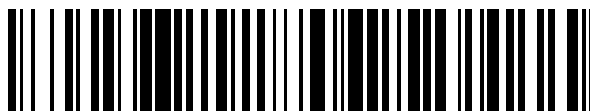


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 854**

51 Int. Cl.:

A23C 9/12 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2009** **E 09762328 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013** **EP 2233011**

54 Título: **Procedimiento para producir leche fermentada**

30 Prioridad:

11.06.2008 JP 2008152949

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.06.2013

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 y
YONEZAWA, SUMIKO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 409 854 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

Procedimiento para producir leche fermentada

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir leche fermentada obtenida por cofermentación de una cepa de *Lactococcus lactis* que tiene proteinasa envuelta en la pared celular, PrtP, y bacterias que pertenecen a un género *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.

Se reivindica prioridad sobre la solicitud de patente japonesa n.º 2008-152949, presentada el 11 de junio de 2008.

Antecedentes de la invención

10 Las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium*, que en el presente documento se denominan *Bifidobacterium*, son una de las cepas bacterianas predominantes en la microflora intestinal formada en el tubo digestivo humano. Se sabe que las *Bifidobacterium* tienen una actividad reguladora de la función intestinal, una actividad inmunoestimuladora, y una actividad anticancerosa.

15 En consecuencia, la demanda de productos alimenticios que contengan *Bifidobacterium* viable, tales como leche fermentada con *Bifidobacterium* o similar, está en aumento de acuerdo con un incremento de la concienciación de los consumidores sobre la salud.

20 Las *Bifidobacterium* presentan una potencia de proliferación mala en un medio de leche. En consecuencia, varias sustancias estimuladoras del crecimiento, tales como extracto de levadura y similares, se formulan, en general, en leche fermentada de modo que las *Bifidobacterium* estén contenidas en ella en un contenido constante, por ejemplo, 1×10^7 CFU/ml. Sin embargo, las sustancias estimuladoras del crecimiento, en general, son caras y pueden degradar el sabor.

25 Se han divulgado varios procedimientos para promover el crecimiento de las *Bifidobacterium* o para mejorar la supervivencia de las mismas durante el almacenamiento por fermentación con *Bifidobacterium* y otra bacteria ácido láctica sin añadir ninguna sustancia estimuladora del crecimiento o similar. Por ejemplo, (1) se han divulgado un yogur que contiene *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, y *Bifidobacterium*, y un procedimiento para preparar el yogur (véase, por ejemplo, el documento de patente 1), con respecto a un procedimiento para promover el crecimiento de *Bifidobacterium* para preparar leche fermentada.

30 Por ejemplo, (2) se ha divulgado un procedimiento para fermentar leche con *Bifidobacterium*, incluyendo cultivar *Bifidobacterium breve* junto con *Lactococcus lactis subsp. lactis*, lo que no forma ni diacetilo ni acetoina, en un medio que contiene leche como el componente principal del mismo (véase, por ejemplo, el documento de patente 2), con respecto a un procedimiento para mejorar la supervivencia de *Bifidobacterium* durante el almacenamiento de la leche fermentada.

[Documento de Patente 1] Publicación de patente japonesa n.º 3.364.491

[Documento de Patente 2] Publicación de patente japonesa n.º 3.068.484

35 Klaver (1993) divulga que el cocultivo de bifidobacterias con lactobacilos proteolíticos proporciona suficientes compuestos de nitrógeno disponible para permitir el crecimiento en leche. No propone que los lactococos se podrían usar en cocultivos con bifidobacterias; véase Klaver (1993) Netherlands Milk Diary J. 47, 151-164. Kheadr (2007) investiga la viabilidad de la cepa específica *Bifidobacterium longum* DSM 20097 en cocultivo con seis cepas de bacterias ácido lácticas, entre otras, con *Lactococcus lactis subsp. lactis* R0058; véase Kheadr (2007) Alex. J. Fd. Sci & Technol 4, 45-62. Kheadr descubre que el cocultivo con *Lactobacillus plantarum* dio como resultado la mayor
40 viabilidad de la cepa *Bifidobacterium*. Por lo tanto, Kheadr no proporciona indicios de uso de cepas de *Lactococcus lactis* en cocultivo con bifidobacterias.

Divulgación de la invención

Problemas que debe solucionar la invención

45 Sin embargo, no siempre se puede decir que el procedimiento descrito anteriormente en (1) tenga efectos suficientes de promoción del crecimiento de *Bifidobacterium* y reducción del periodo de fermentación. Además, aunque se informa de que el crecimiento de *Bifidobacterium* está promovido bajo condiciones en las que están presentes dos cepas, *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, no se hace mención sobre los efectos en el caso en el que se emplee solo cada una de *Lactococcus lactis subsp. lactis* o *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

50 En el procedimiento descrito anteriormente en (2), por otra parte, los efectos tanto de promover la proliferación como de mejorar las propiedades de supervivencia se observan empleando una mezcla de la cepa dada de *Bifidobacterium* y la cepa particular de bacteria ácido láctica, pero no se hace mención sobre una *Bifidobacterium* distinta de *Bifidobacterium breve*, por ejemplo, *Bifidobacterium longum*, que se use extensamente en alimentos.

La presente invención tiene por objetivo de la misma la provisión de un procedimiento para producir leche fermentada usando bacterias ácido lácticas que mejoran las propiedades proliferativas de *Bifidobacterium*, y leche fermentada preparada de acuerdo con el procedimiento de producción.

Medios para resolver los problemas

- 5 Los inventores de la presente invención investigaron profundamente para resolver los problemas mencionados anteriormente, y como resultado, los inventores descubrieron que se puede promover la proliferación de *Bifidobacterium* cuando una cepa de *Lactococcus lactis* que posee proteinasa envuelta en la pared celular, PrtP, se fermenta en una mezcla con una cepa de *Bifidobacterium*, y por tanto los inventores completaron la presente invención.
- 10 Esto es, la presente invención proporciona un procedimiento para producir leche fermentada, incluyendo: fermentar una base de fermentación en la que dicha base de fermentación contiene leche usando tanto la cepa *Lactococcus lactis* que tiene proteinasa envuelta en la pared celular, PrtP, y bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium*, en donde la bacteria que pertenece al género *Bifidobacterium* es *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.
- 15 Además, la presente invención proporciona una leche fermentada preparada por el procedimiento mencionado anteriormente para producir una leche fermentada.

Efectos de la invención

- De acuerdo con el procedimiento para producir leche fermentada de acuerdo con la presente invención, la leche fermentada que contiene una gran cantidad de *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium longum* se puede producir más eficazmente que nunca antes. Además, la leche fermentada producida por el procedimiento de la presente invención para producir leche fermentada presenta efectos reguladores de la función intestinal adicionales y es útil para el control de la salud.
- 20

Breve descripción del dibujo

- La Fig. 1 muestra el patrón de bandas de productos de PCR que se obtuvieron por PCR empleando ADN de cepas respectivas de *Lactococcus lactis* como molde y cebadores para detectar un gen para una enzima PrtP, y se separaron por electroforesis y se detectaron por tinción.
- 25

Descripción detallada de la invención

- Las bacterias ácido lácticas que se pueden emplear en la presente invención son de la cepa *Lactococcus lactis* que posee una enzima PrtP. La enzima PrtP es una enzima que está localizada en la membrana celular y que tiene un sitio activo expuesto en la superficie celular. Se ha informado de varias cepas de bacterias ácido lácticas que poseen una enzima PrtP, por ejemplo, en cepas del género *Lactococcus*, tales como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, y otras.
- 30

- Hasta ahora, se sabe que las enzimas PrtP derivadas de *Lactococcus lactis* son del tipo P_I (que no degrada bien la alfa-caseína, pero que degrada bien la beta-caseína de la proximidad del extremo C terminal), del tipo P_{III} (que degrada bien alfa y beta-caseínas tanto del extremo C terminal como del N terminal), y de tipos intermedios (P_I/P_{III}) entre esos (véase, por ejemplo, Reid, J.R. et al., Applied and Environmental Microbiology, 1994, vol. 60, n.º 3, p. 801-806).
- 35

En particular, las enzimas PrtP derivadas de *Lactococcus lactis* incluyen, por ejemplo, enzimas PrtP, de las que las secuencias génicas se han depositado con los números de acceso AY542690 y AY542691, y otras en el NCBI (National Center for Biotechnology Information).

- 40 Se puede identificar una bacteria ácido láctica ya sea una que tenga una enzima PrtP o no, por ejemplo, empleando técnicas de análisis génico, tales como PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y otras, para examinar si la bacteria lleva o no un gen que codifica una enzima PrtP.

- Las enzimas PrtP, que tienen su sitio enzimáticamente activo sobre el exterior de la célula, pueden degradar proteínas en el medio. Por ejemplo, cuando una bacteria ácido láctica que posee una enzima PrtP prolifera en un medio de leche, la enzima PrtP degrada las proteínas de la leche en el medio de leche, proporcionando oligopéptidos y aminoácidos requeridos para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas. Como resultado, las cepas de *Lactococcus lactis* que tienen una enzima PrtP se caracterizan porque proliferan rápidamente y son altamente fermentativas, de modo que cuando se cultivan en el intervalo de temperaturas de 25 a 30 °C durante 16 horas en un medio de leche en polvo descremada reconstituida al 10 % (p/p), pueden provocar que el medio se coagule. Las características de tener esta propiedad proliferativa y ser altamente fermentativas también se pueden usar para detectar cepas de *Lactococcus lactis* que tengan una enzima PrtP. Además, también es posible detectar cepas de *Lactococcus lactis* que tienen una enzima PrtP detectando la actividad de la enzima PrtP.
- 45
- 50

Las cepas de *Lactococcus lactis* que se pueden emplear en la presente invención no están específicamente limitadas, si tienen una enzima PrtP. Las cepas preferentes son *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus*

lactis subsp. lactis, y similares, debido a que se han usado en el pasado como materias primas de productos lácteos, tales como leche fermentada y similares, que usan *Bifidobacterium* como materia prima, y por tanto se cree que tienen niveles altos de seguridad. Las *Lactococcus lactis* que tienen una enzima PrtP incluyen, por ejemplo, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC 100676^T, *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20101, y otras.

- 5 Lo siguiente proporciona una explicación con más detalle de *Lactococcus lactis* que tienen una enzima PrtP que se puede emplear en la presente invención, y los efectos de promover la proliferación de *Bifidobacterium*.

1. Detección de si las cepas de *Lactococcus lactis* tienen una enzima PrtP

Se realizaron pruebas para determinar si las siguientes cepas tienen o no una enzima PrtP: *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC 100676^T (ATCC 19257^T), *Lactococcus lactis subsp. cremoris* ATCC-9625, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NBRC 12007 (NCDO 497), *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20101, y *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20128.

15 Específicamente, se inoculó cada una de estas cepas a un nivel de un 3 % en caldo M17 de Difco® (Becton, Dickinson and Company) complementado con lactosa y glucosa a un 0,5 % cada una, y se cultivó a 30 °C durante 16 horas. Se obtuvieron células por centrifugación y se extrajo ADN empleando el kit DNeasy (QIAGEN) para examinar, por un procedimiento de PCR, si la cepa tiene o no una enzima PrtP. Se realizó la PCR de acuerdo con los procedimientos descritos en una referencia (Journal of Applied Microbiology, 2006, vol. 100, p. 1307-1317). Los

20 La Fig. 1 muestra el patrón de bandas en el que se separaron los productos de PCR por electroforesis y se detectaron por tinción. En la Fig. 1, "1" representa un carril en el que se hicieron correr marcadores de peso molecular; "2" representa un carril en el que se hizo correr el producto de PCR de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC 100676^T; "3" representa un carril en el que se hizo correr el producto de PCR de *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20101; "4" representa un carril en el que se hizo correr el producto de PCR de *Lactococcus lactis subsp. lactis* NBRC 12007; "5" representa un carril en el que se hizo correr el producto de PCR de *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20128; y "6" representa un carril en el que se hizo correr el producto de PCR de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* ATCC-9625. De estos resultados, se estableció que *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC 100676^T y *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20101 llevan un gen para PrtP. Por otra parte, resultó que un gen para PrtP no se lleva por cada una de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* ATCC-9625, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NBRC 12007, y *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20128.

2. Prueba con respecto a la fermentabilidad de *Lactococcus lactis* en medio de leche

35 En primer lugar, se inoculó cada una de las cepas a un nivel de un 3 % en caldo M17 de Difco® (Becton, Dickinson and Company) complementado con lactosa y glucosa a un 0,5 % cada una, y se cultivó a 30 °C durante 16 horas. Se recogieron las células por centrifugación, se lavó, y a continuación se suspendió al mismo volumen que el del primer medio de cultivo en un medio de leche que tiene la composición descrita a continuación, preparando de este modo un cultivo de siembra.

40 En segundo lugar, se esterilizó un medio de leche que contenía un 1 % (p/p) de glucosa y un 10 % (p/p) de un polvo de leche descremada reconstituida a 95 °C durante 30 minutos. A continuación, se inoculó el cultivo de siembra de cada una de las cepas mencionadas anteriormente a un nivel de un 3 % y se cultivó a 30 °C durante 16 horas. Después de que se enfriara rápidamente el medio de cultivo obtenido, se observó el estado cuajado, y se midieron el pH y el recuento viable de las bacterias ácido lácticas. Se midió el recuento viable usando placas planas de agar de recuento de placa con BCP disponibles comercialmente (Eikenkizai Co., Ltd.).

45 Los resultados de las medidas se muestran en la tabla 1. *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC 100676^T y *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20101 que tienen un gen para una enzima PrtP dieron como resultado la disminución de pH hasta 5,0 o menor y la coagulación del medio. Además, el recuento viable de bacterias de ácido láctico contenidas fue de 3×10^8 CFU/g o mayor, y resultó que estas cepas tuvieron propiedades muy buenas en términos de proliferación y fermentación. Por el contrario, cada una de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* ATCC-9625, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NBRC 12007, y *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20128 que carecen de un gen para una enzima PrtP dio como resultado un pH de 5,5 o mayor, sin coagulación del medio, y el recuento viable de bacterias ácido lácticas de 1×10^8 CFU/g o menor.

Tabla 1

Cepa	PrtP	Condiciones de cultivo (30 °C, 16 horas)		
		Número de bacterias (CFU/g)	pH	Estado de coagulación
NBRC 100676 ^T	+	3,5 X 10 ⁸	4,9	Coagulación
JCM 20101	+	1,3 X 10 ⁹	4,8	Coagulación
NBRC 12007	-	3,0 X 10 ⁷	6,0	Sin coagulación
JCM 20128	-	4,4 X 10 ⁷	5,8	Sin coagulación
ATCC-9625	-	4,2 X 10 ⁷	5,6	Sin coagulación

3. Prueba de cocultivo con *Bifidobacterium*

En primer lugar, se preparó *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 en el procedimiento descrito en el ejemplo 1 descrito a continuación.

Además, se inoculó cada una de las cepas de *Lactococcus lactis* a un nivel de un 3 % en un caldo M17 de Difco® (Becton, Dickinson and Company) complementado con lactosa y glucosa a un 0,5 % cada una, y se cultivó a 30 °C durante 16 horas. Se recogieron las células por centrifugación, se lavó, y a continuación se suspendió al mismo volumen que el del primer medio de cultivo en un medio de leche que tiene la composición descrita a continuación, preparando de este modo un cultivo de siembra.

Se esterilizó un medio de leche que contenía un 1 % (p/p) de glucosa y un 10 % (p/p) de un polvo de leche descremada reconstituida a 90 °C durante 10 minutos. A continuación, se inoculó un 1 % del cultivo de siembra de cada una de las cepas de *Lactococcus lactis* preparado como se describe anteriormente y un 1 % del cultivo de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 en el medio de leche, y se cultivó a 37 °C durante 16 horas para obtener leche fermentada. La leche fermentada resultante se enfrió rápidamente, y se midieron el pH de la misma y el recuento viable de las *Bifidobacterium* contenidas. Los resultados de las medidas se muestran en la tabla 2. Se midió el recuento viable de las *Bifidobacterium* usando placas planas de agar propionato TOS (fabricado por Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.).

Los resultados de las medidas se muestran en la tabla 2. Cuando se llevó a cabo el cultivo en la mezcla con cada una de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC 100676^T y *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20101 que tienen un gen para una enzima PrtP, el pH disminuyó hasta 5,0 o menor, se produjo una leche fermentada coagulada, y el recuento viable de *Bifidobacterium* alcanzó 2 x 10⁸ CFU/g o mayor. Por el contrario, cuando se llevó a cabo el cultivo en la mezcla con cada una de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* ATCC-9625, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NBRC 12007, y *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20128 que carecen de un gen para una enzima PrtP, el pH fue de 5,5 o mayor, no se produjo coagulación de la base de fermentación, y el recuento viable de *Bifidobacterium* fue de 2 x 10⁷ CFU/g o menor.

Por lo tanto, queda claro que las cepas de *Lactococcus lactis* que tienen un gen para una enzima PrtP son superiores en promover la proliferación de *Bifidobacterium*, en comparación con las que carecen de un gen para una enzima PrtP, y que el cultivo de una cepa de *Lactococcus lactis* que tenga un gen para una enzima PrtP en una mezcla con *Bifidobacterium* puede producir un efecto de promoción de la proliferación de *Bifidobacterium*.

Tabla 2

Cepa	PrtP	ATCC BAA-999	
		Número de bacterias (CFU/g)	pH
NBRC 100676 ^T	+	2,8 X 10 ⁸	4,6
JCM 20101	+	2,4 X 10 ⁸	4,93
NBRC 12007	-	7,0 X 10 ⁶	5,59
JCM 20128	-	1,7 X 10 ⁷	5,57
ATCC-9625	-	1,5 X 10 ⁷	5,59

4. Comparación de las bacterias ácido lácticas como se describe en los documentos de patente 1 y 2 con las cepas de *Lactococcus lactis* de la presente invención

En primer lugar, se prepararon cultivos de siembra de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC 100676^T y *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20101 que tienen un gen para una enzima PrtP en el procedimiento descrito en la sección 3 anterior.

En segundo lugar, se preparó un cultivo de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 en el procedimiento descrito en el ejemplo 1 descrito a continuación.

Además, se esterilizaron 1.000 ml de un medio de polvo de leche descremada reconstituida al 10 % (p/p) complementado con un 0,2 % (p/p) de extracto de levadura (Difco) a 90 °C durante 30 minutos. A continuación, se inocularon 30 ml de un cultivo de cepa de tipo *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435 como se describe en el documento de patente 2 en el medio de polvo de leche descremada reconstituida, y se cultivó a 30 °C durante 16 horas para preparar un cultivo de cepa de tipo *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435.

Por separado, se esterilizó un medio de polvo de leche descremada reconstituida al 10 % (p/p) a 90 °C durante 10 minutos. A continuación, se inocularon un 1 % del cultivo de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC 100676^T, *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20101, o cepa de tipo *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435 preparada como se describe anteriormente y un 1 % del cultivo de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 en el medio de polvo de leche descremada reconstituida, y se cultivó a 37 °C durante 16 horas para producir leche fermentada. La leche fermentada resultante se enfrió rápidamente, y se midieron el pH de la misma y el recuento viable de las *Bifidobacterium* contenidas.

Por otra parte, se esterilizó un medio de polvo de leche descremada reconstituida al 10 % (p/p) a 90 °C durante 10 minutos. A continuación, se inoculó un 1 % del cultivo de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 preparado como se describe anteriormente y un 2 % de la mezcla "EZAL MA 14" (fabricado por Rhodia) de *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* como se describe en el documento de patente 1 en el medio de polvo de leche descremada reconstituida, y se cultivó a 37 °C hasta que el medio alcanzó un pH de 4,6 para obtener leche fermentada. Se midió el recuento viable de *Bifidobacterium* en la leche fermentada producida de este modo de forma similar. El "EZAL MA 14" es una mezcla que corresponde al "EZAL MR014" (fabricado por Rhodia) descrito en el documento de patente 1.

Los resultados se muestran en la tabla 3. En el caso de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC 100676^T y *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20101 que tiene un gen para una enzima PrtP, el recuento viable de *Bifidobacterium* alcanzó aproximadamente 3×10^8 CFU/g. Por el contrario, la leche fermentada producida empleando el "EZAL MA 14" dio como resultado la disminución del pH hasta 5,0 o menor y la coagulación de la base de fermentación, aunque no se detectó *Bifidobacterium* de las soluciones diluidas 10^6 veces de la leche fermentada, lo que indica que el recuento viable de *Bifidobacterium* contenidas en la leche fermentada era de 1×10^6 CFU/g o menor.

Por lo tanto, queda claro que los efectos de promover el crecimiento de *Bifidobacterium* y reducir el periodo de fermentación no se puede lograr hasta un grado suficiente cuando *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* como se describe en el documento de patente 1 se someten a cultivo en una mezcla con *Bifidobacterium longum*.

En el caso de la leche fermentada producida empleando cepa de tipo *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435 como se describe en el documento de patente 2, el pH fue de 5,0 o mayor y no se produjo coagulación, y no se produjo leche fermentada, cuando se realizó la fermentación durante 16 horas. El recuento viable de *Bifidobacterium* al final de la fermentación fue de 1×10^8 CFU/g o menor, lo que indica que el efecto de promover la proliferación de *Bifidobacterium* era extraordinariamente débil, en comparación con cepas de *Lactococcus lactis* que tiene un gen para una enzima PrtP de acuerdo con la presente invención.

Estos resultados indicaron que *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC 100676^T y *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20101, que son de *Lactococcus lactis* que tienen un gen para una enzima PrtP, tienen un efecto superior de promoción de la proliferación sobre bacterias del género *Bifidobacterium*.

Tabla 3

Cepa	PrtP	ATCC BAA-999	
		Número de bacterias (CFU/g)	pH
NBRC 100676 ^T	+	$3,0 \times 10^8$	4,6
JCM 20101	+	$3,3 \times 10^8$	4,8
Técnica anterior (EZAL MA14)	-	No detectado	4,6
Técnica anterior (ATCC 19435)	-	$9,2 \times 10^7$	5,4

En la presente invención, aunque no queda claro por qué se logra el efecto de promoción del crecimiento de *Bifidobacterium* por un cultivo mezclado de una cepa de *Lactococcus lactis* que tiene una enzima PrtP y *Bifidobacterium*, se presume que el motivo es que las proteínas de la leche en un medio de leche son hidrolizadas por PrtP que tienen las *Lactococcus lactis*, dando como resultado oligopéptidos que tienen un efecto de promoción de la proliferación de *Bifidobacterium*.

Las cepas de *Bifidobacterium* que se pueden emplear en la presente invención no están específicamente limitadas. Las cepas preferentes son *Bifidobacterium longum*, porque el efecto de promoción de la proliferación por *Lactococcus lactis* que tiene una enzima PrtP se logra hasta un grado más notable. En particular, es preferente *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.

En la presente invención, aunque un medio de precultivo usado para cultivar *Lactococcus lactis* que tiene una enzima PrtP y *Bifidobacterium* no está particularmente limitado siempre que se use normalmente el medio de precultivo, el medio de precultivo es preferentemente un medio de leche. El medio de precultivo es más preferentemente un medio de polvo de leche descremada reconstituida, puesto que el medio de leche desnatada reconstituida se puede manipular fácilmente. Es preferente que la concentración del medio de leche desnatada reconstituida sea de un 3 % (p/p) o más, y más preferentemente de un 8 % (p/p) o más. Además, el medio de precultivo puede contener sustancias estimuladoras del crecimiento tales como extracto de levadura o agentes reductores tales como L-cisteína. Es particularmente preferente que la sustancia estimuladora del crecimiento se formule en el medio de precultivo, puesto que las *Bifidobacterium* presentan un nivel bajo de proliferación en el medio de leche. Específicamente, se puede usar un medio de cultivo que contiene de un 0,1 a un 1 % (p/p) de extracto de levadura. El medio de precultivo se somete a la esterilización para el uso. La esterilización se puede realizar de acuerdo con un procedimiento convencional, realizado específicamente calentando a de 80 a 122 °C durante de 5 a 40 minutos, preferentemente a de 85 a 95 °C durante de 5 a 35 minutos.

En la presente invención, el medio de base de fermentación que se usa para la fermentación con *Bifidobacterium* y *Lactococcus lactis* que tiene una enzima PrtP no está particularmente limitado, siempre que se use normalmente el medio de base de fermentación para producir leche fermentada. El medio de base de fermentación se puede preparar, por ejemplo, formulando un edulcorante tal como sacarosa, pectina, fruta, sumo de fruta, agar, gelatina, aceite y grasa, aroma, agente colorante, estabilizante, agente reductor, o similares, en leche de vaca, leche desnatada, crema fresca, mantequilla, polvo de leche entera, leche desnatada en polvo, o similares, según sea necesario, seguido de esterilización, homogeneización, refrigeración, y similares, de acuerdo con procedimientos convencionales.

Aunque la proporción de inoculación de *Bifidobacterium* y *Lactococcus lactis*, que se inoculan en el medio de base de fermentación como iniciadores no está particularmente limitada, la proporción de inoculación es preferentemente de 100:1 a 1:10, y más preferentemente de 10:1 a 1:1. Aunque ambas cantidades de *Bifidobacterium* y las bacterias que pertenecen al género *Lactococcus* que se van a inocular en el medio de base de fermentación no están particularmente limitadas, es preferente que la cantidad de suma de las mismas sea de un 0,01 a un 10 % (V/V), más preferentemente de un 0,1 a un 5 % (V/V), con respecto a la cantidad del medio de base de fermentación.

Las bacterias ácido lácticas que se usan en la presente invención pueden contener adicionalmente otras bacterias ácido lácticas además de *Bifidobacterium* y *Lactococcus lactis*, a menos que se interrumpan los efectos de *Lactococcus lactis* sobre la estimulación del crecimiento de *Bifidobacterium* o la mejora de la supervivencia de las mismas durante el almacenamiento. Aunque las otras bacterias ácido lácticas no están particularmente limitadas, siempre que se usen normalmente las otras bacterias ácido lácticas para producir leche fermentada, las otras bacterias ácido lácticas son preferentemente *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. La proporción de inoculación del contenido total en *Bifidobacterium* y *Lactococcus lactis* con respecto al contenido total en las otras bacterias ácido lácticas, que se van a inocular como iniciadoras en un medio de base de fermentación, no está particularmente limitada, a menos que se interrumpan los efectos de las bacterias que pertenecen al género *Lactococcus* o *Bifidobacterium*, es preferente que la proporción de inoculación esté dentro de un intervalo de 1.000:1 a 10:1.

Es preferente que la temperatura de cocultivo en el procedimiento para producir leche fermentada de acuerdo con la presente invención esté dentro de un intervalo de 30 °C a 40 °C, más preferentemente de 36 °C a 38 °C. Tanto las *Bifidobacterium* como las *Lactococcus lactis* que se van a usar en la presente invención pueden ser suficientemente proliferativas en el intervalo de temperatura mencionado anteriormente. Aunque el periodo de tiempo de cultivo se determina de forma adecuada dependiendo del tipo de leche fermentada que se va a preparar, el periodo de tiempo de cultivo está preferentemente dentro de un intervalo de 5 a 18 horas.

La leche fermentada obtenida por cultivo se puede proporcionar como un producto alimenticio, o se puede procesar homogéneamente en un estado líquido. Además, se pueden formular de forma adecuada zumo de fruta, fruta, o similares, en la leche fermentada. La leche fermentada se puede poner en un recipiente por un procedimiento usado convencionalmente sin ninguna limitación particular.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se explicará de forma detallada indicando algunos ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Se esterilizaron 1.000 ml de un medio de polvo de leche descremada reconstituida al 10 % (p/p) a 90 °C durante 30 minutos. A continuación, se inocularon 30 ml de un cultivo de siembra de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC 100676^T en el medio de polvo de leche descremada reconstituida, y se cultivó a 25 °C durante 16 horas. Además, se esterilizaron 1.000 ml de un medio de polvo de leche descremada al 11 % (p/p) complementado con un 0,2 % (p/p) de extracto de levadura a 90 °C durante 30 minutos. A continuación, se inocularon 100 ml de un cultivo de siembra de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 en el medio de polvo de leche descremada, y se cultivó a 37 °C durante 6 horas.

Aparte de lo anterior, se esterilizaron 50 l de un medio de base preparado mezclando y disolviendo materias primas compuestas de polvos de leche desnatada, polvos de leche entera y sacarosa, conteniendo el medio de base un 0,5 % (p/p) de crema de leche, un 8,0 % (p/p) de componente sólido de leche descremada, un 8,0 % (p/p) de sacarosa, y un 0,2 % (p/p) de pectina, a 90 °C durante 10 minutos, seguido de refrigeración a 40 °C. Se inocularon 50 ml del cultivo obtenido anterior de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC 100676^T precultivado y 500 ml del cultivo obtenido anterior de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 precultivado en el medio de base esterilizado, seguido de cultivo a 37 °C durante 16 horas para obtener leche fermentada. La leche fermentada se enfrió inmediatamente mientras se agitaba, y la leche fermentada enfriada se homogeneizó a una presión de 15 MPa, seguido de la colocación de lo resultante en un recipiente de vidrio que tiene una capacidad de 200 ml y a continuación del sellado del recipiente para obtener una bebida de yogur. La bebida de yogur obtenida tenía un contenido en ácido láctico de un 0,7 %, un pH de 4,6, y contenía $5,0 \times 10^8$ CFU/g de *Bifidobacterium*. Cuando se almacenó la bebida de yogur a 10 °C durante 14 días, el recuento viable de *Bifidobacterium* fue de $2,5 \times 10^8$ CFU/g, y la tasa de supervivencia de las mismas era de un 50 %.

Ejemplo 2

Se esterilizaron 1000 ml de un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) complementado con un 1 % de glucosa a 90 °C durante 30 minutos. A continuación, se inocularon 30 ml de un cultivo de siembra de *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20101 en el medio de leche desnatada reconstituida, y se cultivó a 25 °C durante 16 horas. Por otra parte, se esterilizaron 1000 ml de un medio de leche desnatada al 11 % (p/p) que contenía extracto de levadura al 0,2 % (p/p) a 90 °C durante 30 minutos, y se inocularon 100 ml de un cultivo de siembra de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 en el, seguido de cultivo a 37 °C durante 16 horas. Aparte de lo anterior, se inocularon 50 ml de un cultivo mezclado de *Streptococcus thermophilus* (fabricado por HANSEN) y *Lactobacillus bulgaricus* (fabricado por HANSEN) en 1500 ml de un medio de leche desnatada reconstituida al 10 % (p/p) esterilizado a 90 °C durante 30 minutos, y a continuación se cultivó a 37 °C durante 5 horas.

Aparte de lo anterior, se calentaron 50 l de leche cruda que contenía un 3,0 % (p/p) de crema de leche y un 9,0 % (p/p) de componente sólido de leche descremada a 70 °C, se homogeneizó a una presión de 15 MPa, se esterilizó a 90 °C durante 10 minutos, y a continuación se enfrió a 40 °C. En el medio de base esterilizado de este modo, se inocularon 500 ml del cultivo de *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 20101 precultivada como se describe anteriormente, 500 ml del cultivo de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, y 5 ml del cultivo mezclado de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Lo resultante se colocó en un recipiente de resina que tenía una capacidad de 500 ml, y a continuación se selló el recipiente. Se cultivaron las bacterias a 37 °C durante 6 horas, y a continuación se enfrió inmediatamente. La leche fermentada obtenida de este modo tenía un contenido en ácido láctico de un 0,7 %, y un pH de 4,6, y contenía $4,8 \times 10^8$ CFU/g de *Bifidobacterium*. Cuando se almacenó la leche fermentada a 10 °C durante 14 días, el recuento viable de *Bifidobacterium* fue de $2,5 \times 10^8$ CFU/g, y la tasa de supervivencia de las mismas era de un 38 %.

Aplicabilidad Industrial

Ya que la leche fermentada que contiene un recuento de *Bifidobacterium* viables mayor que nunca antes se puede producir de acuerdo con el procedimiento de producción de acuerdo con la presente invención, el procedimiento de producción está disponible en el campo de la producción de leche fermentada o similares.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir leche fermentada, que comprende fermentar una base de fermentación en la que dicha base de fermentación contiene leche usando tanto la cepa *Lactococcus lactis* que tiene proteinasa envuelta en la pared celular, PrtP, y bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium*, en donde la bacteria que pertenece al género *Bifidobacterium* es *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.
- 5 2. Una leche fermentada preparada por el procedimiento de producción de leche fermentada de acuerdo con la reivindicación 1.

FIG. 1

