiene un pH dentro de un intervalo desde 4,1 hasta 4,8.

[4] Una bebida ácida de bacterias de ácido láctico según [1] a [3] anteriores, en la que las bifidobacterias son *Bifidobacterium longum*.

15 [5] Un método para producir una bebida ácida de bacterias de ácido láctico, que incluye añadir un cultivo que contiene bifidobacterias a una base esterilizada, que incluye una leche cruda e inulina, y ha sido sometida a emulsificación y esterilización.

La bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención tiene un sabor favorable y exhibe una tasa de supervivencia mejorada para las bifidobacterias. Además, el método para producir una bebida ácida de bacterias de ácido láctico según la presente invención hace posible que se obtenga una bebida ácida de bacterias de ácido láctico que tiene un sabor favorable y una tasa de supervivencia mejorada para las bifidobacterias.

20 A continuación se presenta una descripción detallada de las realizaciones preferidas de la presente invención. No obstante, la presente invención no está limitada de ninguna forma por las realizaciones preferidas descritas a continuación, y puede ser modificada libremente dentro del alcance de la presente invención.

[Bebida ácida de bacterias de ácido láctico]

25 Una bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención contiene bifidobacterias e inulina. Además, siendo una bebida ácida de bacterias de ácido láctico, la bebida también incluye una leche.

Ejemplos de la leche cruda para la anterior leche incluyen leche de vaca, leche desnatada, sus productos concentrados y leche desnatada reconstituida. La leche incluye no sólo la leche cruda, sino también productos fermentados de la leche cruda.

30 Una bifidobacteria ideal para la presente invención es *Bifidobacterium longum*. Ejemplos específicos de *Bifidobacterium longum* incluyen las cepas ATCC15707 y ATCC BAA-999 de *Bifidobacterium longum*. Ejemplos de otras bifidobacterias distintas de *Bifidobacterium longum* incluyen *Bifidobacterium infantis* ATCC15697 y *Bifidobacterium bifidum* ATCC15696.

35 La bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención contiene preferiblemente una bacteria de ácido láctico que satisfaga las condiciones para "bebidas de bacterias de ácido láctico" prescritas en la ordenanza ministerial (la Ministerial Ordinance concerning Compositional Standards, etc. for Milk and Milk Products). Con el fin de calificar como bebida de bacterias de ácido láctico reconocida por la ordenanza ministerial, si el contenido de sólidos de leche desnatada es 3% en masa o mayor, entonces el recuento bacteriano de ácido láctico debe ser no menor que 10.000.000 por 1 ml. Además, si el contenido de sólidos de leche desnatada es menor que 3% en masa, entonces el recuento bacteriano de ácido láctico debe ser no menor que 1.000.000 por 1 ml.

40 La bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención puede incluir bacterias de ácido láctico además de las bifidobacterias. Ejemplos de estas bacterias de ácido láctico además de las bifidobacterias incluyen *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. De éstas, se prefiere el *Streptococcus thermophilus* puesto que exhibe compatibilidad favorable con las bifidobacterias. Ejemplos de *Streptococcus thermophilus* ideales para la presente invención incluyen las cepas ATCC19258 y FERM P-17216 de *Streptococcus thermophilus*.

45 La bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención puede incluir levadura además de las bacterias de ácido láctico. Además, la bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención puede ser una bebida ácida que contenga bifidobacterias e inulina, incluso si no incluye una bacteria de ácido láctico como se prescribe en la Ministerial Ordinance concerning Compositional Standards, etc. for Milk and Milk Products

50 La inulina usada en la presente invención es un polisacárido que contiene 2 hasta 60 unidades de fructosa unidas en una cadena lineal por medio de enlaces $\beta(2-1)$ con una única unidad de glucosa en un terminal. Las inulinas conocidas incluyen compuestos derivados naturalmente que existen en plantas tales como raíz de achicoria (tal como el producto comercial fibra de achicoria Raffiline ST, fabricado por BENEEO-Orafti Inc.), así como compuestos sintetizados a partir de azúcar (tal como el producto comercial Fuji FF, fabricado por Fuji Nihon Seito Corporation).

- 5 La inulina contenida dentro de la bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención no ha sido fermentada por las bifidobacterias. En otras palabras, la inulina no se añade hasta después de la etapa donde el cultivo iniciador de bifidobacterias o una base de leche fermentada que contiene las bifidobacterias experimenta fermentación, y, una vez que las bifidobacterias y la inulina se han mezclado, la mezcla de almacena a baja temperatura donde la fermentación (incubación) de las bifidobacterias no se produce.
- 10 La cantidad de inulina incluida dentro de la bebida ácida de bacterias de ácido láctico está preferiblemente dentro de un intervalo desde 1 hasta 10% en masa, y es más preferiblemente desde 2 hasta 5% en masa. Con tal que la cantidad de inulina sea al menos 1% en masa, se puede conseguir una mejora satisfactoria en la supervivencia de las bifidobacterias, y con tal que la cantidad no sea mayor que 10% en masa, el producto se puede impartir con un grado de viscosidad apropiado.
- 15 La inulina es soluble en agua y, por lo tanto, no produce sensación arenosa áspera, lo que significa que se puede mantener un sabor favorable para la bebida ácida de bacterias de ácido láctico.
- El pH de la bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención está preferiblemente dentro de un intervalo desde 4,1 hasta 4,8, y es más preferiblemente desde 4,5 hasta 4,8. Con tal que el pH sea al menos 4,1, las propiedades de almacenamiento y supervivencia de las bifidobacterias se pueden mantener fácilmente, mientras que un pH no mayor que 4,8 da un grado de acidez satisfactorio.
- 20 La bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención puede incluir un ácido como regulador del pH. Como este ácido, se puede usar cualquiera de los acidulantes o productos alimenticios ácidos convencionales usados como aditivos de alimentos. Ejemplos específicos de acidulantes que se pueden añadir incluyen ácido cítrico, ácido adípico, ácido itacónico, glucono delta-lactona, ácido glucónico, ácido α -cetoglutárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido acético glacial, ácido fítico, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico y sales sódicas de los anteriores ácidos. Ejemplos específicos de los anteriores productos alimenticios ácidos incluyen vinagre y zumo de frutas.
- 25 La bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención puede incluir un edulcorante con el fin de obtener un nivel de dulzor apropiado. Como edulcorante, se puede usar sacarosa sola, o se puede usar una combinación de sacarosa y un edulcorante de alto nivel. Además, si se requiere, también se pueden añadir aceites, grasas y/o aromas.
- 30 Con tal que la bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención se reconozca para uso dentro de las bebidas y productos alimenticios bajo las prescripciones para productos alimenticios en la Food Sanitation Act y similares, entonces también se pueden añadir a la bebida otros aditivos, con tal que la tasa de supervivencia de las bifidobacterias no se vea perjudicada. Por ejemplo, se pueden añadir estabilizadores tales como carboximetilcelulosa (CMC), pectina altamente metilada y fibra dietética de soja, y colorantes y los similares.
- 35 Al incluir inulina, la bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención es capaz de mantener un recuento bacteriano favorable para bifidobacterias vivas, incluso cuando la bebida se almacena durante un periodo considerable a continuación de la producción.
- [Método para producir bebida ácida de bacterias de ácido láctico]
- 40 El método para producir una bebida ácida de bacterias de ácido láctico según la presente invención incluye añadir un cultivo que contenga bifidobacterias a una base esterilizada, que contenga una leche cruda e inulina y haya sido sometida a emulsificación y esterilización.
- Con el fin de obtener la base esterilizada, preferiblemente se emulsiona y posteriormente se esteriliza una preparación de leche que contenga una leche cruda e inulina. La preparación de leche contiene preferiblemente todos las materias primas además del cultivo, incluyendo la leche cruda y la inulina.
- 45 No hay limitaciones particulares en la secuencia en la que se llevan a cabo la emulsificación y la esterilización, ni en el orden en el que se mezclan las materias primas, con tal que la base final se emulsione y esterilice. Por ejemplo, la leche cruda y la inulina se pueden esterilizar por separado, y después mezclar juntas y emulsionar. Por otra parte, una inulina esterilizada por separado se puede añadir a un líquido obtenido emulsionando y esterilizando una mezcla que contenga todas las materias primas además de la inulina y el cultivo.
- 50 Cuando se añade el cultivo que contiene las bifidobacterias, se puede añadir al mismo tiempo otro cultivo que contenga otras bacterias tales como *Streptococcus thermophilus*. Estos cultivos se pueden obtener usando métodos convencionales, incubando un cultivo simiente en un medio que contenga una leche.
- A continuación de la adición del (de los) cultivo(s), la bebida se almacena a baja temperatura. La temperatura de almacenamiento es preferiblemente no mayor que 10°C, y es más preferiblemente 5°C o menor.

Ejemplos

A continuación se describe una serie de ejemplos de ensayo y ejemplos, aunque la presente invención no está limitada de ninguna forma por los siguientes ejemplos.

5 En los siguientes ejemplos de ensayo y ejemplos, las cantidades presentadas para la fibra dietética, tal como inulina, representan cantidades dentro de la base esterilizada. No obstante, debido a que la cantidad del cultivo añadido a la base esterilizada es muy pequeña, la cantidad de la fibra dietética dentro de la solución de ensayo final o bebida de bacterias de ácido láctico es sustancialmente igual a la cantidad de la fibra dietética dentro de la base esterilizada.

Además, el pH se refiere al pH de la base esterilizada, pero, debido a que la cantidad de cultivo añadida a la base esterilizada es muy pequeña, el pH de la solución de ensayo final o bebida de bacterias de ácido láctico es sustancialmente igual al pH de la base esterilizada.

10 [Ejemplo de ensayo 1] Efecto de diversas fibras dietéticas solubles en agua sobre la supervivencia de las bifidobacterias

(Preparación del cultivo)

15 1.000 ml de un medio compuesto de un extracto de levadura 0,2% (p/p) y polvo de leche desnatada 11% (p/p) que había sido sometido a esterilización a 90°C durante 30 minutos se inoculó con 100 ml de un cultivo simiente de la cepa ATCC BAA-999 de Bifidobacterium longum, y la mezcla de incubó durante 6 horas a 37°C, dando así un cultivo de la cepa ATCC BAA-999 de Bifidobacterium longum.

20 Mientras tanto, 1.500 ml de un medio compuesto de un extracto de levadura 0,1% (p/p) y un medio de leche desnatada reconstituida 10% (p/p) que había sido sometido a esterilización a 90°C durante 30 minutos se inoculó con 50 ml de un cultivo simiente de la cepa ATCC19258 de Streptococcus thermophilus, y la mezcla de incubó durante 5 horas a 37°C, dando así un cultivo de la cepa ATCC19258 de Streptococcus thermophilus

(Fibras dietéticas solubles en agua)

25 Como fibras dietéticas solubles en agua se usaron inulina (nombre del producto: Fuji FF, fabricado por Fuji Nihon Seito Corporation), dextrina indigestible (nombre del producto: Pine Fiber, fabricado por Matsutani Chemical Industry Co., Ltd.) y un producto de descomposición de galactomanano (nombre del producto: Sunfiber R, fabricado por Taiyo Kagaku Co., Ltd.).

(Preparación de la base esterilizada)

30 30 kg de una preparación de leche líquida compuesta de polvo de leche desnatada 3,1% (p/p), una de las anteriores fibras dietéticas solubles en agua 3% (p/p), CMC 0,4% (p/p), ácido cítrico (en cantidad suficiente para regular el pH hasta 4,6) y aroma 0,1% (p/p), siendo el resto agua, se emulsionó y después se sometió a esterilización por calor, completando así la preparación de una base esterilizada [grasa de leche: 0,1% (p/p), contenido de sólidos de leche desnatada: 2,9% (p/p)].

35 Específicamente, el polvo de leche desnatada (fabricado por Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), la fibra dietética y la CMC (fabricada por Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.) se mezclaron y disolvieron en el agua. A continuación de la mezcla, se añadió el ácido cítrico para ajustar el pH a 4,6, y finalmente se añadió el aroma para completar la producción de la preparación de leche líquida. La preparación de leche líquida así obtenida se emulsionó después llevando a cabo un tratamiento de homogeneización a 15 MPa.

40 Posteriormente, se llevó a cabo una esterilización por calor. La esterilización por calor se llevó a cabo bajo condiciones de esterilización que implicaban mantener la preparación a 130°C durante 2 segundos usando un esterilizador de tipo placa (fabricado por Morinaga Engineering Co., Ltd.). A continuación de la esterilización por calor, la temperatura del líquido se enfrió hasta 10°C, dando una base esterilizada que contenía fibra dietética.

(Preparación de las soluciones de ensayo)

45 A cada una de las bases esterilizadas se añadió una cantidad suficiente del cultivo de la cepa ATCC BAA-999 de Bifidobacterium longum preparado de la manera descrita anteriormente hasta alcanzar un recuento bacteriano a continuación de la adición de aproximadamente 1×10^8 /ml, y una cantidad suficiente del cultivo anterior de la cepa ATCC19258 de Streptococcus thermophilus hasta alcanzar un recuento bacteriano a continuación de la adición de aproximadamente 2×10^6 /ml, completando así la preparación de una serie de soluciones de ensayo.

(Ensayo de almacenamiento)

50 Después de la preparación, cada solución de ensayo se almacenó durante 2 semanas a 10°C. El recuento de bifidobacterias se midió inmediatamente a continuación de la preparación, una semana después de la preparación y, después, dos semanas después de la preparación. La medida del recuento de bifidobacterias se llevó a cabo usando una placa de un medio de agar propionato TOS (fabricado por Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.). Los resultados de las medidas se muestran en la tabla 1. Los valores de la tasa de supervivencia se presentan como porcentajes relativos al recuento de bifidobacterias inmediatamente a continuación de la preparación.

[Tabla 1]

Fibra dietética	Inmediatamente después de la preparación	Después de una semana		Después de dos semanas	
	Recuento bacteriano vivo (/ml)	Recuento bacteriano vivo (/ml)	Tasa de supervivencia	Recuento bacteriano vivo (/ml)	Tasa de supervivencia
Nada añadido	$1,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^6$	1,1%	$5,0 \times 10^4$	0,0%
Inulina	$1,2 \times 10^8$	$3,0 \times 10^7$	24,7%	$1,0 \times 10^7$	8,2%
Dextrina indigestible	$1,0 \times 10^8$	$4,4 \times 10^6$	4,3%	$1,2 \times 10^5$	0,1%
Producto de descomposición de galactomanano	$1,2 \times 10^8$	$5,0 \times 10^5$	0,4%	No detectado	-

5 De los resultados de la tabla 1 es evidente que, cuando no se añadió fibra dietética, el recuento de bifidobacterias cayó hasta aproximadamente 1% del valor inicial después de una semana y hasta aproximadamente 1/1000avo del valor inicial después de dos semanas. Cuando se añadió inulina, el recuento de bifidobacterias se mantuvo en no menor que 10.000.000 por 1 ml (una tasa de supervivencia mayor que 5%) incluso después de almacenamiento durante dos semanas, indicando excelentes propiedades de supervivencia. En contraste, cuando se añadió dextrina indigestible o el producto de descomposición de galactomanano, no se observó mejora significativa comparada con la solución que no contenía fibra dietética añadida.

10 De los resultados de la tabla 1 está claro que sólo la inulina tiene el efecto de mejorar la tasa de supervivencia de las bifidobacterias.

[Ensayo 2] Efecto del contenido de inulina en la supervivencia de las bifidobacterias

(Preparación del cultivo)

15 Se prepararon cultivos de la cepa ATCC BAA-999 de *Bifidobacterium longum* usando el mismo método que el descrito para el ensayo 1. Además, con la excepción de cambiar el cultivo simiente, también se prepararon cultivos de la cepa ATCC15707 de *Bifidobacterium longum* usando el mismo método.

Además, también se prepararon cultivos de la cepa ATCC19258 de *Streptococcus thermophilus* usando el mismo método que el descrito para el ensayo 1.

(Preparación de la base esterilizada)

20 Con la excepción de alterar el 3% (p/p) de la fibra dietética soluble en agua a cantidades de inulina de 0 hasta 10% (p/p), como se listan en la tabla 2, se prepararon bases esterilizadas usando el mismo método que el descrito para el ensayo 1.

(Preparación de las soluciones de ensayo)

25 A cada una de las bases esterilizadas se añadió una cantidad suficiente de cada uno de los cultivos de la cepa ATCC BAA-999 de *Bifidobacterium longum* o el cultivo la cepa ATCC15707 de *Bifidobacterium longum* preparados de la manera descrita anteriormente hasta conseguir un recuento bacteriano a continuación de la adición de aproximadamente 1×10^8 /ml, y una cantidad suficiente del cultivo anterior de la cepa ATCC19258 de *Streptococcus thermophilus* hasta alcanzar un recuento bacteriano a continuación de la adición de aproximadamente 2×10^6 /ml, completando así la preparación de una serie de soluciones de ensayo.

30 (Ensayo de almacenamiento)

35 Después de la preparación, cada solución de ensayo se almacenó durante 2 semanas a 10°C. El recuento de bifidobacterias se midió inmediatamente a continuación de la preparación, una semana después de la preparación y, después, dos semanas después de la preparación. La medida del recuento de bifidobacterias se llevó a cabo usando una placa de un medio de agar propionato TOS (fabricado por Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.). Los resultados de las medidas se muestran en la tabla 2. Los valores de la tasa de supervivencia se presentan como porcentajes relativos al recuento de bifidobacterias inmediatamente a continuación de la preparación.

[Tabla 2]

Bifidobacterium longum	Inulina	Inmediatamente después de la preparación	Después de una semana		Después de dos semanas	
	Cantidad añadida	Recuento bacteriano vivo (/ml)	Recuento bacteriano vivo (/ml)	Tasa de supervivencia	Recuento bacteriano vivo (/ml)	Tasa de supervivencia
ATCC BAA-999	0%	$1,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^6$	1,1%	$5,0 \times 10^4$	0,0%
	1%	$1,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^7$	19,5%	$2,0 \times 10^6$	1,8%
	2%	$1,2 \times 10^8$	$3,0 \times 10^7$	25,7%	$6,8 \times 10^6$	5,9%
	3%	$1,2 \times 10^8$	$3,0 \times 10^7$	24,7%	$1,0 \times 10^7$	8,2%
	4%	$1,4 \times 10^8$	$2,8 \times 10^7$	19,9%	$1,0 \times 10^7$	7,4%
	5%	$1,1 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	29,5%	$8,1 \times 10^6$	7,4%
	10%	$1,1 \times 10^8$	$3,1 \times 10^7$	28,9%	$5,0 \times 10^6$	4,6%
ATCC 15707	0%	$3,7 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	4,1%	No detectado	-
	1%	$4,1 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$	6,3%	$5,5 \times 10^5$	1,3%
	2%	$2,9 \times 10^7$	$6,1 \times 10^6$	21,0%	$3,1 \times 10^6$	10,7%
	3%	$2,4 \times 10^7$	$8,6 \times 10^6$	35,8%	$3,4 \times 10^6$	14,2%
	4%	$3,6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	34,2%	$4,2 \times 10^6$	11,6%
	5%	$2,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	42,5%	$3,0 \times 10^6$	10,7%
	10%	$3,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	33,9%	$1,6 \times 10^6$	4,8%

5 De los resultados de la tabla 2 es evidente que en aquellas soluciones de ensayo que usan la cepa ATCC BAA-999 de Bifidobacterium longum y que contienen 1 hasta 10% de inulina añadida, el recuento bacteriano se mantuvo en no menor que 1.000.000 por 1 ml, incluso después de almacenamiento durante dos semanas, lo cual representa una mejora significativa en las propiedades de supervivencia comparadas con la solución que no contiene inulina añadida, que sólo fue capaz de mantener un recuento bacteriano de 50.000 por 1 ml.

10 Además, en aquellas soluciones de ensayo que usan la cepa ATCC15707 de Bifidobacterium longum y que contienen 1 hasta 10% de inulina añadida, el recuento bacteriano se mantuvo en no menor que 500.000 por 1 ml, incluso después de almacenamiento durante dos semanas, lo cual representa una mejora significativa en las propiedades de supervivencia comparadas con la solución que no contiene inulina añadida, para la cual no se pudieron detectar bacterias vivas.

15 En particular, se alcanzó una tasa de supervivencia de al menos 5% para cualquiera de las dos bifidobacterias cuando se añadió 2 hasta 5% de inulina, lo cual representa una mejora espectacular en las propiedades de supervivencia de las bifidobacterias.

[Ensayo 3] Efecto de la inulina en la supervivencia de las bifidobacterias a diversos niveles de pH

(Preparación de cultivo)

Se prepararon cultivos de la cepa ATCC BAA-999 de Bifidobacterium longum usando el mismo método que el descrito para el ensayo 1.

20 Además, también se prepararon cultivos de la cepa ATCC19258 de Streptococcus thermophilus usando el mismo método que el descrito para el ensayo 1.

(Preparación de base esterilizada)

25 Con la excepción de usar sólo inulina como la fibra dietética soluble en agua, y alterando la cantidad de ácido cítrico añadido para regular el pH hasta uno de pH 4,1, pH 4,5 o pH 4,8, como se listan en la tabla 3, se prepararon bases esterilizadas usando el mismo método que el descrito para el ensayo 1.

(Preparación de las soluciones de ensayo)

30 A cada una de las bases esterilizadas se añadió una cantidad suficiente del cultivo de la cepa ATCC BAA-999 de Bifidobacterium longum preparado de la manera descrita anteriormente hasta alcanzar un recuento bacteriano a continuación de la adición de aproximadamente 1×10^8 /ml, y una cantidad suficiente del cultivo anterior de la cepa ATCC19258 de Streptococcus thermophilus hasta alcanzar un recuento bacteriano a continuación de la adición de aproximadamente 2×10^6 /ml, completando así la preparación de una serie de soluciones de ensayo.

(Ensayo de almacenamiento)

5 Después de la preparación, cada solución de ensayo se almacenó durante 2 semanas a 10°C. El recuento de bifidobacterias se midió inmediatamente a continuación de la preparación, una semana después de la preparación y, después, dos semanas después de la preparación. La medida del recuento de bifidobacterias se llevó a cabo usando una placa de un medio de agar propionato TOS (fabricado por Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.). Los resultados de las medidas se muestran en la tabla 3. Los valores de la tasa de supervivencia se presentan como porcentajes relativos al recuento de bifidobacterias inmediatamente a continuación de la preparación.

[Tabla 3]

Fibra dietética	pH	Inmediatamente después de la preparación	Después de una semana		Después de dos semanas	
		Recuento bacteriano vivo (/ml)	Recuento bacteriano vivo (/ml)	Tasa de supervivencia	Recuento bacteriano vivo (/ml)	Tasa de supervivencia
Ninguna añadida	4,8	$8,50 \times 10^7$	$2,30 \times 10^7$	27%	$3,00 \times 10^6$	3,5%
	4,5	$1,02 \times 10^8$	$1,30 \times 10^6$	1%	$1,30 \times 10^5$	0,1%
	4,1	$8,70 \times 10^7$	No detectado	-	No detectado	-
Inulina	4,8	$9,4 \times 10^7$	$6,10 \times 10^7$	65%	$6,70 \times 10^7$	71,3%
	4,5	$1,80 \times 10^8$	$7,00 \times 10^7$	39%	$1,70 \times 10^7$	9,4%
	4,1	$1,11 \times 10^8$	$2,26 \times 10^7$	20%	$5,00 \times 10^6$	4,5%

10 Como es evidente de la tabla 3, las soluciones de ensayo que contienen 3% de inulina añadida exhibieron supervivencia mejorada de las bifidobacterias comparadas con la solución que no contenía inulina añadida a cualquiera de los niveles de pH entre 4,1 y 4,8. Una tasa de supervivencia no menor que 5% se alcanzó a un pH de 4,5 hasta 4,8, lo cual representa un efecto particularmente acusado.

[Ejemplo 1]

15 (Preparación del cultivo)

1.000 ml de un medio compuesto de un extracto de levadura 0,2% (p/p) y polvo de leche desnatada 11% (p/p) que había sido sometido a esterilización a 90°C durante 30 minutos se inoculó con 100 ml de un cultivo simiente de la cepa ATCC BAA-999 de *Bifidobacterium longum*, y la mezcla de incubó durante 6 horas a 37°C, dando así un cultivo de la cepa ATCC BAA-999 de *Bifidobacterium longum*.

20 Mientras tanto, 1.500 ml de un medio compuesto de un extracto de levadura 0,1% (p/p) y un medio de leche desnatada reconstituida 10% (p/p) que había sido sometido a esterilización a 90°C durante 30 minutos se inoculó con 50 ml de un cultivo simiente de la cepa ATCC19258 de *Streptococcus thermophilus*, y la mezcla de incubó durante 5 horas a 37°C, dando así un cultivo de la cepa ATCC19258 de *Streptococcus thermophilus*

(Preparación de la base esterilizada)

25 30 kg de una preparación de leche líquida compuesta de polvo de leche desnatada 3,1% (p/p), azúcar 8% (p/p), inulina 3% (p/p), CMC 0,4% (p/p), ácido cítrico (en cantidad suficiente para regular el pH hasta 4,6) y aroma 0,1% (p/p), siendo el resto agua, se emulsionó y después se sometió a esterilización por calor, completando así la preparación de una base esterilizada [grasa de leche: 0,1% (p/p), contenido de sólidos de leche desnatada: 2,9% (p/p)].

30 Específicamente, el polvo de leche desnatada (fabricado por Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), el azúcar (fabricado por Mitsui Sugar Co., Ltd.), la inulina y la CMC (fabricada por Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.) se mezclaron y disolvieron en el agua. A continuación de la mezcla, se añadió el ácido cítrico (fabricado por San-Ei Gen F.F.I. Inc.) para ajustar el pH a 4,6, y finalmente se añadió el aroma para completar la producción de la preparación de leche líquida. La preparación de leche líquida así obtenida se emulsionó después llevando a cabo un tratamiento de homogeneización a 15 MPa.

35 Posteriormente, se llevó a cabo la esterilización por calor. La esterilización por calor se llevó a cabo bajo condiciones de esterilización que implicaban mantener la preparación a 130°C durante 2 segundos usando un esterilizador de tipo placa (fabricado por Morinaga Engineering Co., Ltd.). A continuación de la esterilización por calor, la temperatura del líquido se enfrió hasta 10°C, dando una base esterilizada.

40 (Preparación de bebida de bacterias de ácido láctico)

5 A la base esterilizada preparada se añadió una cantidad suficiente del cultivo de la cepa ATCC BAA-999 de *Bifidobacterium longum* preparado de la manera descrita anteriormente hasta alcanzar un recuento bacteriano a continuación de la adición de aproximadamente 1×10^8 /ml, y una cantidad suficiente del cultivo anterior de la cepa ATCC19258 de *Streptococcus thermophilus* hasta alcanzar un recuento bacteriano a continuación de la adición de aproximadamente 2×10^6 /ml.

La mezcla resultante se usó para llenar un recipiente de plástico con una capacidad de 120 ml, y el recipiente se selló después, dando una bebida de bacterias de ácido láctico del ejemplo 1. El recuento de bifidobacterias a continuación del almacenamiento de esta bebida de bacterias de ácido láctico durante 14 días a 10°C fue de $3,5 \times 10^7$ /ml, lo cual representa una tasa de supervivencia de aproximadamente 35%.

10 [Ejemplo 2]

(Preparación del cultivo)

15 1.000 ml de un medio compuesto de un extracto de levadura 0,2% (p/p) y polvo de leche desnatada 11% (p/p) que había sido sometido a esterilización a 90°C durante 30 minutos se inoculó con 100 ml de un cultivo simiente de la cepa ATCC15707 de *Bifidobacterium longum*, y la mezcla de incubó durante 6 horas a 37°C, dando así un cultivo de la cepa ATCC15707 de *Bifidobacterium longum*.

Mientras tanto, 1.500 ml de un medio compuesto de un extracto de levadura 0,1% (p/p) y un medio de leche desnatada reconstituida 10% (p/p) que había sido sometido a esterilización a 90°C durante 30 minutos se inoculó con 50 ml de un cultivo simiente de la cepa ATCC19258 de *Streptococcus thermophilus*, y la mezcla de incubó durante 5 horas a 37°C, dando así un cultivo de la cepa ATCC19258 de *Streptococcus thermophilus*

20 (Preparación de la base esterilizada)

25 30 kg de una preparación de leche líquida compuesta de polvo de leche desnatada 3,1% (p/p), sucralosa 0,01% (p/p), inulina 3% (p/p), CMC 0,4% (p/p), ácido cítrico (en cantidad suficiente para regular el pH hasta 4,6) y aroma 0,1% (p/p), siendo el resto agua, se emulsionó y después se sometió a esterilización por calor, completando así la preparación de una base esterilizada [grasa de leche: 0,1% (p/p), contenido de sólidos de leche desnatada: 2,9% (p/p)].

30 Específicamente, el polvo de leche desnatada (fabricado por Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), la sucralosa (fabricada por San-Ei Gen F.F.I. Inc.), la inulina y la CMC (fabricada por Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.) se mezclaron y disolvieron en el agua. A continuación de la mezcla, se añadió el ácido cítrico (fabricado por San-Ei Gen F.F.I. Inc.) para ajustar el pH a 4,6, y finalmente se añadió el aroma para completar la producción de la preparación de leche líquida. La preparación de leche líquida así obtenida se emulsionó después llevando a cabo un tratamiento de homogeneización a 15 MPa.

35 Posteriormente, se llevó a cabo la esterilización por calor. La esterilización por calor se llevó a cabo bajo condiciones de esterilización que implicaban mantener la preparación a 130°C durante 2 segundos usando un esterilizador de tipo placa (fabricado por Morinaga Engineering Co., Ltd.). A continuación de la esterilización por calor, la temperatura del líquido se enfrió hasta 10°C, dando una base esterilizada.

(Preparación de bebida de bacterias de ácido láctico)

40 A la base esterilizada preparada se añadió una cantidad suficiente del cultivo de la cepa ATCC15707 de *Bifidobacterium longum* preparado de la manera descrita anteriormente hasta alcanzar un recuento bacteriano a continuación de la adición de aproximadamente 1×10^8 /ml, y una cantidad suficiente del cultivo anterior de la cepa ATCC19258 de *Streptococcus thermophilus* hasta alcanzar un recuento bacteriano a continuación de la adición de aproximadamente 2×10^6 /ml.

45 La mezcla resultante se usó para llenar un recipiente de plástico con una capacidad de 120 ml, y el recipiente se selló después, dando una bebida de bacterias de ácido láctico del ejemplo 2. El recuento de bifidobacterias a continuación del almacenamiento de esta bebida de bacterias de ácido láctico durante 14 días a 10°C fue de $2,5 \times 10^7$ /ml, lo cual representa una tasa de supervivencia de aproximadamente 25%.

Aplicabilidad industrial

50 La bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención tiene un sabor favorable y una tasa de supervivencia mejorada para las bifidobacterias. Además, el método de producir una bebida ácida de bacterias de ácido láctico de la presente invención hace posible la producción de una bebida ácida de bacterias de ácido láctico que tiene un sabor favorable y una tasa de supervivencia mejorada para de las bifidobacterias.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una bebida ácida de bacterias de ácido láctico, que comprende: añadir un cultivo que contiene *Bifidobacterium longum* a una base esterilizada, que comprende una leche cruda e inulina y ha sido sometida a emulsificación y esterilización, en la que dicha inulina no ha sido fermentada por dicho *Bifidobacterium longum*.
2. El método según la reivindicación 1, en el que una cantidad de dicha inulina está dentro de un intervalo desde 1 hasta 10% en masa de dicha base esterilizada.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el pH de dicha base esterilizada está dentro de un intervalo desde 4,1 hasta 4,8.
- 10 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además: almacenar dicha bebida ácida de bacterias de ácido láctico a no mayor que 10°C a continuación de añadir dicho cultivo que contiene *Bifidobacterium longum* de forma que no se produzca una fermentación por dicho *Bifidobacterium longum*.