

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 516**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23C 9/152 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2007** **E 07790217 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013** **EP 2042590**

54 Título: **Potenciador de la proliferación de bacterias acidolácticas, y agente para mejorar la capacidad de supervivencia de bacterias acidolácticas**

30 Prioridad:

30.06.2006 JP 2006182374

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

30.10.2013

73 Titular/es:

**MEGMILK SNOW BRAND CO., LTD. (100.0%)
1-1, Naebocho 6-chome, Higashi-ku, Sapporo-shi
Hokkaido 0650043, JP**

72 Inventor/es:

**MIURA, MARI;
SETO, YASUYUKI;
WATANABE, MASAYUKI y
YOSHIOKA, TOSHIMITSU**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 427 516 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

Potenciador de la proliferación de bacterias acidolácticas, y agente para mejorar la capacidad de supervivencia de bacterias acidolácticas.

5

Campo Técnico

La presente invención se refiere al uso de un agente para potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad de bacterias acidolácticas.

10

Antecedente de la invención

Se han ido descubriendo diversos efectos fisiológicos de las bacterias acidolácticas, tales como el efecto sobre la regulación intestinal, la defensa contra infecciones, la acción inmunoestimulante y la prevención del cáncer, y se ha desarrollado el uso de bacterias acidolácticas o cultivos de las mismas como materias primas para alimentos saludables, fármacos o similares. Además, ciertos estudios recientes han informado de que las funciones mencionadas anteriormente se pueden mejorar suministrando las bacterias acidolácticas en un estado viable al intestino, y la mejora de la viabilidad en el producto tiene una gran ventaja industrial en aplicaciones para Alimentos de Uso Específico para la Salud (FOSHU), aumentando rápidamente la demanda de estos alimentos en los últimos años.

15

20

Sin embargo, la viabilidad de las bacterias acidolácticas depende de la cepa bacteriana, la fase de cultivo, el pH del producto, o la concentración de azúcar utilizada como edulcorante, y es muy difícil mejorar la viabilidad de las bacterias acidolácticas y conservar al mismo tiempo el sabor original del producto. Por tanto, se utilizan envases adecuados con el fin de impedir la permeabilidad al oxígeno todo lo que sea posible, pero los envases tienen el problema de que aumentan los costes. Además, como método para producir yogur de bajo contenido de grasa que produce una baja reducción en las bacterias acidolácticas durante el almacenamiento, se ha desvelado un método para mejorar la tasa de supervivencia de las bacterias acidolácticas mediante la adición de ácido oleico, o una sal o éster del mismo, al medio de fermentación (por ejemplo, véase el Documento de Patente 1). Sin embargo, la mayoría de los compuestos relacionados con el ácido oleico que se pueden utilizar como aditivos alimentarios en Japón tienen olores peculiares, y el uso de estos compuestos da como resultado, inevitablemente, el deterioro del sabor de los productos. Incluso cuando se mejora la viabilidad a costa del deterioro del sabor, la tasa de supervivencia es tan solo del 40%.

25

30

Además, se ha desvelado un método de producción de yogur líquido con baja viscosidad y alta viabilidad mediante la adición de peroxidasa a una mezcla de materias primas (por ejemplo, véase el Documento de Patente 2), pero existe el problema de que la adición de dicho material puede afectar al coste del producto.

35

Por otro lado, para que se produzcan los efectos fisiológicos de las bacterias acidolácticas, es importante mantener un gran número de células viables en el producto. Sin embargo, para aumentar el número de células viables es necesario que transcurra un tiempo de cultivo más prolongado, lo cual perjudica a la productividad. Un método que favorezca el crecimiento de bacterias acidolácticas con el fin de incrementar la concentración de células bacterianas y acorte el tiempo de cultivo, hace posible la producción simple y barata de cultivos de bacterias acidolácticas, lo que es muy importante desde el punto de vista industrial.

40

Se han realizado diversas tentativas como métodos para favorecer el crecimiento de bacterias acidolácticas. Por ejemplo, se ha desvelado la célula Euglena y/o un extracto de la misma (por ejemplo, véase el Documento de Patente 3), un producto obtenido retirando materiales de alto peso molecular de un extracto de pepino (por ejemplo, véase el Documento de Patente 4), un producto de degradación obtenido por tratamiento de la proteína del suero de la leche con proteasa (por ejemplo, véase el Documento de Patente 5), posos de sake (por ejemplo, véase el Documento de Patente 6), una solución purificada del ácido pirolíneo (por ejemplo, véase el Documento de Patente 7) y similares. La adición de estas sustancias puede afectar al sabor del producto y acentúa el problema del aumento del coste debido a la existencia de procesos complejos y engorrosos en la preparación o purificación de los materiales.

45

50

Documento de Patente 1: JP-A-2001-45968
 Documento de Patente 2: JP-A-H10-262550
 Documento de Patente 3: JP-A-H07-99967
 Documento de Patente 4: JP-A-2000-41655
 Documento de Patente 5: JP-A-2004-57047
 Documento de Patente 6: JP-A-2005-151927
 Documento de Patente 7: JP-A-2005-318856

55

60

Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

5 Un material que tenía el efecto de potenciar el crecimiento de una bacteria acidoláctica que se obtenía utilizando una tecnología convencional, tenía problemas tales como un proceso de preparación complejo y engorroso, el alto coste del propio material, y para impedir que el sabor u olor específico se transfiriera a los productos comerciales al producir los productos, solo podía añadirse una cantidad muy pequeña del material al medio para que el sabor de los productos no se viera afectado. Considerando tales problemas, un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente nuevo para potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad de una bacteria acidoláctica que tenga una excelente capacidad de aumentar el crecimiento de la bacteria acidoláctica y que mejore la viabilidad de la bacteria acidoláctica en el producto, que no tenga un efecto adverso sobre el sabor del producto y que tenga un coste de producción bajo.

15 Medios para resolver los problemas

Los inventores de la presente invención han hecho extensos estudios para obtener un agente que potencie el crecimiento y mejore la viabilidad de una bacteria acidoláctica, que tenga una capacidad excelente para potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad de la bacteria acidoláctica y que no tenga efectos adversos sobre su sabor y su coste de producción. Como resultado, los inventores han descubierto que una célula muerta de una bacteria acidoláctica o un cultivo que contiene la célula muerta tiene el efecto de aumentar extraordinariamente la viabilidad de una bacteria acidoláctica. Además, los inventores también han descubierto que la célula muerta de una bacteria acidoláctica o el cultivo que contiene la célula muerta tiene el efecto de potenciar el crecimiento de la bacteria acidoláctica que se quiere cultivar. Es decir, los inventores han descubierto que el uso de la célula muerta de una bacteria acidoláctica o el cultivo que contiene la célula muerta son eficaces para potenciar el crecimiento de la bacteria acidoláctica que se quiere cultivar y para mantener un alto número de células viables en el producto sin afectar al sabor del producto, impidiendo al mismo tiempo el aumento del coste debido al uso de un envase especial y caro que suprima el intercambio de oxígeno todo lo que sea posible, completando de esta manera la presente invención. Es decir, la presente invención proporciona el uso de un agente para potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad de una bacteria acidoláctica, que contiene una célula muerta de una bacteria acidoláctica o un cultivo que contiene la célula muerta como principio activo.

Efecto de la invención

35 Se puede producir un agente para potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad de una bacteria acidoláctica, que tiene el efecto de potenciar extraordinariamente el crecimiento de la bacteria acidoláctica que se quiere cultivar y que también mantiene alto el número de células viables en el producto, por la adición de la célula muerta de una bacteria acidoláctica o el cultivo que contiene la célula muerta durante el cultivo de la bacteria acidoláctica que se quiere cultivar sin que altere el sabor del producto y evitando al mismo tiempo el aumento en el coste debido al uso de un envase especial y caro para suprimir el intercambio de oxígeno todo lo que sea posible.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

45 En la presente invención, la célula muerta de una bacteria acidoláctica se puede preparar: esterilizando un medio donde se ha cultivado la bacteria acidoláctica y recogiendo la célula muerta por filtración, centrifugación o similares, para después concentrarla y secarla si se necesita. De manera alternativa, la célula muerta también se puede preparar recogiendo la célula cultivada y luego esterilizando la célula, para a continuación concentrarla y secarla si se necesita.

50 En la presente invención, el cultivo que contiene la célula muerta de una bacteria acidoláctica se puede preparar: esterilizando un medio, tal como está, donde se ha cultivado la bacteria acidoláctica y posteriormente concentrándolo o secándolo según se requiera. De manera alternativa, el cultivo también se puede preparar filtrando o centrifugando el medio donde se ha cultivado la bacteria acidoláctica para aumentar la concentración de la célula y posteriormente esterilizando la célula resultante, para a continuación concentrarla o secarla si se necesita.

55 En la presente invención, el sustrato del cultivo que contiene la célula muerta de bacterias acidolácticas se puede preparar como un medio, un componente material o una composición, que se ha preparado recientemente añadiendo una célula muerta de una bacteria acidoláctica o un cultivo que contiene la célula muerta y suplementándolo con una fuente nutricional necesaria para el cultivo de microorganismos. No solo se incluye la esterilización por calor sino también un método convencional para inactivar bacterias, tales como la radiación por rayos UV o rayos-γ.

60 El agente para potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad de una bacteria acidoláctica de la presente invención se utiliza como una solución acuosa tal cual o se usa en estado de solución concentrada o en polvo, como se describe anteriormente. El suero de mantequilla ácido que se obtiene en la fabricación de mantequilla fermentada que se produce por fermentación utilizando una bacteria acidoláctica, se puede utilizar en estado de una solución concentrada o en polvo que contiene la célula muerta de la bacteria acidoláctica. También puede utilizarse el material que contiene una célula de una bacteria acidoláctica que se utilizó como material de partida, así como un

cultivo. También puede utilizarse un material que contenga una célula muerta de una bacteria acidoláctica que se usó como material de partida, tal como el suero de queso que se obtiene en la producción de quesos producidos por fermentación utilizando una bacteria acidoláctica, así como un cultivo que contenga una célula muerta de una bacteria acidoláctica. La célula bacteriana y el cultivo, si se necesita, se someten a concentración o secado, durante los cuales se puede obtener una célula muerta proporcionando una etapa de la esterilización.

El agente para potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad de una bacteria acidoláctica que contiene una célula muerta de una bacteria acidoláctica, un cultivo que contiene la célula muerta, o un suero de mantequilla ácido que contiene la célula muerta como principio activo, se pueden utilizar tal cual, o se puede preparar una nueva composición como sustrato para cultivo tal como un medio, un componente material, o una composición, suplementado con una fuente nutricional necesaria para el cultivo de microorganismos añadiéndola a otro componente nutricional. El agente para potenciar el crecimiento y para mejorar la viabilidad de una bacteria acidoláctica que contiene una célula muerta de una bacteria acidoláctica, un cultivo que contiene la célula muerta, o un suero de mantequilla ácido que contiene la célula muerta como principio activo puede prepararse como leche concentrada o leche en polvo añadiéndolo a la leche o a la leche desnatada y concentrando y secando el producto, según se necesite. Además, el agente puede utilizarse por mezcla de polvo con polvo con una pluralidad de productos lácteos en polvo.

Las realizaciones de la presente invención pueden incluir: el agente para potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad de una bacteria acidoláctica se puede añadir directamente como tal a la mezcla de fermentación para obtener un producto de leche fermentada; y el agente para potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad de una bacteria acidoláctica se puede utilizar añadiéndolo a un cultivo seminal o fermento de la bacteria acidoláctica que se va a cultivar.

En la fermentación para un determinado producto, la célula muerta que se obtiene como se expuso anteriormente se puede añadir directamente a una mezcla de fermentación, la mezcla se esteriliza, y se añade un fermento de bacteria acidoláctica a la mezcla esterilizada para comenzar la fermentación y de esta manera preparar un producto de leche fermentada; o la célula muerta que se obtiene como se expuso anteriormente se puede añadir a medio de leche desnatada que es el que se usa convencionalmente en el cultivo de bacterias acidolácticas, se esteriliza la mezcla, se inocula una bacteria acidoláctica que se va a cultivar en la mezcla, cultivándose la bacteria para producir un cultivo seminal o un fermento, y después, el cultivo seminal o el fermento se añade a la mezcla de fermentación esterilizada para empezar la fermentación, y de esta manera preparar un producto de leche fermentada.

Los efectos se pueden conseguir haciendo que la célula bacteriana que sirve como agente para potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad de una bacteria acidoláctica se encuentre en una concentración del 0,001% p.p o más por contenido de sólidos.

La bacteria acidoláctica utilizada como célula muerta de la presente invención incluye bacterias acidolácticas con forma de bacilo tales como el género *Lactobacillus* y *Weissella*, bacterias acidolácticas con forma de coco tales como el género *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. Cualquier bacteria acidoláctica es eficaz, y se puede utilizar una pluralidad de bacterias acidolácticas en combinación. Como bacterias acidolácticas que se utilizan con el fin de potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad, se puede utilizar cualquier bacteria acidoláctica de las que se utilizan normalmente en la producción de productos lácteos fermentados, tales como *Lactobacillus* y *Lactococcus*.

Los efectos se pueden conseguir tanto si la bacteria acidoláctica utilizada como célula muerta de la presente invención y la bacteria acidoláctica a la que se va a potenciar su crecimiento y a aumentar su viabilidad son iguales como si son diferentes.

Los resultados de un ensayo de fermentación revelan que un medio que contiene la célula muerta de la presente invención es extraordinariamente excelente en capacidad de fermentación de la bacteria acidoláctica y aumenta extraordinariamente la viabilidad de la bacteria acidoláctica durante el almacenamiento cuando se compara con un medio general de leche desnatada.

Como se describe anteriormente, el crecimiento de una bacteria acidoláctica, la producción de ácido por una bacteria acidoláctica y la viabilidad de una bacteria acidoláctica en el producto pueden mejorarse fácilmente añadiendo la célula bacteriana de la presente invención, y no se necesitan envases especiales para limitar la penetración del oxígeno tanto como sea posible y no es necesario mantener el pH en torno a la neutralidad. Por tanto, el producto se puede producir en poco tiempo sin alterar el sabor original del producto y a la vez que se impide el aumento del coste. No se ha informado de ningún caso en el que la viabilidad de una bacteria acidoláctica se haya mejorado y el crecimiento de una bacteria acidoláctica se haya potenciado en el producto utilizando una célula muerta de una bacteria.

De aquí en adelante, la presente invención se describirá en detalle por medio de Ejemplos. Sin embargo, los siguientes Ejemplos pretenden describir la presente invención y la presente invención no se limita a la descripción de los Ejemplos.

[Ejemplo 1]

Se cultivaron por separado *Lactobacillus casei* ATCC334, *Lactobacillus acidophilus* JCM1132, *Lactobacillus helveticus* JCM1120, *Lactobacillus plantarum* NCFB1752, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* ATCC19435,

Leuconostoc mesenteroides subesp. *mesenteroides* JCM6124, y *Pediococcus pentosaceus* JCM5890 en caldo MRS (fabricado por Difco), y las células bacterianas se recogieron por centrifugación. Luego se añadió agua para diluir las células hasta los volúmenes de líquido iniciales, y se llevó a cabo una centrifugación de nuevo para recoger las células bacterianas. Las células lavadas resultantes se esterizaron y después se liofilizaron o se secaron por pulverización para preparar los polvos de células muertas de la presente invención.

La capacidad de producir ácido y los ensayos de viabilidad se realizaron utilizando los polvos de células muertas. Los polvos de células muertas se añadieron respectivamente a una mezcla de fermentación (16% de leche desnatada + 7% de azúcar isomerizada) hasta alcanzar una concentración del 0,01%, y las mezclas se esterizaron a 95 °C durante 90 minutos. La mezcla de fermentación (16% de leche desnatada + 7% de azúcar isomerizada) se utilizó como control (CTR). Se inoculó *Lactobacillus casei* ATCC334 en cada mezcla de fermentación a una concentración del 0,5%, después de lo cual la mezcla se cultivó a 37 °C hasta que la acidez alcanzó el 2,1%. Los cultivos se mezclaron con azúcar isomerizada para producir bebidas de yogur con un BRIX del 15%. Las bebidas de yogur se almacenaron a 15 °C, y se hizo el recuento de las células de la bacteria acidoláctica los días 0, 7, 14 y 21. Además, con el fin de comparar la capacidad de producción de ácido, se determinó la acidez durante la fermentación a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas después del almacenamiento.

El efecto de la adición de las células muertas se mostró en la Fig. 1 en cuanto a la producción de ácido por *Lactobacillus casei*, y en la Fig. 2 en cuanto a la viabilidad de *Lactobacillus casei*, respectivamente. Los resultados revelan, como se muestra en la Fig. 1, que la producción de ácido ha mejorado en todas las muestras en las que se añadieron las células muertas. Además, como se muestra en la Fig. 2, los cambios en el número de células bacterianas durante el almacenamiento de los productos muestran que la viabilidad ha mejorado extraordinariamente en todas las muestras en las que se añadieron células muertas cuando se comparan con el control.

[Ejemplo 2]

Los polvos de células muertas de la presente invención se prepararon de la misma manera que se describió en el Ejemplo 1. El ensayo de capacidad de producción de ácido y el ensayo de viabilidad se realizaron utilizando polvo de células muertas de *Lactobacillus helveticus* JCM1120 y *Pediococcus pentosaceus* JMC5890. Los polvos de células bacterianas se añadieron a una mezcla de fermentación (16% de leche desnatada + 0,5% de extracto de levadura + 7% de azúcar isomerizada) hasta una concentración del 0,01%, y las mezclas se esterizaron a 95 °C durante 90 minutos. La mezcla de fermentación (16% de leche desnatada + 0,5% de extracto de levadura + 7% de azúcar isomerizada) se utilizó como control. Se inocularon *Lactobacillus acidophilus* JMC1132 en cada mezcla de fermentación a una concentración del 3%, y se cultivó la mezcla a 37 °C hasta que la acidez alcanzó el 1,5%. Los cultivos se mezclaron con azúcar isomerizada para producir bebidas de yogur con un BRIX del 15%. Las bebidas de yogur se almacenaron a 15 °C, y se hizo el recuento de las células en los días 0, 7, 14 y 21. Además, con el fin de comparar la capacidad de producción de ácido, se determinó la acidez durante la fermentación a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas tras el almacenamiento.

El efecto de la adición de las células muertas sobre la producción de ácido por *Lactobacillus acidophilus* se muestra en la Fig. 3, mientras que el efecto de la adición de células muertas sobre la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* se muestra en la Fig. 4. Los resultados revelan que, como se muestra en la Fig. 3, la producción de ácido mejora en todas las muestras a las que se añadieron células muertas. Además como se muestra en la Fig. 4, los cambios en el número de células bacterianas durante el almacenamiento de los productos muestran que la viabilidad mejora extraordinariamente en todas las muestras a las que se añadieron las células muertas en comparación con el control.

[Ejemplo 3]

En la producción de una mantequilla fermentada obtenida por fermentación utilizando tres cepas bacterianas de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* ATCC19435, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* ATCC19257, y *Lactococcus lactis* subesp. *diacetylactis* ATCC11007, se obtuvo como subproducto un suero de mantequilla ácido que contenía células de las bacterias del fermento mencionadas anteriormente. El suero de mantequilla ácido se mezcló con leche desnatada a una concentración del 4%, y la mezcla se esterilizó, se concentró y se secó por pulverización para preparar leche desnatada que contenía suero de mantequilla ácido que contenía las células muertas, que son un agente para potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad de una bacteria acidoláctica de la presente invención.

La leche desnatada que contenía el suero de mantequilla ácido (16%) y que contenía las células muertas, se mezcló con azúcar isomerizada (7%) para preparar una mezcla de fermentación, y la mezcla se esterilizó a 95 °C durante 90 minutos. Como control, se mezcló leche desnatada (16%) con azúcar isomerizada (7%) para preparar una mezcla de fermentación. Se inoculó *Lactobacillus casei* ATCC334 en las mezclas de fermentación respectivas a una concentración del 0,5% y después se cultivó a 37 °C hasta que la acidez alcanzó el 2,1%. Los cultivos resultantes se mezclaron con azúcar isomerizada para preparar bebidas de yogur con un BRIX del 15%. Las bebidas de yogur se almacenaron a 15 °C, y se hizo el recuento de las células los días 0, 7, 14 y 21 tras el almacenamiento. Además, con el fin de comparar la capacidad de producción de ácido, se determinó la acidez durante la fermentación a lo largo del tiempo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas tras el almacenamiento.

La Fig. 5 ilustra el efecto de la adición de suero de mantequilla ácido que contiene células muertas sobre la producción de ácido por *Lactobacillus casei*, y la Fig. 6 ilustra el efecto de la adición de suero de mantequilla ácido

que contiene las células muertas sobre la viabilidad de *Lactobacillus casei*. Los resultados revelan que, como se muestra en la Fig. 5, la producción de ácido está ligeramente mejorada en la muestra a la que se añadió el suero de mantequilla ácido que contenía las células muertas. Además, como se muestra en la Fig. 6, los cambios en el número de células bacterianas durante el almacenamiento de los productos muestra que la viabilidad ha mejorado extraordinariamente en la muestra a la que se añadió la suero de mantequilla ácido que contenía las células muertas en comparación con el control.

[Ejemplo comparativo 1]

10 El suero de mantequilla obtenido como subproducto de la mantequilla se mezcló con leche desnatada a una concentración del 4%, y la mezcla se esterilizó, se concentró, y luego se secó por pulverización para preparar leche desnatada que contenía suero de mantequilla. El método convencional de producción de mantequilla no tiene un proceso de fermentación, por lo que el suero de mantequilla producido como subproducto no contenía células bacterianas.

15 La leche desnatada que contenía suero de mantequilla (16%) se mezcló con azúcar isomerizada (7%) para preparar una mezcla de fermentación, y la mezcla se esterilizó a 95 °C durante 90 minutos. Como control, se mezcló leche desnatada (16%) con azúcar isomerizada (7%) para preparar una mezcla de fermentación. Se inoculó *Lactobacillus casei* ATCC334 en las respectivas mezclas de fermentación a una concentración del 0,5% y se cultivó a 37 °C hasta que la acidez alcanzó el 2,1%. Los cultivos resultantes se mezclaron con azúcar isomerizada para preparar bebidas de yogur con un BRIX del 15%, respectivamente. Las bebidas de yogur se almacenaron a 15 °C, y se hizo el recuento de las células los días 0, 7, 14 y 21 tras el almacenamiento. Además, con el fin de comparar la capacidad de producción de ácido, se determinó la acidez durante la fermentación a lo largo del tiempo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas después del almacenamiento.

20 La Fig. 7 ilustra el efecto de la adición de suero de mantequilla sobre la producción de ácido por *Lactobacillus casei*, y la Fig. 8 ilustra el efecto de la adición de suero de mantequilla sobre la viabilidad de *Lactobacillus casei*.

25 Los resultados revelan que, como se muestra en la Fig. 7, la producción de ácido mejora ligeramente en la muestra a la que se añadió el suero de mantequilla. Además, como muestra la Fig. 8, los cambios en el número de células bacterianas durante el almacenamiento de los productos muestran que el número de células bacterianas disminuyó en la muestra a la que se había añadido el suero de mantequilla así como en el control.

30 [Ejemplo 4]

El polvo de células bacterianas de la presente invención se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1.

35 El ensayo de capacidad para producir ácido y el ensayo de viabilidad se realizaron utilizando el polvo de células bacterianas. El polvo de células bacterianas se añadió a leche desnatada a una concentración del 0,007% para preparar leche desnatada que contenía células muertas como agente para potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad de una bacteria acidoláctica de la presente invención. La leche desnatada que contenía células muertas (16%) se mezcló con azúcar isomerizada (7%) para preparar una mezcla de fermentación, y la mezcla se esterilizó a 95 °C durante 90 minutos. Como control, se mezcló leche desnatada (16%) con azúcar isomerizada (7%) para preparar una mezcla de fermentación. Se inoculó *Lactobacillus casei* ATCC334 en las respectivas mezclas de fermentación a una concentración del 0,5% y se cultivó a 37 °C hasta que la acidez alcanzó el 2,1%. Los cultivos resultantes se mezclaron con azúcar isomerizada para preparar bebidas de yogur con un BRIX del 15%.

40 Las bebidas de yogur se almacenaron a 15 °C, y se hizo el recuento de las células los días 0, 7, 14 y 21 tras el almacenamiento. Los resultados revelan que en la leche desnatada a la que se había añadido el polvo de células bacterianas mejoró la producción de ácido y mejoró extraordinariamente la viabilidad en comparación con la leche desnatada que no contenía aditivo como control.

Breve descripción de los dibujos

50 La Fig. 1 ilustra el efecto de la adición de células muertas sobre la producción de ácido por *Lactobacillus casei* (Ejemplo 1).

La Fig. 2 ilustra el efecto de la adición de células muertas sobre la viabilidad de *Lactobacillus casei* (Ejemplo 1).

La Fig. 3 ilustra el efecto de la adición de células muertas sobre la producción de ácido por *Lactobacillus acidophilus* (Ejemplo 2).

55 La Fig. 4 ilustra el efecto de la adición de células muertas sobre la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* (Ejemplo 2).

La Fig. 5 ilustra el efecto de la adición de suero de mantequilla ácido que contiene células muertas sobre la producción de ácido por *Lactobacillus casei* (Ejemplo 3).

60 La Fig. 6 ilustra el efecto de la adición de suero de mantequilla ácido que contiene células muertas sobre la viabilidad de *Lactobacillus casei* (Ejemplo 3).

La Fig. 7 ilustra el efecto de la adición de suero de mantequilla sobre la producción de ácido por *Lactobacillus casei* (Ejemplo comparativo 1).

La Fig. 8 ilustra el efecto de la adición de suero de mantequilla sobre la viabilidad de *Lactobacillus casei* (Ejemplo comparativo 1).

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una célula muerta de una bacteria acidoláctica como principio activo en un método para potenciar el crecimiento y mejorar la viabilidad de una bacteria acidoláctica en una composición a la que se ha añadido dicha célula muerta.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula muerta está en forma de un cultivo que contiene una célula muerta de una bacteria acidoláctica.
- 10 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula muerta está en forma de suero de mantequilla ácido que contiene una célula muerta de una bacteria acidoláctica.
- 15 4. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la célula muerta de una bacteria acidoláctica es una célula muerta de uno o más géneros seleccionados de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* y *Enterococcus*.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que el suero de mantequilla ácido está en forma concentrada o en polvo.

Fig. 1

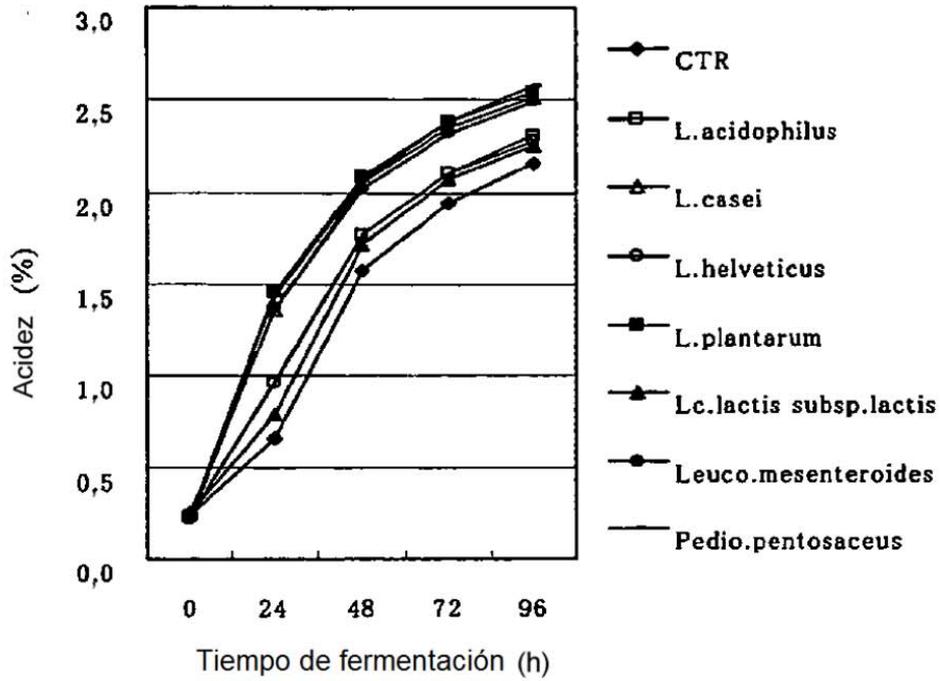


Fig. 2

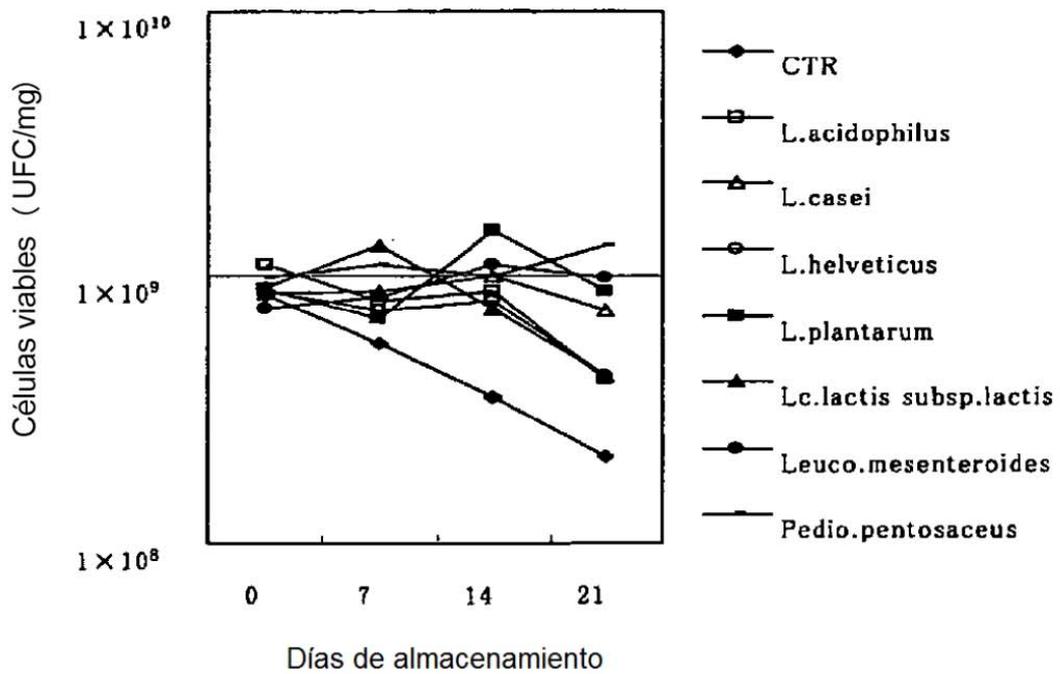


Fig. 3

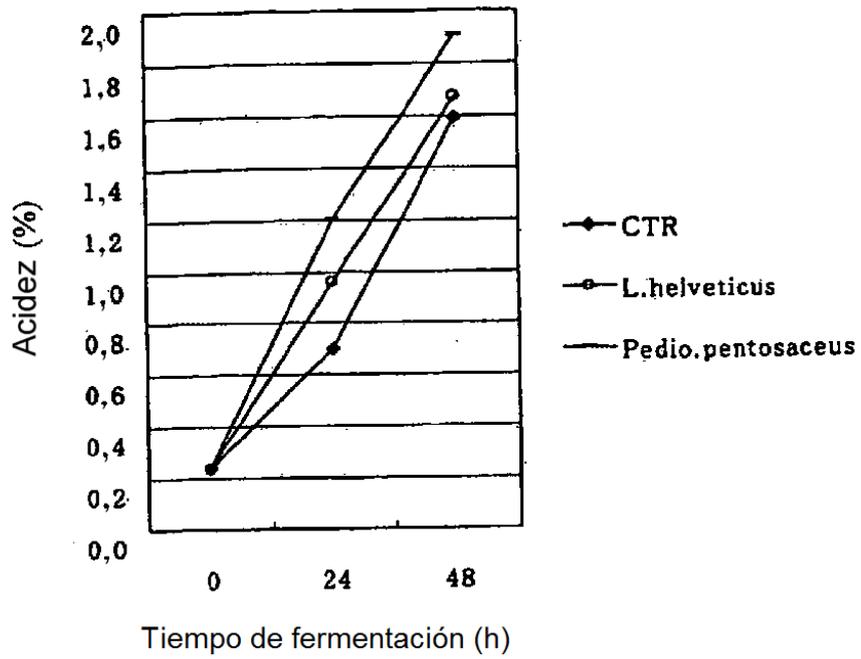


Fig. 4

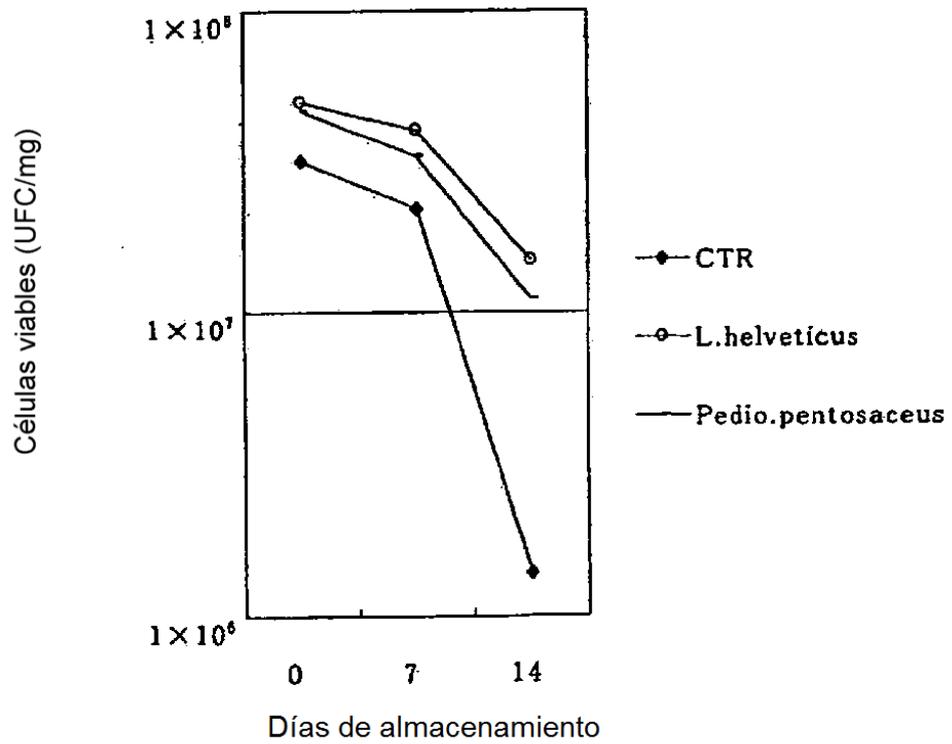


Fig. 5

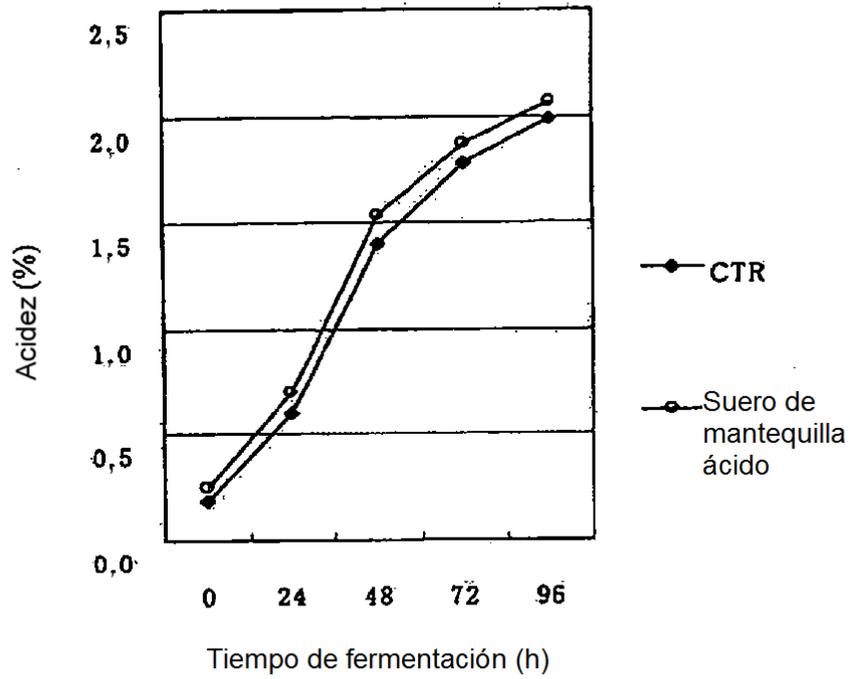


Fig. 6

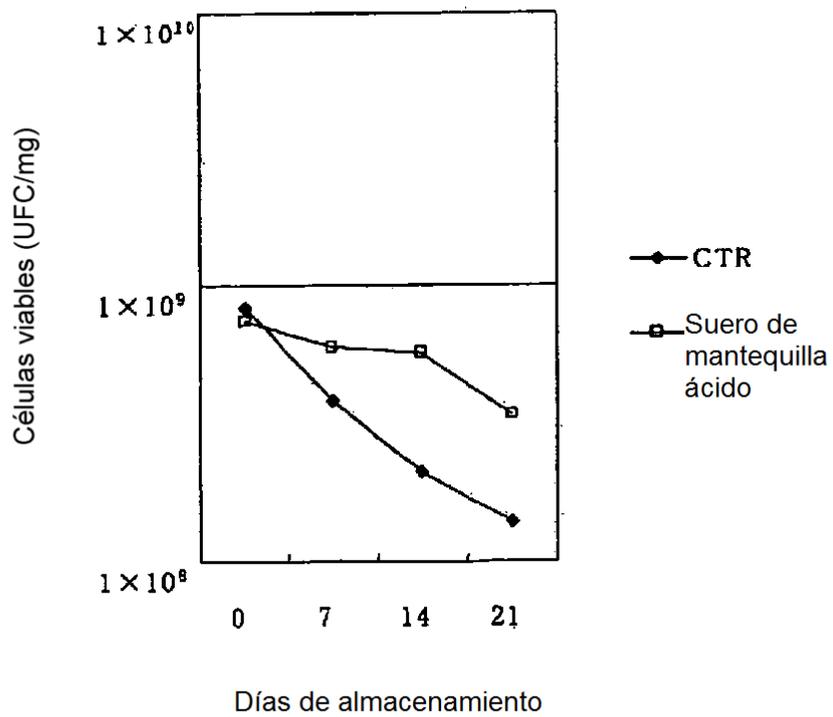


Fig. 7

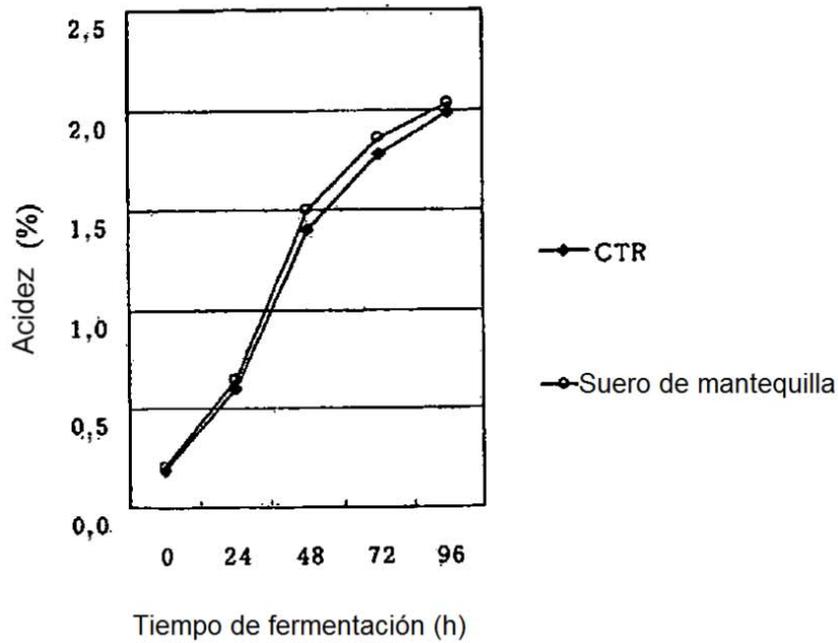


Fig. 8

