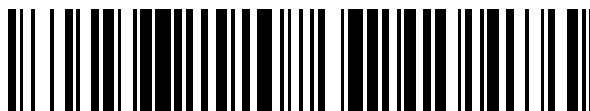


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 487 653**

51 Int. Cl.:

A23C 9/123 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2011 E 11726953 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2568815**

54 Título: **Fermentación sinérgica de Lactobacillus rhamnosus y Lactobacillus paracasei subsp. paracasei**

30 Prioridad:

12.05.2010 WO PCT/IB2010/001400

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

22.08.2014

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17, Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DAVAL, CHRISTOPHE;
DEBRU, FRANÇOIS y
LAVERGNE, DAMIEN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 487 653 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

Fermentación sinérgica de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

La presente invención hace referencia a un método de fermentación que implica el crecimiento sinérgico de al menos dos cepas de *Lactobacillus*.

5 Los métodos de fermentación mediante bacterias ácido lácticas han sido desarrollados durante siglos. En la fermentación láctica, la conversión por parte de las bacterias lácticas de azúcares fermentables en energía que permite el crecimiento bacteriano tiene como resultado la producción de ácido láctico. La fermentación mediante bacterias ácido lácticas es ampliamente utilizada para el procesamiento de alimentos.

10 Durante mucho tiempo, se han atribuido beneficios para la salud a algunos productos alimenticios fermentados tales como el yogurt, que van desde una mejora en la captación/disponibilidad de nutrientes debido a la fermentación, hasta efectos específicos atribuidos a las propias bacterias.

15 Más recientemente, se han realizado muchos estudios clínicos para investigar los beneficios para la salud de algunas cepas productoras de ácido láctico. Estas cepas son denominadas, generalmente, como probióticos. De acuerdo a la definición adoptada en la actualidad por la FAO/OMS, los probióticos son: "microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud en el huésped". La mayoría de los microorganismos utilizados como probióticos son bacterias ácido lácticas, en particular cepas del género *Lactobacillus* y *Bifidobacteria*.

20 En un principio, se creía que los probióticos afectaban de manera beneficiosa al huésped, principalmente mejorando su equilibrio microbiano intestinal, mediante la competición con patógenos y bacterias productoras de toxinas. Hoy en día, se están investigando y documentando efectos específicos beneficiosos para la salud que incluyen alivio de enfermedades intestinales inflamatorias crónicas, prevención y tratamiento de diarrea inducida por patógenos, infecciones urogenitales, y enfermedades atópicas. Estos efectos han sido atribuidos a las propias bacterias, y además a los metabolitos que éstas producen durante la fermentación.

25 Varios estudios están comenzando a asociar diferentes cepas de probióticos, pertenecientes incluso a la misma especie, con diferentes beneficios para la salud. Por ejemplo, debido a que el intestino humano es el hogar de aproximadamente 400-500 tipos de microorganismos que pueden poblar diferentes áreas del tracto digestivo, se cree que este ambiente diverso puede beneficiarse de múltiples cepas de probióticos.

30 Por tanto, están emergiendo investigaciones sobre los beneficios para la salud adicionales de las composiciones que contienen múltiples especies o cepas de probióticos en comparación con aquellas que contienen una única cepa (TIMMERMAN et al., Int J Food Microbiol, 96, 219-33, 2004; WILLIAMS et al., Aliment Pharmacol Ther, 2008). WO2005095656 y VERDENELLI et al. (Eur J Nutr, 48, 355-63, 2009), describen un método para seleccionar cepas de probióticos, que incluyen una etapa de análisis de sus propiedades de adhesión a las células intestinales en presencia de otras cepas bacterianas; estos documentos revelan más específicamente dos cepas: *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 y *Lactobacillus paracasei* IMC 502 seleccionadas por este método, y proponen utilizarlas en
35 administración conjunta para la mejora o restauración de la microflora intestinal.

40 Las composiciones probióticas de múltiples cepas se obtienen de manera clásica cultivando individualmente cada cepa de probióticos para ser utilizada en la composición bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de dicha cepa, y añadiéndolas al producto final después de que se haya completado su crecimiento. Tal proceso tiene la desventaja de requerir un gran consumo de tiempo, y la necesidad de utilizar una cuba de fermentación para cada cepa de probióticos tiene como resultado unos costes de producción elevados. Además, en la mayoría de los casos las cepas de probióticos son separadas de su medio de cultivo antes de añadirlas al producto final. Por tanto, los metabolitos que liberan en el medio durante su fermentación, y que pueden participar en el beneficio para la salud, no se encuentran ya presentes en el producto final.

45 Sin embargo, el co-cultivo de diversas especies o cepas de bacterias suscita problemas, debido a la posible competición y/o interacciones entre estas bacterias. Por ejemplo, si las cepas con una tasa de crecimiento diferente se co-cultivan, habitualmente la cepa de crecimiento más rápido presentará un sobre-crecimiento con respecto a la otra. Además, los metabolitos producidos por cada cepa pueden tener efectos estimulantes o, a la inversa, efectos inhibidores sobre una o más de las otras cepas del co-cultivo.

50 La existencia de efectos sinérgicos o bien antagónicos, durante una fermentación, entre bacterias utilizadas en la producción de alimentos clásicos se conoce bien. Por ejemplo, la clásica "simbiosis para el yogurt" es un co-cultivo de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. La sinergia entre estas dos bacterias tiene como resultado la aceleración de la multiplicación de ambas, y de la acidificación de la leche. Ejemplos del efecto antagónico de las combinaciones de diferentes bacterias pueden encontrarse en el arte previo (*E. coli* and *S. thyphimurium*:

TIMMERMAN et al., Int J Food Microbiol, 96, 219-33, 2004, *Aspergillus*: BUENO-DANTE et al, Journal of food protection, 69, 2544, oct 2006), estos implican la producción de moléculas como bacteriocina, antibióticos y otros productos metabólicos.

5 Actualmente, se conoce poco acerca de las interacciones entre las especies o cepas del género *Lactobacillus*, e incluso menos sobre los probióticos de *Lactobacillus*. Se ha informado (LEE, Process Biochemistry, 40, 1559-64, 2005) que en el campo de la producción de ácido láctico, el cultivo mixto de lactobacilos puede ser más efectivo que un único cultivo, pero de acuerdo al entender del solicitante, no se ha presentado ninguna descripción de un co-cultivo sinérgico de bacterias de la subespecie *Lactobacillus casei/paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*.
 10 WO2005095656 y VERDENELLI et al. (Eur J Nutr, 48, 355-63, 2009) no describen el co-cultivo de dos cepas *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 y *Lactobacillus paracasei* IMC 502.

15 Los inventores han observado, de manera sorprendente, que cuando las cepas de *Lactobacillus* de la especie *paracasei* y *rhamnosus* se co-cultivan en un medio de fermentación láctea, tiene lugar un crecimiento sinérgico de estas bacterias. Como resultado, de un tiempo de fermentación determinado, el pH del medio fermentado es más ácido, y/o de la biomasa bacteriana en el co-cultivo es igual y generalmente mayor que en los monocultivos de cada cepa individual.

La invención por lo tanto proporciona un proceso para la preparación de un producto lácteo fermentado que contiene dos o más cepas de *Lactobacillus*, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 cepas de *Lactobacillus*, en donde dicho proceso comprende:

- a) inocular un medio de fermentación láctea con dichas cepas de *Lactobacillus*;
- 20 b) fermentar el medio inoculado incubándolo a una temperatura adecuada para el crecimiento de dichas cepas, hasta que alcanza un pH diana deseado o hasta que la población bacteriana alcanza un valor diana deseado;
- c) detener la fermentación y recuperar el producto fermentado;

25 en donde las cepas de *Lactobacillus* se seleccionan de entre las cepas de la especie *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, y/o cepas de la especie *Lactobacillus rhamnosus*, y comprenden al menos una cepa seleccionada de entre *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-3689, y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690.

30 Un medio de fermentación láctea se define en el presente documento como un medio líquido a base de leche. Cualquier fuente de leche animal o vegetal podría ser considerada. Sin embargo, se prefiere la leche de vaca. Puede ser, por ejemplo, leche entera, parcial o totalmente desnatada, reconstituida opcionalmente a partir de leche en polvo. Puede además consistir en una fracción de la leche, por ejemplo suero de leche, o mezclas de dos o más fracciones de la leche. Preferiblemente, dicho medio será utilizado sin complementación adicional. Sin embargo, puede complementarse de manera opcional con ingredientes tales como azúcares, espesantes, etc, siempre que estos ingredientes no interfieran en el crecimiento de una o más de las cepas de *Lactobacillus* co-cultivadas, y siempre que sean adecuadas para el consumo humano o animal. En particular, en caso de que una o más de las
 35 cepas de *Lactobacillus* no puedan fermentar la lactosa (por ejemplo en el caso de *Lactobacillus rhamnosus* LGG), un azúcar que pueda ser asimilado por dicha cepa (por ejemplo, glucosa), puede ser añadido al medio de fermentación láctea, preferiblemente en una concentración de hasta 10%, preferiblemente del 1% al 10%.

40 Dicho medio se esteriliza habitualmente antes de la inoculación con las cepas de *Lactobacillus*. La esterilización se lleva a cabo mediante métodos clásicos conocidos, tales como tratamiento de calor. El pH del medio de cultivo antes de la inoculación con las bacterias es preferiblemente de 5,5 a 7, preferiblemente de aproximadamente 6,5.

Cualquier combinación de cepas de las especies *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* y/o cepas de las especies *Lactobacillus rhamnosus* puede ser utilizada para inocular el medio. De acuerdo a la invención, una combinación tal debe comprender al menos una cepa seleccionada entre *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-3689, y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690.

45 Por ejemplo, se pueden utilizar dos o más cepas de una única especie, o combinar una, dos, o más cepas de una de las especies con una, dos, o más cepas de las otras especies. Generalmente, al menos una de dichas cepas tiene propiedades probióticas o potencialmente probióticas. Preferiblemente, al menos dos, y de manera aún más preferible todas las cepas utilizadas para inocular el medio tienen propiedades probióticas o potencialmente probióticas.

50 Se ha informado sobre propiedades probióticas de cepas encontradas en ambas especies *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*.

Ejemplos de cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* en las que se han observado propiedades probióticas incluyen:

- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518, divulgado por ejemplo en EP0794707;

- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM 1-3689, divulgado por ejemplo en WO2009122042;

5 - *Lactobacillus casei* Shirota (que en realidad pertenece a la especie *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*);

Ejemplos de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* en las que se han observado propiedades probióticas incluyen:

- *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-3690, divulgado en WO2009130423

- *Lactobacillus rhamnosus* LGG (ATCC 53103), divulgado en US4839281

10 - *Lactobacillus rhamnosus* HN001, divulgado por ejemplo en WO9910476.

Las combinaciones de cepas preferidas son aquellas que incluyan al menos dos de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-3689, y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690. Por ejemplo, éstas pueden incluir *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518 con *Lactobacillus rhamnosus* subsp. *paracasei* CNCM I-3689; *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518 con *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-3690; *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-3689 con *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690.

Una combinación de cepas particularmente preferida incluye las tres cepas *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-3689, y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690.

20 Estas combinaciones pueden además incluir otras cepas probióticas o no-probiólicas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* y/o *Lactobacillus rhamnosus*.

Generalmente, las cepas de *Lactobacillus* se inoculan en el medio de fermentación láctea, en una cantidad total de al menos 10^6 CFU/ml, preferiblemente de 5×10^6 a 1×10^8 CFU/ml, más preferiblemente de 1×10^7 a 5×10^7 CFU/ml, y aún más preferiblemente de aproximadamente 2×10^7 CFU/ml.

25 La proporción de cada cepa en la población total de *Lactobacillus* inoculada, será elegida en función de la proporción que se desea obtener en el producto fermentado final. Habitualmente, cada cepa individual debería representar al menos el 1% de la población total inoculada. Puede, por lo tanto, representar hasta un 99% en el caso de un co-cultivo de dos cepas, hasta el 98% en el caso de un co-cultivo de tres cepas, y así sucesivamente. Preferiblemente, cada cepa individual representará al menos un 5%, más preferiblemente al menos un 10% de la población total.

Las cepas individuales pueden ser inoculadas por separado, o pueden mezclarse previamente a la inoculación.

30 Tras la inoculación del medio lácteo, la fermentación se realiza bajo las condiciones habituales adecuadas para el crecimiento de las cepas bacterianas inoculadas.

Tanto las *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* como *Lactobacillus rhamnosus* son bacterias mesófilas. Por lo tanto, la temperatura de fermentación será generalmente de 30°C a 42°C, preferiblemente de 34°C a 38°C, y más preferiblemente aún aproximadamente a 37°C.

35 La fermentación se detiene cuando el medio de fermentación alcanza el pH diana deseado o cuando la población total de *Lactobacillus* alcanza el valor diana deseado.

Por lo general, el pH diana será de 3,7 a 4,2, preferiblemente de 3,75 a 3,9, más preferiblemente de aproximadamente 3,8.

40 El valor diana para la población total de *Lactobacillus* es, en general, de la menos 5 veces, preferiblemente de al menos 10 veces, aún más preferiblemente de al menos 100 veces, y habitualmente hasta 1000 veces la población inoculada. Generalmente, la fermentación se detiene cuando la población bacteriana es de al menos 10^8 CFU/ml, preferiblemente de al menos 10^9 CFU/ml.

El tiempo de fermentación para alcanzar el pH diana o la población de *Lactobacillus* diana depende de las condiciones de fermentación (que incluyen en particular el tamaño de la población inoculada, la composición del

5 medio de fermentación láctea, y/o la temperatura de fermentación). Cuando se utiliza una combinación de cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* y/o *Lactobacillus rhamnosus*, el tiempo de fermentación es más reducido. Puede ser, por ejemplo, al menos un 1% más reducido, preferiblemente al menos un 5% más reducido, preferiblemente al menos un 10% más reducido, por ejemplo de 1% a 80% o de 5% a 50%, o de 10 a 40% más reducido que el tiempo de fermentación que se necesita para alcanzar el mismo pH diana o la misma población de *Lactobacillus*, con una cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus* cultivada individualmente bajo las mismas condiciones de fermentación. Un tiempo de fermentación más reducido, de un 1% a un 10% se considera una ligera sinergia. Un tiempo de fermentación más reducido, de al menos un 10% se considera una sinergia elevada.

10 En general, las condiciones de fermentación se elegirán de manera que el tiempo de fermentación sea de 10 a 120 horas, preferiblemente de 25 a 75 horas, y preferiblemente de manera que el tiempo de fermentación no exceda 50 horas.

15 La invención además abarca un producto lácteo fermentado obtenible mediante el proceso de la invención. Este producto contiene habitualmente, además de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus*, cepas utilizadas para la fermentación, el medio lácteo fermentado. Por lo tanto, contiene todos los metabolitos producidos por las cepas durante la fermentación, incluyendo los metabolitos resultantes de las interacciones entre las cepas co-cultivadas (por ejemplo, los metabolitos liberados por una de las cepas, que han sido metabolizados adicionalmente por otra cepa).

20 Este producto lácteo fermentado puede ser utilizado como tal, en particular como un producto alimenticio, o un complemento nutricional.

También puede ser añadido a un producto alimenticio, en particular a un producto lácteo tal como un yogurt, o a una composición nutricional, farmacéutica o cosmética. La composición alimenticia, además de las composiciones nutricionales, farmacéuticas o cosméticas que comprenden dicho producto lácteo fermentado, es también parte de la invención.

25 La presente invención se ilustra en mayor detalle mediante las descripciones adicionales que siguen a continuación, las cuales hacen referencia a ejemplos no limitativos de la ejecución del proceso de la invención.

Ejemplo1. Crecimiento sinérgico de dos o tres cepas de *Lactobacillus*.

Materiales y métodos:

1) Cepas:

30 Se estudiaron las siguientes cepas:

Cepas de *Lactobacillus rhamnosus*:

- Rhamno A
- Rhamno B
- HN001

35 • CNCM I-3690

Cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

- Paracasei A
- Paracasei B
- CNCM I-1518

40 • CNCM 1-3689

HN001, CNCM 1-3690, CNCM 1-1518 y CNCM 1-3689 son cepas probióticas conocidas, mientras que Rhamno A, Rhamno B, Paracasei A y Paracasei B son cepas comunes elegidas al azar.

2) Criotubos:

Las cepas se conservaron en criotubos (2ml) que se prepararon previamente de acuerdo al protocolo que sigue a continuación.

5 El cultivo de la cepa se realizó con un caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS) y se incubó 16 horas a 37°C; se añadió DMSO esterilizado (5,3%) para mejorar la estabilidad de la cepa durante la fase de almacenamiento. El criotubo se congeló con vapor de nitrógeno durante 30 min. La pureza de la cepa se revisó con galería API 50CH + azul de metileno. Los criotubos se almacenaron a -80°C.

3) Subcultivo con medio de crecimiento:

10 Cada cepa se cultivó individualmente. Los criotubos se descongelaron bajo condiciones estériles y se añadió 1 ml (1%) de cultivo a 100 ml de caldo MRS estéril utilizado como medio de crecimiento, y se incubaron a 37°C hasta que el cultivo alcanza la fase estacionaria (pH alrededor de 4,00). El subcultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se reemplazó por tripton-sal.

4) Fermentación en el medio lácteo:

15 El medio lácteo contiene leche desnatada en polvo (120 g) y agua destilada (930 g). Después de 1 hora de rehidratación, la mezcla se esterilizó mediante autoclavización durante 15 min a 115°C.

20 Las bacterias de los subcultivos fueron inoculadas a una población bacteriana total de 2×10^7 células/ml en 200 ml de medio lácteo. Cuando se utilizaron 2 cepas, cada cepa representó 1/2 de la población bacteriana total; cuando se utilizaron 3 cepas cada cepa representó 1/3 de la población bacteriana. La fermentación se llevó a cabo a 37°C, y se monitorizó midiendo la disminución del pH en el medio de cultivo. La fermentación se detuvo cuando se alcanzó un pH diana de 3,80.

El análisis del recuento de células se realiza mediante diluciones en serie del medio fermentado con una solución de tripton-sal y preparándolo en placas de Petri con MRS agar. Las placas de Petri se cultivaron en condiciones anaeróbicas durante 72h a una temperatura de 37°C.

Resultados:

25 Los resultados se muestran en las Tablas I y II y en las Figuras 1 a 3.

La Tabla I muestra el recuento bacteriano total cuando se alcanza el pH diana de 3,80.

30 La Tabla II muestra la reducción en el tiempo de fermentación que se necesita para alcanzar el pH diana de 3,80 (media de 2 experimentos independientes). La reducción se calcula por la diferencia entre el tiempo necesario para alcanzar el pH=3,80 para la cepa que muestra la tasa de fermentación más rápida cuando se cultiva en solitario, y el tiempo para alcanzar el pH=3,80 para la combinación de cepas. Consideramos que hay presente un efecto sinérgico cuando la reducción del tiempo de fermentación con la combinación es de al menos un 1%, preferiblemente con al menos el mismo nivel de población.

Tabla I

Nº de combinación	Combinación de cepas	Recuento total CFU/g
1	CNCM I-1518+CNCM I-3689	3x10e9
2	CNCM I-1518+ Paracasei B	3x10e9
3	CNCM I-1518+ Rhamno A	2,8x10e9
4	CNCM I-1518+HN001	3x10e9
5	CNCM I-3689+CNCM I-3690	3,1x10e9
6	CNCM I-1518+ Paracasei A	4x10e9
7	CNCM I-1518+CNCM I-3690	3,1x10e9

Tabla I (continuación)

Nº de combinación	Combinación de cepas	Recuento total CFU/g
8	CNCM I-1518+CNCM I-3689+ Rhamno B	4x10e9
9	CNCM I-1518+CNCM I-3689+ Rhamno A	2,5x10e9
10	CNCM I-1518+CNCM I-3689+HN001	1,4x10e9
11	CNCM I-1518+CNCM I-3690 + CNCM I-3689	3x10e9
12	CNCM I-1518+ Paracasei B +CNCM I-3690	2,75x10e9
13	CNCM I-1518 + Paracasei A +CNCM I-3690	3,2x10e9

La Tabla I, muestra los resultados de los recuentos totales. El recuento diana (el mismo para la fermentación de cada cepa individual = al menos 1x10e9 CFU/g), se obtiene para cada combinación analizada en la Tabla II.

5

Tabla II

Nº de combinación	Combinación de cepas	Reducción en el tiempo de fermentación (media de 2 experimentos independientes)	Reducción en el tiempo de fermentación (%)
1	CNCM I-1518+CNCM I-3689	-1 hora	-1 %
2	CNCM I-1518+ Paracasei B	-1 hora	-1 %
3	CNCM I-1518+ Rhamno A	-4 horas	-10 %
4	CNCM I-1518+HN001	-6 horas	-13 %
5	CNCM I-3689+CNCM I-3690	-6 horas	-12 %
6	CNCM I-1518+ Paracasei A	-7 horas	-15 %
7	CNCM I-1518+CNCM I-3690	-10 horas	-19 %
8	CNCM I-1518+CNCM I-3689+ Rhamno B	-4 horas	-12 %
9	CNCM I-1518+CNCM I-3689+ Rhamno A	-6 horas	-15 %
10	CNCM I-1518+CNCM I-3689+HN001	-7 horas	-16 %
11	CNCM I-1518+CNCM I-3690 + CNCM I-3689	-12 horas	-29 %
12	CNCM I-1518+ Paracasei B + CNCM I-3690	-14 horas	-28 %
13	CNCM I-1518 + Paracasei A + CNCM I-3690	-20 horas	-40 %

La Tabla II demuestra claramente que todas las combinaciones de *L. rhamnosus* y/o *L. casei* proporcionan un aumento sinérgico inesperado en el crecimiento, reflejado por una reducción en el tiempo de fermentación de al menos 1 hora. Este efecto sinérgico es incluso más fuerte cuando tres cepas son co-fermentadas.

10 La Figura 1 muestra las curvas de fermentación bajo las mismas condiciones de cultivo, de las 2 cepas individuales CNCM 1-3689 y CNCM 1-3690 y de las 2 cepas en co-cultivo (combinación 5). La co-fermentación tiene como resultado una reducción de 6 horas en el tiempo de fermentación.

15 La Figura 2 muestra las curvas de fermentación bajo las mismas condiciones de cultivo, de las 2 cepas individuales CNCM I-1518 y CNCM 1-3690 y de las 2 cepas en co-cultivo (combinación 7). La co-fermentación tiene como resultado una reducción de 10 horas en el tiempo de fermentación.

La Figura 3 muestra las curvas de fermentación bajo las mismas condiciones de cultivo, de las 3 cepas individuales CNCM 1-1518, CNCM 1-3689, y CNCM 1-3690 y de las 3 cepas en co-cultivo (combinación 11). La co-fermentación tiene como resultado una reducción de 12 horas en el tiempo de fermentación.

5 Estos resultados confirman los presentados en la Tabla II, que muestran un efecto sinérgico de la co-fermentación de las cepas sobre la tasa de crecimiento, y que la combinación de tres cepas diferentes es lo más efectivo en la reducción del tiempo de fermentación.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la preparación de un producto lácteo fermentado que contiene dos o más cepas de *Lactobacillus*, donde dicho proceso comprende:

a) inocular un medio de fermentación láctea con dichas cepas de *Lactobacillus*;

5 b) fermentar el medio inoculado incubándolo a una temperatura adecuada para el crecimiento de dichas cepas, hasta que alcanza un pH diana deseado o hasta que la población bacteriana alcanza un valor diana deseado;

c) detener la fermentación y recuperar el producto fermentado;

10 **caracterizado porque** las cepas de *Lactobacillus* se seleccionan de entre las cepas de la especie *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, y/o cepas de la especie *Lactobacillus rhamnosus*, y comprenden al menos una cepa seleccionada de entre *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM 1-3689, y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-3690.

2. Proceso según la reivindicación 1, donde las cepas de *Lactobacillus* son inoculadas en el medio de fermentación láctea en una cantidad total de al menos 10^6 CFU/ml.

15 3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde cada cepa individual representa al menos un 1% de la población total de *Lactobacillus* inoculada.

4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la fermentación se realiza a una temperatura de 30°C a 42°C.

20 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la fermentación se detiene cuando se alcanza un pH diana de 3,7 a 4,2.

6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la fermentación se detiene cuando la población total de *Lactobacillus* es de al menos 10 veces, preferiblemente de al menos 100 veces, la población inoculada.

7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la fermentación se detiene cuando la población total de *Lactobacillus* es de al menos 10^8 CFU/ml.

25 8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la población total de *Lactobacillus* en el producto fermentado recuperado es de 10^6 a 10^9 CFU/ml.

9. Proceso según la reivindicación 8, donde las cepas inoculadas comprenden al menos una combinación de cepas seleccionadas de entre:

30 - *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518 y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-3689;

- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690;

- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM 1-3689 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690

35 10. Proceso según la reivindicación 9, donde las cepas inoculadas comprenden las tres cepas *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-3689, y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690.

11. Un producto lácteo fermentado obtenible mediante el proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Una composición que comprende las siguientes cepas de *Lactobacillus*:

- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518 y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-3689; o

40 - *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690; o

- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-3689 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690, o

- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM 1-1518, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-3689, y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690.

13. Composición según la reivindicación 12, que es un producto lácteo fermentado.

5 14. Composición alimenticia que contiene una composición o producto según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.

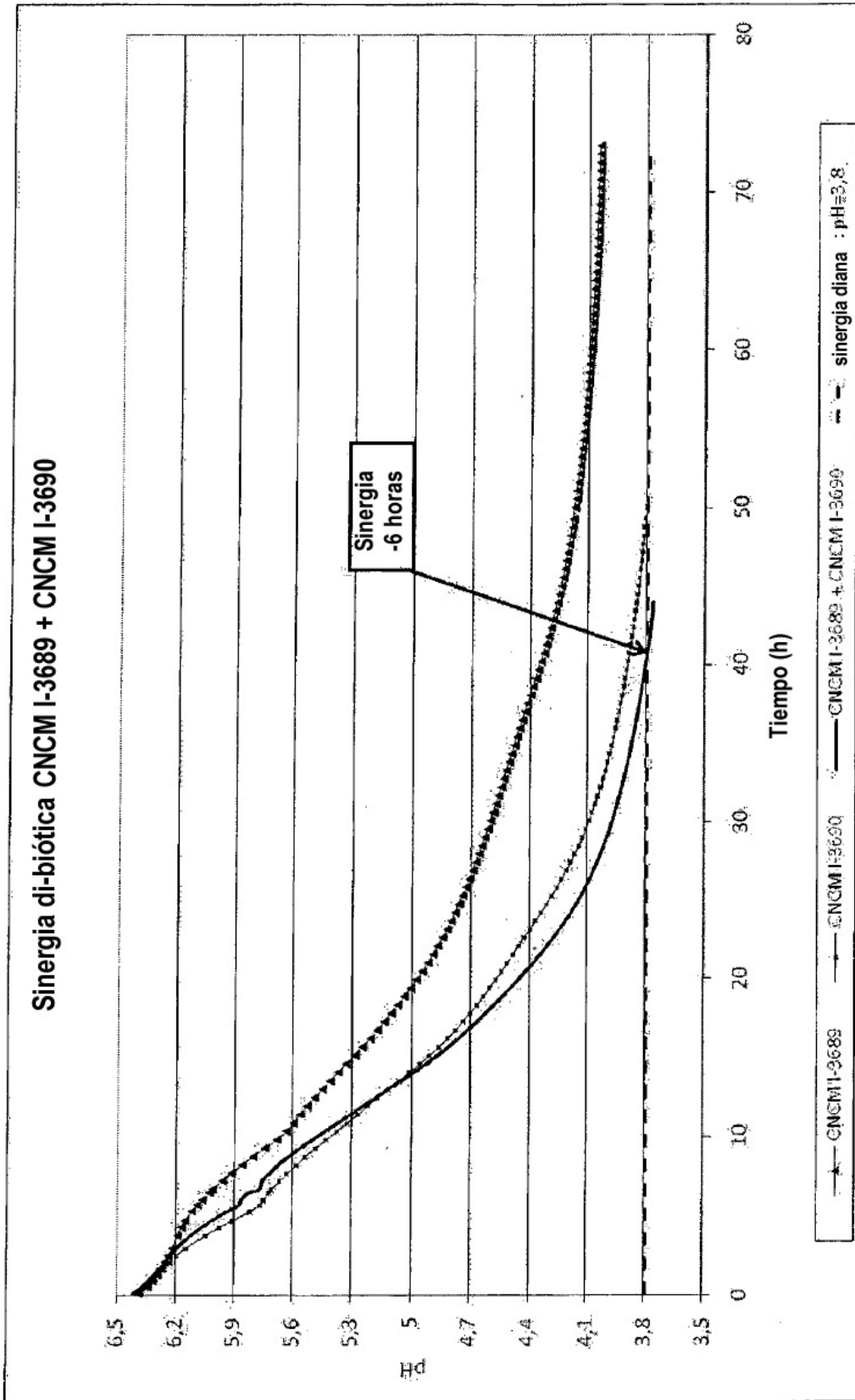


Figura 1

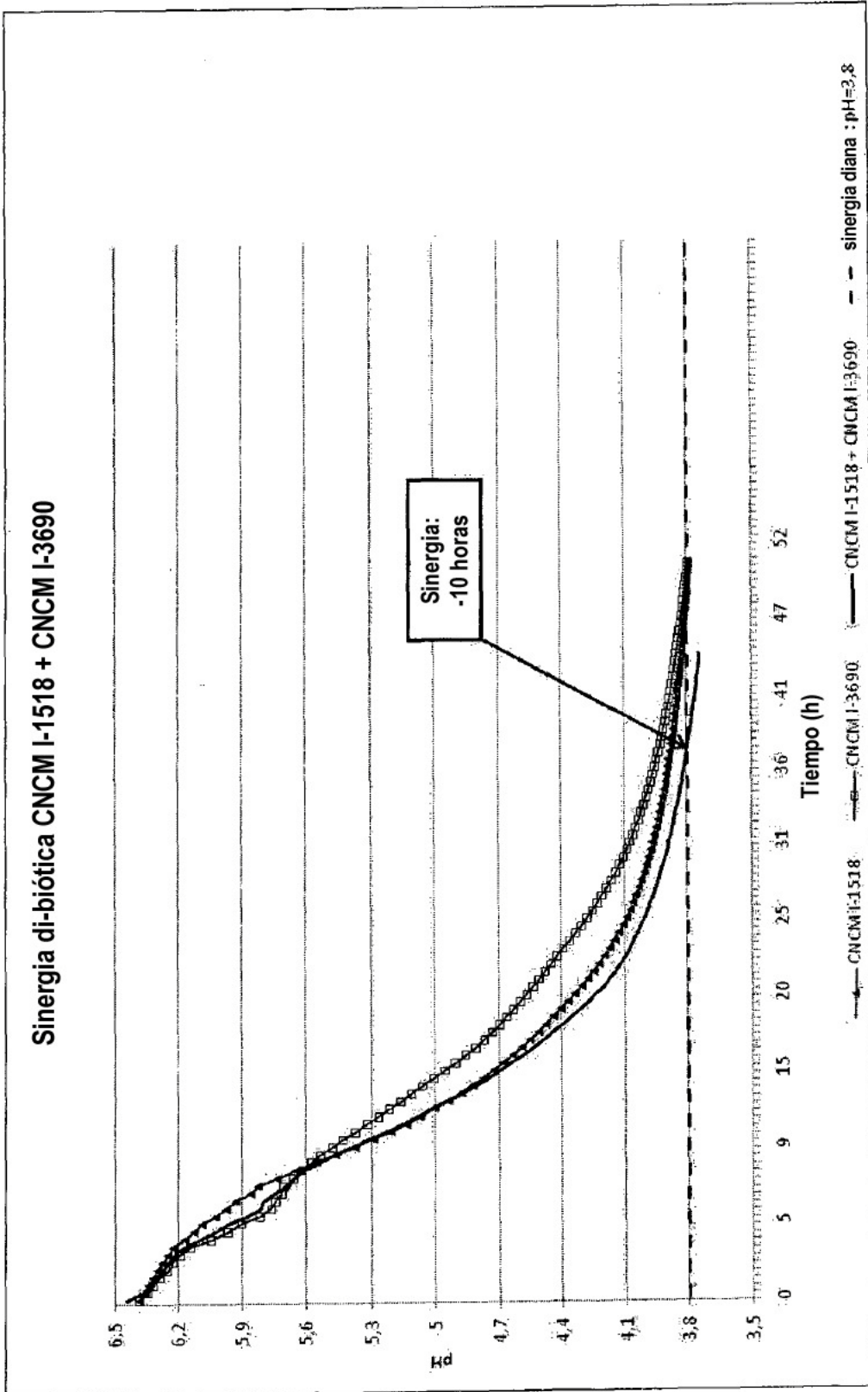


Figura 2

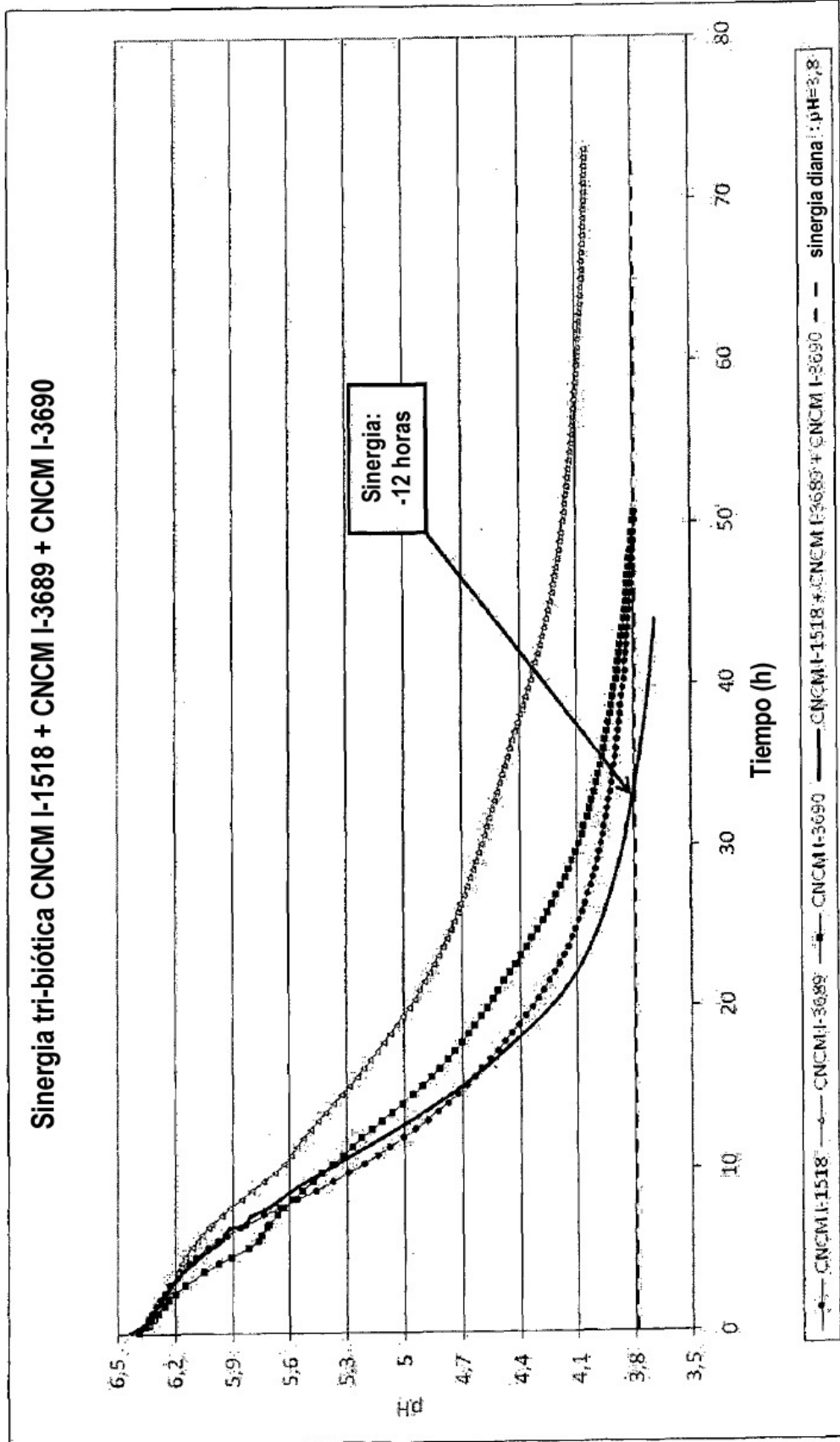


Figura 3