

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 375**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07831075 .2**  
96 Fecha de presentación: **01.11.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1989942**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2008**

54 Título: **Método para producir leche fermentada utilizando una nueva bacteria de ácido láctico**

30 Prioridad:  
**13.02.2007 JP 2007032646**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.12.2012**

73 Titular/es:  
**MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD. (100.0%)**  
**33-1 SHIBA 5-CHOME**  
**MINATO-KU TOKYO 108-8384, JP**

72 Inventor/es:  
**SHIMIZU, KANETADA;**  
**MIYAJI, KAZUHIRO;**  
**OGAWA, KOUICHI;**  
**KISO, YOSHIAKI y**  
**ISHIDA, TAKAKO**

74 Agente/Representante:  
**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

ES 2 393 375 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**

Método para producir leche fermentada utilizando una nueva bacteria de ácido láctico

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para producir leche fermentada utilizando una nueva bacteria de ácido láctico perteneciente al género *Lactococcus*, y a la leche fermentada preparada de acuerdo con el método de producción.

10 Se reivindica prioridad de la solicitud de patente japonesa nº 2007-032646, depositada el 13 de febrero de 2007 cuyo contenido se incorpora en la presente memoria por referencia.

**15 Técnica anterior**

Las bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium* (en lo que sigue, abreviado a "Bifidobacterium"), tal como la *Bifidobacterium longum*, es una de las cepas bacterianas predominantes en la microflora intestinal formada en el tracto intestinal humano. Se conoce el hecho de que la *Bifidobacterium* tiene una actividad reguladora de la función intestinal, una actividad inmuno-estimulante, y una actividad anti-cancerígena. En consecuencia, se está incrementando la demanda de productos alimenticios que contienen *Bifidobacterium* viable, tal como leche fermentada con *Bifidobacterium* o similar, de acuerdo con un incremento de la concienciación de los consumidores por la salud.

25 La *Bifidobacterium* presenta una intensidad de proliferación pobre en un medio de leche. En consecuencia, se han formulado en general diversas sustancias estimuladoras del crecimiento en la leche fermentada, de modo que la *Bifidobacterium* esté contenida en la misma a un contenido constante, por ejemplo, de  $1 \times 10^7$  CFU/ml. Sin embargo, las sustancias estimuladoras del crecimiento son en general caras y pueden degradar el sabor. Adicionalmente, la conservación de *Bifidobacterium* bajo condiciones ácidas resulta difícil y tiende a dar como resultado la muerte de la *Bifidobacterium*. De ese modo, la cantidad viable de *Bifidobacterium* en los productos de leche fermentada disminuye a velocidad acelerada durante el transcurso de la distribución de los productos de leche fermentada.

30 En consecuencia, se espera que un fomento del crecimiento de *Bifidobacterium* o una mejora de la capacidad de supervivencia de la misma durante el almacenamiento, permita no solo la preparación de leche fermentada que contenga una gran cantidad de *Bifidobacterium* viable sino también la preparación de leche fermentada que pueda mantener una cantidad abundante de *Bifidobacterium* viable desde inmediatamente después de la preparación hasta que sea consumida.

40 Se han divulgado diversos métodos para fomentar el crecimiento de *Bifidobacterium* o mejorar la capacidad de supervivencia de la misma durante el almacenamiento por fermentación con *Bifidobacterium* y otra bacteria de ácido láctico sin la adición de ninguna sustancia de estimulación del crecimiento o similar. Por ejemplo, (1) yogurt que contiene *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris*, y *Bifidobacterium*, y un método para la preparación de yogurt (véase, por ejemplo, el Documento de Patente 1), con respecto a un método de fomento del crecimiento de *Bifidobacterium* para preparar leche fermentada.

45 Por ejemplo, (2) se ha divulgado un método para fermentar leche con *Bifidobacterium*, que incluye cultivar *Bifidobacterium breve* junto con *Lactococcus lactis* sub-especie *lactis*, de modo que no formen ni diacetil ni acetoína, en un medio que contiene leche como el componente principal del mismo (véase, por ejemplo, el Documento de Patente 2), con respecto a un método para mejorar la capacidad de supervivencia de la *Bifidobacterium* durante el almacenamiento de leche fermentada.

50 Documento de Patente 1: Publicación de patente japonesa nº 3.364.491

Documento de Patente 2: Publicación de patente japonesa nº 3.068.484

55 El documento FR-2842707 divulga la preparación de yogurt con un co-cultivo de *L. lactis* y *Bifidobacterium animalis*.

**Divulgación de la invención**[Problemas a ser resueltos por la invención]

60 Aunque se fomente el crecimiento de la *Bifidobacterium* y se acorte el tiempo de fermentación de acuerdo con el método (1) mencionado en lo que antecede, no existe ninguna divulgación con respecto a la capacidad de supervivencia de la *Bifidobacterium* durante el almacenamiento en el Documento de Patente 1. Por el contrario, aunque se reconocen tanto los efectos de estimulación del crecimiento como los efectos de mejora de la capacidad de supervivencia con la utilización de una mezcla compuesta por una *Bifidobacterium* específica y una bacteria de ácido láctico específica de acuerdo con el método (2) mencionado anteriormente, no existe ninguna divulgación con

respecto a una Bifidobacterium distinta de la Bifidobacterium breve, tal como la Bifidobacterium longum, que se formula por lo general en productos alimenticios.

5 La presente invención tiene como objeto de la misma la provisión de un método para la producción de leche fermentada utilizando bacterias de ácido láctico que estimulan el crecimiento de la Bifidobacterium y mejoran la capacidad de supervivencia de la misma durante el almacenamiento, y la leche fermentada preparada de acuerdo con el método de producción.

10 [Medios para resolver los problemas]

10 Los inventores de la presente invención han investigado de forma exhaustiva para resolver los problemas mencionados anteriormente, y llevaron a cabo una prueba de fermentación realizando un co-cultivo con Bifidobacterium longum para encontrar cepas bacterianas de ácido láctico que mostraron una excelente fermentabilidad en un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P). Como resultado, los inventores  
15 encontraron cepas de bacteria de ácido láctico que pueden fomentar el crecimiento de la Bifidobacterium longum hasta una cantidad viable de  $5 \times 10^8$  CFU/g cuando el pH es de 4,4 a 4,6, e incrementan la tasa de supervivencia de la Bifidobacterium longum en un 30% o más cuando se almacenan a 10 °C durante dos semanas después de que la fermentación haya acabado, e inmediatamente después se lleve a cabo un enfriamiento rápido. Adicionalmente, los  
20 presentes inventores encontraron que se puede producir leche fermentada que contenga una gran cantidad de Bifidobacterium y que tenga una excelente capacidad de supervivencia durante el almacenamiento utilizando las bacterias de ácido láctico, y de ese modo se ha completado la presente invención.

25 Es decir, la presente invención proporciona un método para producir leche fermentada que incluye: realizar la fermentación utilizando, como bacterias de ácido láctico, tanto bacterias pertenecientes al género Bifidobacterium como bacterias pertenecientes el género Lactococcus que tengan las siguientes propiedades bacteriológicas:

(1) fermentabilidad que coagule un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) cuando se cultiva a una temperatura de 25 °C a 37 °C durante 16 horas;

30 (2) propiedades de fomento del crecimiento de la Bifidobacterium longum que conduzcan a un recuento viable de Bifidobacterium longum de  $5 \times 10^8$  CFU/g o más, cuando se co-cultiva con Bifidobacterium longum en el medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) hasta que el pH de la misma es de 4,4 a 4,6, y

35 (3) propiedades de mejora de la capacidad de supervivencia de la Bifidobacterium longum durante el almacenamiento, lo que conduce a una tasa de supervivencia de la Bifidobacterium longum de un 30% o más, después del co-cultivo con Bifidobacterium longum en el medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) hasta que el pH de la misma es de 4,4 a 4,6, enfriamiento rápido, y almacenamiento durante dos semanas a 10 °C.

40 La presente invención proporciona también un método para la producción de leche fermentada, que se caracteriza porque las bacterias pertenecientes al género Lactococcus no tienen capacidad para fermentar xilosa y producir diacetil ni acetoína.

45 La presente invención proporciona también un método para producir leche fermentada, que se caracteriza porque las bacterias pertenecientes al género Lactococcus son Lactococcus lactis, sub-especie lactis.

50 La presente invención proporciona también un método para producir leche fermentada, que se caracteriza porque las bacterias pertenecientes al género Lactococcus incluyen al menos una cepa bacteriana elegida en el grupo consistente en Lactococcus lactis subespecie lactis MCC852 (FERM BP-10742), Lactococcus lactis subespecie lactis MCC859 (FERM BP-10744), Lactococcus lactis subespecie lactis MCC865 (FERM BP-10745), y Lactococcus lactis subespecie lactis MCC866 (FERM BP-10746).

La presente invención proporciona también un método para producir leche fermentada que se caracteriza porque las bacterias pertenecientes al género Bifidobacterium son Bifidobacterium longum.

55 La presente invención proporciona también un método para producir leche fermentada, que se caracteriza porque una cepa bacteriana de la Bifidobacterium longum es la Bifidobacterium longum FERM BP-7787.

60 La presente invención proporciona también un método para producir leche fermentada, que se caracteriza porque tanto la Streptococcus thermophilus como la Lactobacillus bulgaricus son usadas adicionalmente como bacterias de ácido láctico.

La presente invención proporciona también leche fermentada preparada mediante cualquiera de los métodos mencionados con anterioridad para producir leche fermentada.

65 [Efectos de la invención]

De acuerdo con el método para la producción de leche fermentada conforme a la presente invención, se puede producir de manera eficaz leche fermentada que contiene una gran cantidad de Bifidobacterium, en particular Bifidobacterium longum, como no se ha hecho nunca antes. Adicionalmente, la leche fermentada conforme a la presente invención mantiene una cantidad viable suficiente de Bifidobacterium, en particular Bifidobacterium longum, incluso durante el transcurso de la distribución, y por lo tanto la leche fermentada presenta unos efectos reguladores de la función intestinal más altos y resulta útil para el control de la salud.

**Mejor modo de llevar a cabo la invención**

La presente invención se refiere a un método para producir leche fermentada, que se caracteriza porque la leche es fermentada tanto con Bifidobacterium como con bacterias pertenecientes al género Lactococcus que tienen las propiedades (1), (2) y (3) anteriores. En particular, el método es adecuado para la producción de leche fermentada haciendo fermentar leche con la utilización de Bifidobacterium longum.

Ejemplos de Bifidobacterium longum disponibles en la presente invención incluyen la Bifidobacterium longum FERM BP-7787, Bifidobacterium longum-cepa tipo ATCC 15707, y similares. La Bifidobacterium longum FERM BP-7787 es la particularmente preferida, puesto que la Bifidobacterium longum FERM BP-7787 presenta una excelente fermentabilidad en un medio de leche, excelente resistencia al ácido durante el transcurso de la distribución, y excelente resistencia al ácido gástrico. La Bifidobacterium longum FERM BP-7787 fue aceptada por el Depositario del Organismo de Patente Internacional, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón (código postal número 305-8566)) el 31 de Octubre de 2001.

Las bacterias pertenecientes al género Lactococcus que van a ser usadas en la presente invención tienen las propiedades (1), (2) y (3).

La propiedad (1) se refiere a la fermentabilidad. Si una bacteria de ácido láctico puede proliferar rápidamente y tiene una fermentabilidad suficientemente fuerte como para coagular un medio de leche desnatada reconstituida a un 10% (P/P) cuando se cultiva en el medio a una temperatura de entre 25 °C y 37 °C durante 16 horas, la bacteria de ácido láctico puede fomentar de manera efectiva el crecimiento de Bifidobacterium, en particular de la Bifidobacterium longum, en el momento de la preparación de leche fermentada. Según se utiliza en la presente memoria, la frase "coagular un medio de cultivo" se refiere a un fenómeno en el que el pH del medio de cultivo se reduce por debajo de un punto isoeléctrico de una proteína de leche del mismo mediante fermentación ácida, y con ello la proteína de la leche se aglomera y el medio de cultivo se coagula. El "medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P)" puede ser preparado, por ejemplo, disolviendo un 10% en masa de leche en polvo desnatada (fabricada por Morinaga Milk Industry Co., Ltd., por ejemplo), en agua.

Aunque la gama de temperatura adecuada para la fermentación con bacterias pertenecientes al género Lactococcus está por lo general comprendida entre 20 °C y 30 °C, las bacterias pertenecientes al género Lactococcus que van a ser usadas en la presente invención presentan una fuerte fermentabilidad a una temperatura de entre 25 °C y 37 °C. En otras palabras, las bacterias pertenecientes al género Lactococcus que van a ser usadas en la presente invención presentan una fermentabilidad suficiente dentro de una gama de temperatura adecuada para la fermentación con Bifidobacterium, en particular con Bifidobacterium longum (30 °C a 40 °C).

La propiedad (2) se refiere a las propiedades de fomento del crecimiento de Bifidobacterium longum. Un medio de leche tal como un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) presenta un sabor, una sensación al gusto y un aspecto externo excelentes cuando su pH llega aproximadamente a 4,6, la caseína y otros componentes contenidas en la misma se precipitan, y el medio de cultivo está completamente coagulado. En consecuencia, la fermentación se detiene por lo general mediante enfriamiento rápido o similar cuando el pH llega aproximadamente a 4,6, para preparar productos de leche fermentada. Por lo tanto, las bacterias de ácido láctico que tienen las propiedades de fomentar el crecimiento que puede conducir a que el recuento viable de la Bifidobacterium longum sea una cantidad alta de  $5 \times 10^8$  CFU/g o más cuando se co-cultiva con Bifidobacterium longum en el medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) hasta que el pH del mismo es de 4,4 a 4,6, puede incrementar eficazmente el recuento viable de Bifidobacterium, en particular de Bifidobacterium longum, en leche fermentada en el momento de la preparación de leche fermentada.

La propiedad (3) se refiere a las propiedades de mejora de la supervivencia de la Bifidobacterium longum durante el almacenamiento. El período de tiempo de conservación de la calidad de los productos de leche fermentada está por lo general en torno a dos semanas aproximadamente cuando se almacena a 10 °C o menos. En consecuencia, la leche fermentada que mantiene una cantidad viable suficiente de Bifidobacterium, en particular de Bifidobacterium longum, incluso hasta el final del período de tiempo durante el que está asegurada la conservación de calidad de la misma, dado que la bacteria de ácido láctico que tiene las propiedades de mejora de la capacidad de supervivencia durante el almacenamiento puede conducir a una tasa de supervivencia de la Bifidobacterium longum que es de un 30% o más tras el co-cultivo con Bifidobacterium longum en el medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) hasta que el pH de la misma es de 4,4 y 4,6, con enfriamiento rápido, y dos semanas de almacenamiento a 10 °C.

Las bacterias pertenecientes al género Lactococcus que van a ser usadas en la presente invención pueden ser

preparadas, por ejemplo, de acuerdo con el método siguiente. En primer lugar, se aíslan cepas de bacterias entre varias muestras, y las cepas que presentan excelente fermentabilidad en el medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P), más específicamente fermentabilidad suficiente para coagular el medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) cuando se cultiva en el mismo a una temperatura de 25 a 37 °C durante 16 horas, son seleccionadas a partir de las cepas bacterianas aisladas. A continuación, las cepas bacterianas son co-cultivadas con *Bifidobacterium longum*, y se seleccionan las cepas bacterianas que tienen propiedades de fomento del crecimiento de la *Bifidobacterium longum* y propiedades de mejora de la capacidad de supervivencia de la *Bifidobacterium longum* durante el almacenaje definido según las propiedades (2) y (3) mencionadas anteriormente. Se prefiere además que se seleccionen las cepas bacterianas que no tengan capacidad para fermentar xilosa ni producir diacetil ni acetoína.

En lo que sigue, se va a explicar la presente invención con mayor detalle.

### 1. Aislamiento de cepas bacterianas

Con el fin de aislar cepas bacterianas que tengan las propiedades mencionadas anteriormente a partir del mundo natural, los presentes inventores recogieron muestras del mundo natural en Japón, diluyeron las muestras con solución tampón de dilución anaeróbica ("The World of Enterobacteria", publicado por Soubunsha Co., Ltd., escrito por Tomotari Mitsuoka, Página 322, 1980; en lo que sigue, de forma abreviada se menciona como "Referencia 1"), inocularon las muestras diluidas sobre cada placa de caldo de cultivo de hígado de Briggs (véase la Referencia 1 mencionada anteriormente, Página 319), y a continuación cultivaron las muestras inoculadas a 30 °C bajo condiciones anaeróbicas. Entre las colonias así obtenidas, se extrajeron las cepas bacterianas que mostraron características morfológicas de bacterias estreptocócicas y fueron reconocidas como bacterias Gram-positivo por observación microscópica de muestras aplicadas. Las cepas extraídas fueron inoculadas por bandas cada una de ellas, sobre placa plana de agar BL, y a continuación cultivadas repetidamente bajo condiciones anaeróbicas de la misma manera que se ha descrito en lo que antecede hasta obtener cepas bacterianas puramente aisladas. Las cepas bacterianas aisladas fueron sometidas a una prueba de fermentación en un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) según se describe más adelante hasta obtener 20 cepas bacterianas con fermentabilidad definida como en la propiedad (1) mencionada anteriormente. A continuación, las cepas bacterianas obtenidas fueron co-cultivadas con *Bifidobacterium longum* para obtener 5 cepas bacterianas que tienen propiedades de fomento del crecimiento que elevan la cantidad viable de *Bifidobacterium longum* a un pH de 4,4 a 4,6 hasta  $5 \times 10^8$  CFU/g o más, y las propiedades de mejora de capacidad de supervivencia durante el almacenamiento que elevaron la tasa de supervivencia de la *Bifidobacterium longum* en un 30% o más cuando se almacenaron a 10 °C durante dos semanas después de un enfriamiento rápido a un pH de 4,4 a 4,6. Las 5 cepas bacterianas se denominaron "MCC852", "MCC857", "MCC859", "MCC865" y "MCC866", respectivamente.

### 2. Propiedades bacteriológicas

Las propiedades bacteriológicas de las 5 cepas bacterianas van a ser mostradas en lo que sigue. Las pruebas para determinar las propiedades bacteriológicas se llevaron a cabo con referencia al Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática, editado por Peter H. A. Sneath, vol. 2, publicado por Williams and Wilkins Company, 1986.

(I) Morfología bacteriana (observada a través de un microscopio óptico tras el cultivo anaeróbico sobre una placa plana de agar BL a 30 °C durante 72 horas)

Tamaño: 1 a 2  $\mu\text{m}$  (diámetro)

Morfología: Bacteria estreptocócica

(II) Mancha Gram: Positiva

(III) Leche tornasol: Coagulada

(IV) Formación de endoespora: Negativa

(V) Producción de gases a partir de glucosa: Negativa

(VI) Movilidad: Negativa

(VII) Actividad de catalasa: Negativa

(VIII) Prueba de arginina descarboxilasa: Positiva

(IX) Producción de gases a partir de ácido cítrico: Negativa

(X) Susceptibilidad a la temperatura (a 60 °C durante 30 minutos y a 65 °C durante 30 minutos): Positiva en ambos

casos

(XI) Producto de degradación de la glucosa: Ácido L-láctico

5 Tabla 1

	Cepa bacteriana		MCC 852	MCC 857	MCC 859	MCC 865	MCC 866	ATCC 19435
XII	Temperatura de crecimiento	10 °C	+S	+S	+	+S	+S	+S
		40 °C	+	+	+	+	+	+
		45 °C	-	-	-	-	-	-
XIII	Resistencia a la sal	2%	+	+	+	+	+	+
		3%	+	+	+	+	+	+
		4%	+	+	+	+	+	+
		6,5%	(+)S	-	-	(+)S	(+)S	-
XIV	Resistencia al pH	9,2	+	+	+	+	+	+
		9,6	+S	+	+	+	-	-
XV	Resistencia al azul de metileno	0,01%	+	+	+	+	+	+
		0,1%	+	+	+	+	+	+
		0,3%	+	+S	+	+S	+	-
XVI	Producción de amonio a partir de arginina		+	+	+	+	+	+
XVII	Fermentación de azúcar	Arabinosa	-	-	-	-	-	-
		Xilosa	-	-	-	-	-	+
		Ramnosa	-	-	-	-	-	-
		Ribosa	+	+	+S	+	+	+
		Glucosa	+	+	+	+	+	+
		Mannosa	+	+	+	+	+	+
		Fructosa	+	+	+	+	+	+
		Galactosa	+	+	+	+	+	+
		Sacarosa	-	-	-	-	-	-
		Maltosa	+	+	+	+	+	+
		Celubiosa	+	+	+	+	+	+
		Lactosa	+	+	+	+	+	+
		Trehalosa	+	+	+	+	+	+
		Melibiosa	-	-	-	-	-	-
		Rafinosa	-	-	-	-	-	-
		Melezitosa	-	-	-	-	-	-
		Dextrina	+	+	+	+	+	+
		Almidón	+S	+	-	+	+	+S
		Glicógeno	-	-	-	-	-	-
		Inulina	-	-	-	-	-	-
		Manitol	+(S)	+	+	-	-	-
		Sorbitol	-	-	-	-	-	-
		Inositol	-	-	-	-	-	-

## ES 2 393 375 T3

		Esculina	+	+	(+)S	+	+	+S
		Salicina	+	+	+S	+	+	+
		Amigdalina	-	+	-	(+)S	(+)S	-
		Metil glucósido	-	-	-	-	-	-
		Gluconato de sodio	-	+	+	-	-	-

+: Positivo. (+): Ligeramente positivo. ++: Muy ligeramente positivo. -: Negativo. s: Reacción lenta

Las propiedades bacteriológicas (I) a (XI) mencionadas en lo que antecede son comunes a la totalidad de las 5 cepas bacterianas y a la cepa ATCC 19435 de tipo *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*. La temperatura de crecimiento (XII), la resistencia a la sal (XIII), la resistencia al pH (XIV), la resistencia al azul de metileno (XV), la capacidad de producción de amonio a partir de arginina (XVI), y la fermentabilidad de azúcar (XVII) de cada cepa han sido mostradas en la Tabla 1. La fermentación de azúcar fue examinada con respecto a 28 clases de azúcar utilizando un medio para fermentación de azúcar divulgado por Mitsuoka (Tomotari Mitsuoka, "La bacteriología de bacterias de ácido láctico", Examen Clínico 18, Páginas 1163 a 1172, 1974).

Resulta evidente a partir de los resultados anteriormente mencionados que la totalidad de las 5 cepas bacterianas tienen propiedades bacteriológicas comunes con las cepas bacterianas de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*. Así, se ha reconocido que las 5 cepas bacterianas son cepas bacterianas pertenecientes a la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*. Por otra parte, resulta evidente a partir de las propiedades bacteriológicas (XII) a (XVII) mencionadas con anterioridad que las 5 cepas bacterianas son diferentes de la cepa de tipo *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* en el hecho de que las 5 cepas bacterianas no tienen capacidad para fermentar la xilosa.

Las 5 cepas bacterianas fueron depositadas por la solicitante en el Depositario del Organismo Internacional de Patentes, Instituto Nacional de la Ciencia la Tecnología Industrial Avanzada (Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón (código postal número: 305-8566)) como nuevas cepas bacterianas. El número de acceso de la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC852 es FERM BP-10742, el de la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857 es FERM BP-10757, el de la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC859 es FERM BP-10744, el de la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC865 es FERM BP-10745, y el de la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC866 es FERM BP-10746. Las *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC852, 859, 865 y 866 fueron depositadas el 1 de Diciembre de 2006, y la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857 fue depositada el 10 de Enero de 2007.

### 3. Prueba con respecto a la fermentabilidad sobre un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P)

Cada 3% (P/P) de iniciador de cepa bacteriana fue inoculado en un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) esterilizada a 95 °C durante 30 minutos, y cultivado a continuación a 25, 30 ó 37 °C durante 16 horas. A continuación, el medio de cultivo obtenido fue enfriado rápidamente, se observó el estado coagulado, y se midió el pH y el recuento viable de bacterias de ácido láctico contenido. El recuento viable fue medido utilizando placas planas de agar de recuento de placa BCP disponibles comercialmente (fabricadas por Eiken Chemical Co., LTD.). Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 2.

La cepa ATCC 19435 de tipo *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* divulgada en el Documento de Patente 2, fue utilizada como cepa de control.

Tabla 2

Cepa bacteriana	Condición de cultivo								
	a 25 °C durante 16 horas			a 30 °C durante 16 horas			a 37 °C durante 16 horas		
	Recuento viable (CFU/g)	pH		Recuento viable (CFU/g)	pH		Recuento viable (CFU/g)	pH	
MCC852	2,0x10 <sup>8</sup>	4,53	Coagulada	1,5x10 <sup>9</sup>	4,44	Coagulada	8,0x10 <sup>8</sup>	4,63	Coagulada
MCC857	1,7x10 <sup>9</sup>	4,53	Coagulada	1,5x10 <sup>9</sup>	4,41	Coagulada	1,1x10 <sup>9</sup>	4,5	Coagulada
MCC859	1,4x10 <sup>9</sup>	4,54	Coagulada	8,5x10 <sup>8</sup>	4,44	Coagulada	8,1x10 <sup>8</sup>	4,59	Coagulada
MCC865	2,0x10 <sup>9</sup>	4,52	Coagulada	1,5x10 <sup>9</sup>	4,42	Coagulada	8,8x10 <sup>8</sup>	4,63	Coagulada
MCC866	2,0x10 <sup>9</sup>	4,52	Coagulada	1,3x10 <sup>9</sup>	4,4	Coagulada	8,5x10 <sup>8</sup>	4,61	Coagulada
ATCCA9435	5,2x10 <sup>8</sup>	5,93	No coagulada	4,4x10 <sup>8</sup>	5,65	No coagulada	3,2x10 <sup>8</sup>	5,51	No coagulada

5 Cuando se usó cada cepa bacteriana de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC852, 857, 859, 865 y 866, es decir, la bacteria del género *Lactococcus* que va a ser usada en la presente invención, el pH del medio de cultivo se redujo hasta un valor entre 4,4 y 4,6 bajo cualesquiera condiciones de temperatura, y el medio de cultivo se coaguló. Adicionalmente, el recuento viable de las bacterias de ácido láctico contenidas, fue de aproximadamente  $1 \times 10^9$  CFU/g, y de ese modo fueron reconocidas condiciones favorables de proliferación y fermentabilidad.

10 Por otra parte, cuando se usó la cepa ATCC19435 de tipo *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, el pH del cultivo fue de 5,5 o más, y el medio de cultivo no coaguló bajo ninguna de las condiciones de temperatura. Adicionalmente, el recuento viable de las bacterias de ácido láctico fue significativamente menor a 30 °C o más, que en particular el de bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* conforme a la presente invención.

#### 4. Prueba de co-cultivo con *Bifidobacterium longum*

15 (1) Prueba de co-cultivo con *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787

Se utilizó cepa ATCC 19435 de tipo *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* como cepa de control.

20 En primer lugar, cada cultivo de las 5 cepas bacterianas (*Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC852, 857, 859, 865 y 866) y *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787, fue preparado de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1 que sigue.

25 Adicionalmente, 1000 ml de un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) que contenía un 0,2% (P/P) de extracto de levadura (fabricado por Difco), fue esterilizado a 90 °C durante 30 minutos. A continuación, se inocularon 30 ml de un cultivo de la cepa ATCC 19435 de tipo *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* en el medio de leche desnatada reconstituida, y se cultivó a 30 °C durante 16 horas para preparar un cultivo de la cepa ATCC 19435 de tipo *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*.

30 Un 1% (V/V) de cada cultivo de las cepas de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* preparadas según se ha indicado anteriormente, fue inoculado con un 1% (V/V) del cultivo de la *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 en un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) a 90 °C durante 10 minutos, y la mezcla fue cultivada a 37 °C durante 16 horas para obtener leche fermentada. La leche fermentada fue enfriada rápidamente, y se midió el pH de la misma y el recuento viable de la *Bifidobacterium* contenida. A continuación, el producto resultante fue almacenado a 10 °C durante dos semanas, y se midieron los recuentos viables de la *Bifidobacterium* después de una semana y a las dos semanas después de la iniciación del almacenamiento. El recuento viable de la *Bifidobacterium* fue medido utilizando placas planas de agar propionato TOS (fabricadas por YAKULT PHARMACEUTICAL INDUSTRY CO., LTD.). Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Cepa bacteriana	Recuento viable de <i>Bifidobacterium</i> (CFU/g)			pH
	Inmediatamente después del fin de la fermentación	Tras una semana de almacenamiento	Tras dos semanas de almacenamiento	
MCC852	$5,7 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	4,52
MCC857	$8,0 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$	4,47
MCC859	$6,8 \times 10^8$	$6,9 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	4,55
MCC865	$8,3 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$	$7,3 \times 10^8$	4,56
MCC866	$6,4 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$	4,42
ATCC19435	$1,2 \times 10^8$	El pH era de 5 o más y la prueba de almacenamiento no se pudo realizar		

40 Cada leche fermentada preparada utilizando la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC852, 857, 859, 865 ó 866, tuvo un pH de aproximadamente 4,5 y un recuento viable de *Bifidobacterium* de  $5 \times 10^8$  CFU/g o más después de la fermentación. Cuando toda la leche fermentada fue almacenada a 10 °C durante dos semanas, la tasa de supervivencia de la *Bifidobacterium longum* fue del 80% o más.

45 Por otra parte, la fermentación de la leche no avanzó con la cepa ATCC 19435 de tipo *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, y el pH de la leche fermentada fue de 5,0 o más y el almacenaje de la misma a 10 °C resultó imposible. Adicionalmente, el recuento viable de *Bifidobacterium* inmediatamente después del final de la fermentación fue de aproximadamente  $1 \times 10^8$  CFU/g, lo que era significativamente pequeño en comparación con el caso en el que se usaron bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* de acuerdo con la presente invención.

50 De ese modo, resulta evidente que las 5 cepas bacterianas (las *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC852, 857, 859, 865 y 866) son superiores frente a otras cepas bacterianas conocidas de la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*



en términos de propiedades de fomento del crecimiento de la *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 y de las propiedades que mejoran la supervivencia de las mismas durante el almacenamiento.

5 También resulta evidente que, en el caso en que la *Bifidobacterium longum* sea cultivada con *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* que no forma ni diacetil ni acetoina según se describe en el Documento de Patente 2, es improbable el caso de que se utilice *Bifidobacterium breve*, y no se presenta ninguno de los efectos de fomento de proliferación de *Bifidobacterium* ni de los efectos de mejora de la capacidad de supervivencia de la *Bifidobacterium* que se divulgan en el Documento de Patente 2.

10 (2) Prueba de co-cultivo con cepa ATCC 15707 de tipo *Bifidobacterium longum*

Las propiedades de fomento del crecimiento de la *Bifidobacterium longum* de las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* que van a ser usadas en la presente invención y de las propiedades que tienen las mismas de mejora de la capacidad de la *Bifidobacterium longum* durante el almacenamiento, fueron comprobadas utilizando la *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 y la cepa ATCC 15707 de tipo *Bifidobacterium longum*.

En primer lugar, se prepararon un cultivo de la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857 y un cultivo de la *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1 que sigue.

20 Además, se preparó un cultivo mezclado de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2 que sigue.

Adicionalmente, un medio de leche desnatada al 11% (P/P) que contenía un 0,2% (P/P) de extracto de levadura, fue esterilizado a 90 °C durante 30 minutos. A continuación, un 10% (P/P) de cepa ATCC 15707 de tipo *Bifidobacterium longum* fue inoculada como iniciador en el medio de leche desnatada, y cultivada a 37 °C hasta que el pH alcanzó el valor de 4,6 para preparar un cultivo de la cepa ATCC 15707 de tipo *Bifidobacterium longum*.

30 Un 1% (V/V) del cultivo de la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857 preparada según se ha descrito anteriormente, o bien un 1% (V/V) del cultivo de la *Bifidobacterium longum* FERM-BP-7787 o bien un 1% (V/V) del cultivo de la cepa ATCC 15707 de tipo *Bifidobacterium longum*, y un 0,01% (V/V) de la mezcla de cultivo de *Streptococcus thermophilus* y de *Lactobacillus bulgaricus*, fueron inoculados en un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) esterilizada a 90 °C durante 10 minutos, y se cultivaron a 37 °C hasta que el pH alcanzó un valor de 4,6 para obtener leche fermentada. Después de que la leche fermentada obtenida fue enfiada rápidamente, se midió el recuento viable de *Bifidobacterium*. Adicionalmente, la leche fermentada fue almacenada a 10 °C durante dos semanas, y el recuento viable de *Bifidobacterium longum* fue medido a la semana y a las dos semanas después del comienzo del almacenamiento.

40 Por otra parte, o bien un 1,5% (V/V) del cultivo de la *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 preparada según se ha descrito anteriormente o bien un 1,5% (V/V) del cultivo de la cepa ATCC 15707 de tipo *Bifidobacterium longum*, y un 0,4% (V/V) de la mezcla cultivada de *Streptococcus thermophilus* y de *Lactobacillus bulgaricus*, fueron inoculados en un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) esterilizada a 90 °C durante 10 minutos, y cultivados a 37 °C hasta que el pH alcanzó un valor de 4,6 para obtener leche fermentada como control. El recuento de *Bifidobacterium* viable en la leche fermentada, fue medido de la misma manera. Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 4.

45 Tabla 4

MCC857	<i>Bifidobacterium longum</i>	Recuento viable de <i>Bifidobacterium</i> (CFU/g)		
		Inmediatamente después del final de la fermentación	Tras una semana de almacenamiento	Tras dos semanas de almacenamiento
Presencia	FERM BP-7787	1,0 x 10 <sup>9</sup>	1,0 x 10 <sup>9</sup>	7,1 x 10 <sup>8</sup>
Presencia	ATCC 15707	6,5 x 10 <sup>8</sup>	3,8 x 10 <sup>8</sup>	2,0 x 10 <sup>8</sup>
Ausencia	FERM BP-7787	2,0 x 10 <sup>8</sup>	1,9 x 10 <sup>8</sup>	4,0 x 10 <sup>7</sup>
Ausencia	ATCC 15707	3,0 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	Indetectable

50 Ambos recuentos viables de la *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 y de la cepa ATCC 15707 de tipo *Bifidobacterium longum* en leche fermentada se incrementaron significativamente mediante co-cultivo con la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857. Adicionalmente, la tasa de supervivencia de cada *Bifidobacterium* almacenada a 10 °C durante dos semanas fue de un 30% o más; el de la *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 fue de un 71% y el de la cepa ATCC 15707 de tipo *Bifidobacterium longum* fue de un 31%.

55 Por el contrario, la tasa de supervivencia de la *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 almacenada a 10 °C durante dos semanas después del cultivo en ausencia de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857 fue de un 20% y no

se detectó ninguna cepa ATCC 15707 de tipo *Bifidobacterium longum* viable almacenada a 10 °C durante dos semanas después del cultivo en ausencia de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857.

Se obtuvieron los mismos resultados cuando se utilizó cada *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC852, 859, 865 y 866 en vez de la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857.

De ese modo, resulta evidente que cada *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC852, 857, 859, 865 y 866 tiene excelentes propiedades tanto para fomentar el crecimiento de las cepas de *Bifidobacterium longum* distintas de la *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 que tiene una excelente capacidad de supervivencia durante el almacenamiento, como de la capacidad de supervivencia de las cepas de *Bifidobacterium longum* distintas de la *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 durante el almacenamiento.

#### 5. Prueba comparativa con mezcla de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* y de *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris* divulgada en el Documento de Patente 1

El cultivo de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857, el cultivo de cepa ATCC 15707 de tipo *Bifidobacterium longum*, y el cultivo mezcla de *Streptococcus thermophilus* y de *Lactobacillus bulgaricus*, se prepararon de acuerdo con el método descrito en el apartado 4(2) anterior.

Un 1% del cultivo de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857, un 1% (V/V) del cultivo de cepa ATCC 15707 de tipo *Bifidobacterium longum*, y un 0,01% (V/V) del cultivo de mezcla de *Streptococcus thermophilus* y de *Lactobacillus bulgaricus*, preparados de la manera que antecede, fueron inoculados en un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) esterilizada a 90 °C durante 10 minutos. La mezcla fue cultivada a 37 °C hasta que el pH alcanzó un valor de 4,6 para preparar leche fermentada. La leche fermentada fue enfriada rápidamente y se midió el recuento viable de la *Bifidobacterium* contenida.

Por el contrario, un 1% (V/V) del cultivo de cepa ATCC 15707 de tipo *Bifidobacterium longum* preparado de la manera que antecede, y un 2% (V/V) de una mezcla "EZAL MA14" compuesta por *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* y por *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris* (fabricada por Rhodia), fueron inoculadas en un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) esterilizada a 90 °C durante 10 minutos, como control. La mezcla fue cultivada a 38 °C hasta que el pH alcanzó un valor de 4,6 para preparar leche fermentada. El recuento viable de *Bifidobacterium* en la leche fermentada, fue medido de la misma manera. La mezcla "EZAL MA14" corresponde a una mezcla "EZAL MR014" (fabricada por Rhodia) descrita en el Documento de Patente 1.

El recuento de *Bifidobacterium* viable en la leche fermentada preparada utilizando *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857, fue de  $5,5 \times 10^8$  CFU/g. Por el contrario, no se detectaron células de *Bifidobacterium* viable en una solución diluida obtenida al diluir leche fermentada preparada utilizando la mezcla "EZAL MA14" mediante  $10^6$  partes, y de ese modo el recuento de *Bifidobacterium* viable en la leche fermentada reveló ser de  $1 \times 10^6$  CFU/g o menos.

En otras palabras, esto reveló que no se consiguieron ningunos efectos de fomento del crecimiento de la *Bifidobacterium* ni otros efectos de acortamiento del tiempo, según se menciona en el Documento de Patente 1, cuando la *Bifidobacterium longum* fue co-cultivada con la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* y con la *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris*.

Según se ha descrito en lo que antecede, las *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC852, 857, 859, 865 y 866 (las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* que van a ser usadas en la presente invención), presentan una fuerte fermentabilidad en el medio de leche a una temperatura adecuada para la fermentación con *Bifidobacterium*, y también presentan excelentes efectos de fomento del crecimiento de *Bifidobacterium* y de mejora de la capacidad de supervivencia de las mismas durante el almacenamiento, cuando se co-cultivan con *Bifidobacterium longum*. De ese modo, es evidente que las bacterias tienen propiedades que no van acompañadas por cepas bacterianas convencionalmente conocidas pertenecientes al género *Lactococcus*. Adicionalmente, se espera que las bacterias que van a ser usadas en la presente invención pueden producir productos fermentados con sabor agradable, puesto que las bacterias no producen diacetil ni tampoco acetoina.

Aunque un medio de pre-cultivo utilizado para cultivar la *Bifidobacterium* y las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* no está de antemano particularmente limitado siempre que el medio de pre-cultivo se utilice usualmente, el medio de pre-cultivo es con preferencia un medio de leche. El medio de pre-cultivo es de manera más preferente un medio de leche desnatada reconstituida, puesto que el medio de leche desnatada reconstituida puede ser manipulado fácilmente. Se prefiere que la concentración del medio de leche desnatada reconstituida sea de un 3% (P/P) o más, y de manera más preferible de un 8% (P/P) o más. Adicionalmente, el medio de pre-cultivo puede contener sustancias de estimulación del crecimiento tales como extracto de levadura o agentes reductores tal como la L-cisteína. Es particularmente preferible que una sustancia de estimulación del crecimiento sea formulada en el medio de pre-cultivo, puesto que la *Bifidobacterium* presenta un bajo nivel de proliferación en el medio de leche. Específicamente, se puede utilizar un medio de cultivo que contenga de un 0,1% a un 1,0% (P/P) de extracto de levadura. El medio de pre-cultivo se somete a esterilización para su uso. La esterilización puede ser llevada a

cabo de acuerdo con algún método convencional, específicamente realizado por calentamiento de 80 a 122 °C durante 5 a 40 minutos, con preferencia de 85 a 95 °C durante 5 a 35 minutos.

5 El medio de base de la fermentación que va a ser usado para la fermentación con ambas *Bifidobacterium* y bacterias pertenecientes al género *Lactococcus*, no está particularmente limitado, puesto que el medio base de la fermentación se utiliza normalmente para producir leche fermentada. El medio base de fermentación puede ser preparado, por ejemplo, formulando un edulcorante tal como sacarosa, pectina, fruta, zumo de fruta, agar, gelatina, aceite y grasa, saborizante, agente colorante, estabilizante, agente reductor, o similar, en leche de vaca, leche desnatada, nata fresca, mantequilla, leche en polvo no descremada, leche desnatada en polvo, o similar, según se precise, seguido de esterilización, homogeneización, enfriamiento y similar de acuerdo con métodos convencionales.

15 Aunque la relación de inoculación de la *Bifidobacterium* respecto a las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus*, que van a ser inoculadas en el medio de base de fermentación como iniciadores, no está particularmente limitada, la relación de inoculación está comprendida preferentemente entre 100:1 a 1:10, y más preferiblemente entre 10:1 a 1:1. Aunque ambas cantidades de *Bifidobacterium* y de las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* que van a ser inoculadas en el medio base de fermentación no están limitadas en particular, es preferible que la suma de las mismas sea de un 0,01 a un 10% (V/V), más preferiblemente de un 0,1 a un 5% (V/V), con respecto a la cantidad de medio de base de fermentación.

20 Las bacterias de ácido láctico que van a ser usadas en la presente invención pueden contener además otras bacterias de ácido láctico adicionalmente a la *Bifidobacterium* y a las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus*, a menos que se vean perjudicados los efectos de las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* sobre la estimulación del crecimiento de la *Bifidobacterium* o sobre la mejora de la capacidad de supervivencia de la misma durante el almacenamiento. Aunque las otras bacterias de ácido láctico no están particularmente limitadas, dado que las otras bacterias de ácido láctico se utilizan normalmente para producir leche fermentada, se prefiere que las otras bacterias de ácido láctico sean *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. La relación de inoculación del contenido total de *Bifidobacterium* y de las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* frente al contenido total de las otras bacterias de ácido láctico, que van a ser inoculadas como iniciadores en un medio base de fermentación, no está particularmente limitada, a menos que se perjudiquen los efectos de las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* sobre la *Bifidobacterium*, siendo preferible que la relación de inoculación esté dentro de un rango de 1000:1 a 10:1.

35 Se prefiere que la temperatura de co-cultivo en el método para producir leche fermentada de acuerdo con la presente invención, esté dentro de una gama de 30 °C a 40 °C, más preferiblemente de 36 °C a 38 °C. Tanto la *Bifidobacterium* como las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* que van a ser usadas en la presente invención, pueden ser suficientemente proliferativas en la gama de temperatura anteriormente mencionada. Aunque el período de tiempo de cultivo sea determinado adecuadamente dependiendo de la clase de leche fermentada que ha de ser preparada, estando el período de tiempo de cultivo comprendido con preferencia en la gama de 5 a 18 horas.

40 La leche fermentada obtenida por cultivo puede ser suministrada como producto alimenticio, o puede ser procesada homogéneamente en un estado líquido. Adicionalmente, se puede formular adecuadamente zumo de fruta, fruta o similar, en la leche fermentada. La leche fermentada puede ser dispuesta en un contenedor mediante algún método de los usados convencionalmente, sin ninguna limitación particular.

45 En lo que sigue, se va a explicar circunstancialmente la presente invención mediante indicación de algunos ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los ejemplos que siguen.

### 50 Ejemplo 1

1000 ml de un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (P/P), preparada mediante disolución de un 10% en masa de leche en polvo desnatada (fabricada por Morinaga Milk Industry Co., Ltd.) en agua, fueron esterilizados a 90 °C durante 30 minutos, y después 30 ml de un cultivo germinal de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857 fueron inoculados en el mismo, seguido de cultivo a 25 °C durante 16 horas. Por otra parte, 1000 ml de un medio de leche desnatada al 11% (P/P) que contenía un 0,2% (P/P) de extracto de levadura, fueron esterilizados a 90 °C durante 30 minutos, y 100 ml de un cultivo germinal de *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 fueron inoculados en el mismo, seguido de cultivo a 37 °C durante 6 horas.

60 Aparte de lo anterior, 50 l de un medio base preparado mediante mezcla y disolución de materias primas compuestas por leche desnatada en polvo, leche en polvo no descremada, pectina y sacarosa, conteniendo el medio de base un 0,5% (P/P) de grasa láctea, un 8,0% (P/P) de componente sólido de leche no grasa, un 5,0% (P/P) de sacarosa, y un 0,2% (P/P) de pectina, fueron esterilizados a 90 °C durante 10 minutos, seguido de enfriamiento a 40 °C. 50 ml del cultivo obtenido anteriormente de la *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857 pre-cultivado y 500 ml del cultivo obtenido anteriormente de *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787 pre-cultivado, fueron inoculados en el medio de base esterilizado, seguido de cultivo a 37 °C durante 16 horas para obtener leche fermentada. La leche fermentada fue enfriada inmediatamente mientras se agitaba, y la leche fermentada enfriada fue homogeneizada a

una presión de 15 MPa, seguido de la disposición del producto resultante en un contenedor de vidrio que tenía una capacidad de 200 ml, y cerrando a continuación el contenedor para obtener una bebida de yogurt. La bebida de yogurt obtenida tenía un contenido de ácido láctico de un 0,68%, un pH de 4,64, y una viscosidad de 75 mPa·s, y contenía  $7,0 \times 10^9$  CFU/g de Bifidobacterium. Cuando la bebida de yogurt fue almacenada a 10 °C durante 21 días, el recuento viable de Bifidobacterium fue de  $5,2 \times 10^9$  CFU/g, y la tasa de supervivencia fue de un 74%.

### Ejemplo 2

30 ml de un cultivo germinal de Lactococcus lactis subespecie lactis MCC866 fueron inoculados en 1000 ml de un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) esterilizada a 90 °C durante 30 minutos, y a continuación cultivados a 25 °C durante 16 horas. Por otra parte, 1000 ml de un medio de leche desnatada al 11% (P/P) que contenía un 0,2% (P/P) de extracto de levadura, fueron esterilizados a 90 °C durante 30 minutos, y 100 ml de un cultivo germinal de Bifidobacterium longum FERM BP-7787 fueron inoculados en el mismo, seguido de cultivo a 37 °C durante 6 horas. Aparte de lo anterior, 50 ml de un cultivo mezcla de Streptococcus thermophilus (fabricada por HANSEN) y de Lactobacillus bulgaricus (fabricada por HANSEN), fueron inoculados en 1500 ml de un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) a 90 °C durante 30 minutos, y después cultivados a 37 °C durante 5 horas.

Aparte de lo anterior, 50 l de leche que contenía un 3% (P/P) de grasa láctea y un 9% (P/P) de componente sólido de leche no grasa, fueron calentados a 70 °C, homogeneizados a una presión de 15 MPa, esterilizados a 90 °C durante 10 minutos, y enfriados a continuación a 40 °C. En el medio de base así esterilizado, 500 ml de cultivo de Lactococcus lactis subespecie lactis MCC866 pre-cultivada según se ha descrito anteriormente, 500 ml del cultivo de Bifidobacterium longum FERM BP-7787, y 5 ml del cultivo mezcla de Streptococcus thermophilus y de Lactobacillus bulgaricus, fueron inoculados. El producto resultante fue dispuesto en un contenedor de resina que tenía una capacidad de 500 ml, y a continuación el contenedor se cerró herméticamente. Las bacterias fueron cultivadas a 37 °C durante 7 horas, y a continuación enfriadas inmediatamente. La leche fermentada así obtenida tenía un contenido de ácido láctico del 0,72%, y un pH de 4,55, y contenía  $5,8 \times 10^8$  CFU/g de Bifidobacterium. Cuando la leche fermentada fue almacenada a 10 °C durante 21 días, el recuento viable de Bifidobacterium fue de  $3,6 \times 10^8$  CFU/g, y la tasa de supervivencia fue de un 62%.

### Ejemplo 3

30 ml de un cultivo germinal de Lactococcus lactis subespecie lactis MCC865, fueron inoculados en 1000 ml de un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) a 90 °C durante 30 minutos, y a continuación cultivados a 25 °C durante 16 horas. Por otra parte, 1000 ml de un medio de leche desnatada al 11% (P/P) que contenía un 0,2% (P/P) de extracto de levadura, fueron esterilizados a 90 °C durante 30 minutos, y 100 ml de un cultivo germinal de Bifidobacterium longum FERM BP-7787 fueron inoculados en el mismo, seguido de cultivo a 37 °C durante 6 horas. Aparte de lo anterior, 50 ml de un cultivo mezcla de Streptococcus thermophilus (fabricada por HANSEN) y de Lactobacillus bulgaricus (fabricada por HANSEN), fueron inoculados en 1500 ml de un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) esterilizada a 90 °C durante 30 minutos, y a continuación cultivados a 42 °C durante 5 horas.

Aparte de lo anterior, 500 l de leche cruda que contenía un 3,4% (P/P) de grasa láctea y un 12,2% (P/P) de componente sólido de leche no grasa, fueron calentados a 70 °C, homogeneizados a una presión de 15 MPa, esterilizados a 90 °C durante 10 minutos, y enfriados a continuación a 40 °C. En el medio de base así esterilizado, fueron inoculados 5 l del cultivo de Lactococcus lactis subespecie lactis MCC865 pre-cultivado según se ha descrito anteriormente, 5 l del cultivo de Bifidobacterium longum FERM BP-7787, y 50 ml del cultivo mezcla de Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus, y a continuación cultivados a 37 °C durante 7,5 horas, seguido de enfriamiento inmediato. La leche fermentada así obtenida fue además agitada para pulverizar coágulos, y a continuación la leche fermentada pulverizada fue mezclada con conserva de arándanos mediante un método convencional a una relación de 7:3. La mezcla fue homogeneizada mediante agitación, y a continuación dispuesta en un contenedor de papel protector de la oxidación, que tenía una capacidad de 120 ml. La leche fermentada así obtenida con pulpa de arándanos, tenía un contenido de ácido láctico de un 0,80% y un pH de 4,45, y contenía  $5,5 \times 10^9$  CFU/g de Bifidobacterium. Cuando la leche fermentada fue almacenada a 10 °C durante 21 días, el recuento viable de Bifidobacterium fue de  $3,9 \times 10^8$  CFU/g, y la tasa de supervivencia de la misma fue del 71%.

### Aplicabilidad industrial

Puesto que la leche fermentada que contenía un recuento más elevado de Bifidobacterium viable, que cualquiera anterior, incluso inmediatamente antes del final de la fecha de uso, puede ser producida de acuerdo con el método de producción conforme a la presente invención, el método de producción está disponible en el sector de producción de leche fermentada o similar.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la producción de una leche fermentada, que comprende realizar fermentación utilizando amas bacterias pertenecientes a un género *Bifidobacterium* y bacterias pertenecientes a un género *Lactococcus* como bacterias de ácido láctico, en el que las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* tienen propiedades bacteriológicas de:
- (1) una fermentabilidad que coagula un medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) cuando se cultiva a una temperatura de 25 °C a 37 °C durante 16 horas,
- (2) propiedades de fomento del crecimiento de la *Bifidobacterium longum*, que conducen a un recuento viable de *Bifidobacterium longum* de  $5 \times 10^8$  CFU/g o más, cuando se co-cultiva con *Bifidobacterium longum* en el medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) hasta que el pH del mismo es de 4,4 a 4,6, y
- (3) propiedades de mejora de la capacidad de supervivencia de la *Bifidobacterium longum* durante el almacenamiento, que conducen a una tasa de supervivencia de la *Bifidobacterium longum* de un 30% o más, después de un co-cultivo con *Bifidobacterium longum* en el medio de leche desnatada reconstituida al 10% (P/P) hasta que el pH del mismo es de 4,4 a 4,6, enfriamiento rápido, y dos semanas de almacenamiento a 10 °C.
2. El método para la producción de una leche fermentada de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* no tienen capacidad alguna para fermentar xilosa, no producen ni diacetil ni acetoina.
3. El método para la producción de una leche fermentada de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* son *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*.
4. El método para la producción de una leche fermentada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* comprenden al menos una cepa bacteriana elegida en el grupo consistente en *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC852 (FERM BP-10742), *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC857 (FERM BP-10757), *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC859 (FERM BP-10744), *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC865 (FERM BP-10745), y *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* MCC866 (FERM BP-10746).
5. El método para la producción de una leche fermentada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium* son *Bifidobacterium longum*.
6. El método para la producción de una leche fermentada de acuerdo con la reivindicación 5, en el que una cepa bacteriana de la *Bifidobacterium longum* es la *Bifidobacterium longum* FERM BP-7787.
7. El método para la producción de una leche fermentada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que ambas *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* son utilizadas además como bacterias de ácido láctico.
8. Una leche fermentada preparada mediante el método para la producción de leche fermentada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.