

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 359**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2009 E 09708024 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2241615**

54 Título: **Agente protector de microorganismos y método para la producción de células microbianas congeladas o liofilizadas**

30 Prioridad:

07.02.2008 JP 2008027347

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

19.02.2015

73 Titular/es:

**MEGMILK SNOW BRAND CO., LTD. (100.0%)
1-1, Naebo-cho, 6-chome
Higashi-ku, Sapporo, JP**

72 Inventor/es:

**AZUMA, NAOKI;
WATANABE, MASAYUKI;
UENO, HIROSHI y
YOSHIOKA, TOSHIMITSU**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 529 359 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

Agente protector de microorganismos y método para la producción de células microbianas congeladas o liofilizadas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para producir células microbianas congeladas o liofilizadas, a una mezcla congelada o liofilizada o a un uso de un permeado. La presente, más específicamente, se refiere a un método de producción de células microbianas congeladas o liofilizadas que se caracterizan por la mezcla del permeado obtenido mediante el filtrado de leche o de suero de leche utilizando membrana de ultrafiltración (UF) con células microbianas y la congelación o liofilización de las mismas. En la presente descripción, los microbios pertenecientes a bifidobacterias a veces se denominan bifidobacterias y bacterias del ácido láctico distintas a las bifidobacterias, a veces se denominan bacterias de ácido láctico, y las bifidobacterias y las bacterias del ácido láctico a veces se mezclan para hacer referencia al grupo de bacterias de ácido láctico.

15 **Técnica anterior**

Las bifidobacterias ampliamente conocidas como enterobacterias útiles, se utilizan ampliamente en la fabricación de alimentos, y se utilizan en la producción de productos lácteos tales como leche fermentada y bebidas bacterianas de ácido láctico, etc. Además, en los últimos años, siendo las funciones probióticas funciones de bio-control, se ha demostrado mediante la ingestión de células microbianas vivas, se han descrito, uno tras otro, efectos tales como efectos de inhibición sobre las enterobacterias perjudiciales y efectos control de la infección (por ejemplo, véase el Documento de Patente 1), efectos de inmunomodulación (por ejemplo, véase el Documento No Patente 1), y efectos de disminución del colesterol (por ejemplo, véase el Documento No Patente 3). Por lo tanto, para mantener la salud tomando bifidobacterias, se han realizado muchos desarrollos de productos lácteos fermentados y bebidas como el yogur y el queso, varios alimentos y bebidas que contienen bacterias del ácido láctico, tales como refrigerios y pasteles, y muchos desarrollos de su utilización como materias primas para alimentos sanos y medicamentos.

Cuando se añaden bifidobacterias a estos alimentos y bebidas, las bifidobacterias previamente cultivadas se procesan y se añaden. Sin embargo, el proceso necesita un gran esfuerzo y tiempo, y hay muchas dificultades en las técnicas con el fin de mantener una alta viabilidad en el proceso.

Por otro lado, las bacterias del ácido láctico se han utilizado como partida para diversos productos lácteos como el yogur y el queso y similares durante mucho tiempo. Y en los últimos años, éstas se han añadido a diversos alimentos, esperando que los probióticos ejerzan no solo efectos del control intestinal sino también efectos de modulación inmunológica (véase, por ejemplo, documento de no patente 2) y la mejora del trastorno intestinal inflamatorio (véase, por ejemplo, el Documento de Patente 4).

Sin embargo, aunque las células microbianas de estas bacterias de ácido láctico se obtienen mediante cultivo de la leche y similares, existen problemas de necesidad de grandes esfuerzos y mucho tiempo y de tener cuidado suficiente del control de calidad y similares de las células microbianas.

Por lo tanto, es posible producir alimentos y bebidas que contienen bacterias de ácido láctico tales como los productos lácteos tales como yogur o queso y similares fácilmente, mediante el uso previo de células microbianas vivas congeladas o liofilizadas de bacterias de ácido láctico. Sin embargo, es muy difícil de fabricar el grupo de bacterias de ácido láctico congeladas o liofilizadas que tenga una concentración microbiana necesaria para los productos, porque tienen que inhibirse los daños o la muerte de las células microbianas en el momento de la congelación o de la liofilización.

En el pasado, se han desarrollado muchos materiales de protección de congelación y materiales de protección de liofilización para disolver los problemas. Como materiales se conocen la leche descremada, el glutamato monosódico, la gelatina y la sacarosa (por ejemplo, véase el Documento de Patente 1), fenilalanina, histidina, ácido cítrico, ácido succínico, ácido tartárico y carbonato alcalino (por ejemplo, véase el Documento de Patente 2) y similares. Como los otros materiales también se conocen lactosa, trehalosa, leche descremada en polvo, sorbitol, L-ascorbato de sodio (por ejemplo, véase el Documento no de patente 5) y similares.

Documento de patente 1: Publicación de patente japonesa Nº 53-8792

Documento de patente 2: Publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público Nº 61 -265085

Documento no patente 1: A. Garcia-Lafuente et al. Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Got.*48(4):503-507,2001.

Documento no patente 2: E. Isolauri et al. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical & Experimental Allergy.* 30(11):1604-1610, 2000.

Documento no patente 3: J.Z.Xiao et al. Effects of milk Products fermented by Bifidobacterium longum on Blood Lipids in Rats and Healthy Adult Male Volunteers. *Journal of Dairy Science.*86:2452-2461, 2003.

Documento no patente 4: K.L.Madsen et al. Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10-gene-deficient mice. *Gastroenterology.*116:1107-1114, 1999.

Documento no patente 5: Ana S. Carvalho et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 14(10):835-847,2004.

5 Sin embargo, con estas técnicas anteriores, los daños o la muerte de las células microbianas en el momento de la congelación y liofilización eran graves y era difícil fabricar células microbianas congeladas o células microbianas liofilizadas estables y altamente concentradas. Específicamente, en un estado en el que una dispersión microbiana y un material protector en el que las células microbianas se asimilan en el momento de la fabricación de células microbianas se mezclan, si el proceso de congelación no se lleva a cabo a una posible baja temperatura y rápidamente, el pH de las dispersiones de células microbianas que se tienen que congelar con ácido producido por el metabolismo activo del microbio disminuirá y la viabilidad disminuirá considerablemente. Además, el pH de la dispersión de las células microbianas en el momento de la congelación tiene influencias notables sobre los daños o la muerte de las células microbianas en el momento de la fusión y la liofilización. Por tanto, se tiene que tener suficiente cuidado con el pH de la dispersión de las células microbianas antes de la congelación y hay neutralizarlo con álcalis y similares, dependiendo del caso.

15 El documento EP 0 576 780 A2 se refiere a una cepa de microorganismo *Lactobacillus casei* ssp. rhamnosus LC-705, DSM 7061, que tiene un efecto de control de la levadura y de mohos, a una preparación bacteriana que comprende esta cepa, sola o en combinación con una bacteria del género *Propionibacterium* u otra cepa de la bacteria *Lactobacillus casei* y/o con agentes convencionales utilizados para control de levaduras y mohos. En particular, el Ejemplo 13 del mismo describe el uso de una preparación que comprende *Lactobacillus casei* ssp. rhamnosus cepa LC-705 para la inhibición del moldeo de pan de trigo.

20 H. Maitrot, C. Paquin, C. Lacroix y C. P. Champagne (*Biotechnology Techniques*, Vol. 11, No. 7, julio 1997, pp. 527-531) describen la producción de cultivos liofilizados concentrados de *Bifidobacterium longum* en gel de goma de k-carragenina -algarrofín.

25 El documento EP 0 442 522 A1 divulga un método para el cultivo de una *Chlorella* aeróbicamente en un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono orgánico, que comprende la utilización de suero de leche tratada con una enzima que descompone la lactosa como dicha fuente de carbono orgánico.

30 Blanchette, D. Roy, y S. F. Gauthier (*Milchwissenschaft* 50(7) 1995, p. 363-367) discuten en una publicación el efecto de polvo retenido ultrafiltrado sobre la estabilidad de cultivos liofilizados de bifidobacterias durante el almacenamiento.

35 J. Gagné, D. Roy y S. F. Gauthier (*Milchwissenschaft* 48(9) 1993, p. 501-505) describen la producción de concentrados congelados y liofilizados de *Bifidobacterium infantis* por filtración en membrana.

40 Adicionalmente, en el proceso de fabricación de células microbianas congeladas o liofilizadas, la velocidad de congelación de la dispersión de células microbianas tiene influencias notables sobre los daños o la muerte de las células microbianas. Es decir, es deseable disminuir la temperatura del líquido tan rápido como sea posible, pero cuando la fabricación a escala industrial, hay muchos problemas a resolver al llevar a cabo la congelación rápida.

Divulgación de la invención

45 Problemas que ha de resolver la invención

50 Como se describió anteriormente, no hay ningún agente protector de propósito general capaz de inhibir los daños o la muerte de las células microbianas en una congelación y liofilización del proceso de microbio, y los desarrollos de tales agentes han sido los previstos. Por lo tanto, en vista de los problemas, el propósito de la presente invención es proporcionar un nuevo agente de mejora de la viabilidad que tiene un excelente efecto sobre la mejora de la viabilidad del microbio y no tiene mal efecto sobre el sabor de los productos y que puede producirse a bajos costes de fabricación.

55 Medios para resolver el problema

60 Por otro lado, cuando se prepara queso, una gran cantidad de suero de queso se excreta como un subproducto. El suero de leche tiene un sabor peculiar y no se ajusta a una bebida como tal. Por tanto, el suero de leche se utiliza principalmente para la preparación de WPC en el que la proteína se concentra a partir del suero y de aislado de proteína de suero (WPI) en el que la proteína se concentra y se seca después de llevar a cabo el método de adsorción de intercambio iónico de la resina. Estos son excelentes en la composición de aminoácidos en comparación con la caseína, y tienen valores nutritivos altos y, además, estos se utilizan ampliamente como materiales alimenticios baratos. Sin embargo, en los últimos años, con el aumento del consumo de queso, la cantidad de líquido de desecho que se producen en la fabricación de WPC y WPI se incrementan, por lo que es además necesario un desarrollo de un método de utilización a la luz de la protección del medio ambiente y estas efectivas utilizaciones.

65 Los presentes inventores se centran en que el líquido de los residuos producidos en el momento de la fabricación de

WPC y WPI puede estar disponible en una gran cantidad y a un bajo coste. Por otro lado, con el fin de resolver los problemas anteriores, como resultado de la investigación más seria en un método de preparación de las células microbianas liofilizadas antes mencionadas, los inventores encontraron que los daños o la muerte de las células microbianas pueden inhibirse en el proceso de congelación y de liofilización, mediante la mezcla de células microbianas y un permeado que se produce mediante filtración de la leche o del suero de leche mediante membrana de ultrafiltración (UF) con las células microbianas y congelando o liofilizando, y así se ha completado la presente invención

En el presente documento se divulgan:

(1) Un método de preparación de células microbianas congeladas o liofilizadas, **caracterizado por que** permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o del suero de leche con membrana de ultrafiltración (UF) se mezcla con las células microbianas, y la mezcla se congela o se liofiliza.

(2) Un método de preparación de células microbianas congeladas o liofilizadas, **caracterizado por que** la lactosa en el permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o del suero de leche con membrana de ultrafiltración (UF) se descompone con enzimas y/o calor, después el permeado se mezcla con las células microbianas, y la mezcla se congela o se liofiliza.

(3) El método de preparación **caracterizado por que** los microbios son uno o más de Bifidobacterium, Lactobacillus, Streptococcus y Lactococcus.

(4) Las células microbianas congeladas o liofilizadas que se pueden preparar por el método anterior.

(5) Las células microbianas congeladas o liofilizadas que se pueden preparar mediante la mezcla de permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o de suero de leche mediante membrana de ultrafiltración (UF) con una o más de las células microbianas de Bifidobacterium, Lactobacillus, Streptococcus y Lactococcus, y la congelación o liofilización de la mezcla.

(6) Las células microbianas congeladas o liofilizadas preparadas mediante la descomposición de lactosa en un permeado que se obtiene mediante el filtrado de la leche o de suero de leche mediante membrana de ultrafiltración (UF) con enzima y/o con calor, y después mezclar el permeado con una o más de las células microbianas de Bifidobacterium, Lactobacillus, Streptococcus y Lactococcus, y la congelación o liofilización de la mezcla.

(7) Un agente protector de células microbianas congeladas o liofilizadas que contiene permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o de suero de leche mediante membrana de ultrafiltración (UF) como un componente activo.

La presente invención se refiere a la invención que tiene las siguientes constituciones.

De acuerdo con un aspecto, se proporciona un método de preparación de células microbianas congeladas o liofilizadas, como se define en la reivindicación 1 anexa.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un método de preparación de células microbianas congeladas o liofilizadas, como se define en la reivindicación 2 anexa.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona una mezcla congelada o liofilizada, como se define en la reivindicación 5 anexa.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona una mezcla congelada o liofilizada, como se define en la reivindicación 6 anexa.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un uso de un permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o de suero de leche por membrana de ultrafiltración (UF) como un componente activo de un agente de protección para células microbianas congeladas o liofilizadas, como se define en la reivindicación 7 adjunta.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un uso de un permeado producido mediante el filtrado de la leche o del suero de leche por membrana de ultrafiltración (UF) para la inhibición de daños o de muerte de las células microbianas en el proceso de congelación y/o de liofilización.

Efectos de la invención

La presente invención proporciona un método para producir células microbianas congeladas o liofilizadas que pueden inhibir los daños o la muerte de las células y tienen altas viabilidades en los procesos de congelación o liofilización.

Mejor modo para realizar la invención

La característica del método de producción de la presente invención es mezclar un permeado obtenido mediante el filtrado de leche o de suero utilizando membrana de ultrafiltración (UF) con células microbianas, y congelarlas o liofilizarlas. La invención se explica en detalle a continuación.

5 Como la materia prima utilizada para la producción de permeado en la invención presente pueden ser ejemplos leche o suero de leche. Como la leche se puede usar cualquier leche que normalmente se usa en la fabricación de alimentos. Por ejemplo, pueden ser ejemplos leche entera, leche desnatada y semidesnatada, leche reconstituida, leche condensada, leche de mantequilla, crema, leche descremada en polvo, o mezclas de los mismos.

10 Como suero de leche, los subproductos obtenidos cuando el queso se prepara a partir de leche de vaca y leche de los mamíferos, tales como búfalo de agua y de cabra, se pueden usar los subproductos obtenidos cuando la caseína ácida se prepara acidificando el pH de la leche y los permeados obtenidos tratando la leche con membrana de filtración fina. Si éstos son ácidos, éstos se pueden utilizar después de volver a controlar el pH hasta un valor neutro con un agente de control de pH tal como hidróxido de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio. Se pueden usar en forma de polvo, pero cuando éstos se hacen reaccionar con la enzima, pueden usarse en una forma de solución acuosa.

15 Filtrando estas materias primas utilizando membrana de ultrafiltración (UF), se pueden obtener permeados. Para los tratamientos de membrana, se puede usar una membrana de ultra-filtración (UF) que tiene 5.000 o 10.000 de peso molecular de corte. Los permeados obtenidos de este modo contienen principalmente de 8 a 20 g/100 g de lactosa, y los materiales de bajo peso molecular tales como minerales, vitaminas, aminoácidos, péptidos, y similares.

20 Como minerales, pueden ser ejemplos los minerales solubles en agua contenidos en la leche, por ejemplo, 20 mg a 1.000 mg/100 g de calcio, 30 a 1.000 mg/100 g de potasio, 30 a 300 mg/100 g o fósforo, 10 a 100 mg/100 g de magnesio y similares.

25 Como vitaminas, pueden ser ejemplos las vitaminas contenidas en la leche, por ejemplo 0,04 mg a 2 mg/100 g de vitamina B2, 0,01 mg a 0,5 mg/100 g de vitamina B1, 0,03 mg a 1,5 mg/100 g de niacina, 0,5 mg a 25 mg/100 g de vitamina C y similares.

30 El permeado obtenido se puede utilizar en una forma de solución de agua como tal o puede tomar la forma de polvo mediante la concentración o secado y después mezclado con las células microbianas a fin de preparar células microbianas congeladas o liofilizadas.

35 Como una modificación del agente protector congelado o liofilizado, el permeado obtenido se puede utilizar en una forma de solución de agua como tal o puede tomar la forma de polvo mediante la concentración o secado y mezclado con las células microbianas a fin de preparar células microbianas congeladas o liofilizadas. Cuando está en polvo, tiene ventajas a la luz de conservación y transporte y similares. Además, después de que los materiales en polvo se forman en una solución de nuevo, se puede mezclar con las células microbianas.

40 Los microbios adaptados para el agente de protección microbiana, son microbios útiles que se utilizan después de la congelación o liofilización, y los tipos de los mismos no se limitan específicamente. Sin embargo, para ejemplos, se pueden usar ilustrativamente bifidobacterias, bacterias del ácido láctico, microbios, hongos, levaduras y similares. Más específicamente, como bifidobacterias, un microbio que pertenece a *Bifidobacterium*, para ejemplos pueden ilustrarse *Bifidobacterium longum* y similares. Sin embargo, las bifidobacterias utilizadas no se limitan a estas especies de microbios.

45 El grupo de bacterias del ácido láctico son los microbios generalmente clasificadas como bacterias del ácido láctico, microbios que pertenecen a *Lactobacillus*, específicamente *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y similares, microbios pertenecientes a *Streptococcus*, especialmente, *Streptococcus thermophilus*, y microbios pertenecientes a *Lactococcus*, especialmente, *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*. Sin embargo, el grupo de bacterias de ácido láctico utilizado no se limita a estas bacterias.

50 Como otros microbios distintos al grupo de bacterias del ácido láctico, pueden ilustrarse los microbios pertenecientes a *Propionibacterium*, específicamente, *Propionibacterium freudenreichii* y similares, y los microbios pertenecientes a *Bacillus*, específicamente *Bacillus subtilis* y similares. Como hongos se pueden ilustrar los microbios pertenecientes a *Penicillium*, específicamente *Penicillium roqueforti* y similares. Como levaduras se pueden ilustrar los microbios pertenecientes a *Saccharomyces*, específicamente *Saccharomyces cerevisiae* y similares. Sin embargo, las bacterias, los hongos y las levaduras que pueden usarse no se limitan a estas especies.

60 Las células microbianas de los microbios se pueden preparar por métodos convencionales. Para ejemplos, uno o 2 o más de los microbios mencionados anteriormente se cultivan en un medio líquido que contiene glucosa, extracto de levadura, peptona y similares, a una temperatura generalmente de 25 en 45 °C durante 4 a 24 horas, y las células microbianas cultivadas se recogen del medio líquido para obtener células microbianas húmedas después de tratamientos tales como lavado y similares.

65 A las células microbianas húmedas obtenidas normalmente se añade el permeado en una concentración de 10 a 75 %, preferentemente de 25 a 50 %, y se mezclan uniformemente. Después de mezclar, la congelación o liofilización pueden llevarse a cabo de una manera convencional. Al congelar,

por ejemplo, la congelación puede llevarse a cabo de -20 °C a -160 °C (utilizando nitrógeno líquido y similares), y al liofilizar, puede llevarse a cabo a una temperatura de la bandeja de 35 °C o menos a un vacío de aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$ torr.

5 Por otro lado, después de la descomposición de la lactosa en el permeado que se obtiene mediante el filtrado de la leche o del suero de leche con membrana de ultrafiltración (UF), el permeado se puede mezclar con microbio. La descomposición de la lactosa se lleva a cabo preferentemente utilizando β -galactosidasa.

10 En la presente invención, se añade el permeado tratado por membrana y se mezcla con el fin de obtener células microbianas congeladas o liofilizadas que pueden inhibir los daños o la muerte de las células microbianas y tienen altas viabilidades en el proceso de congelación o de liofilización.

Ejemplo

15 Los ejemplos de la presente invención se muestran a continuación para explicar la presente invención en detalle.

Con los ejemplos descritos a continuación solo se pretende explicar la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la presente invención a la descripción de los ejemplos.

20 Ejemplo 1

(Preparación de grupo de bacterias del ácido láctico)

25 En medio GAM (fabricado por Nihon Seiyaku KK) al que se ha añadido glucosa para tener una concentración final de 1 %, 2 % del pre-cultivo de Bifidobacterium longum se inoculó JCM 1217^T y se cultivó a 37 °C durante 16 horas para obtener 1000 ml de la suspensión de las bifidobacterias. Después de enfriar 250 ml de la suspensión microbiana, se vertió en un tubo de centrífuga de 500 ml para centrifugar a 5.000 rpm durante 10 minutos, y se retiró el sobrenadante en una cantidad apropiada por decantación para obtener la suspensión de bifidobacterias en el que las bifidobacterias estaban concentradas 25 veces.

30

(Preparación de permeado)

35 Después de centrifugar 80 kg de suero de queso usando separador de crema, se esterilizó a 65 °C durante 30 minutos y se concentró hasta 19 veces usando membrana de UF que tiene 10.000 de peso molecular fraccionado (PW1812T, material de sulfona de poliéter, módulo: tipo de espiral, área de la membrana: 0,55 m², fabricado mediante DESALINIZACIÓN) a un caudal de circulación de 10 l/min., a una presión media de 4 kg/cm² para obtener 75 kg de un permeado de UF que tiene 14 % de sólidos, 11 % de lactosa, 0,3 % de proteína y 0,6 % de minerales. El permeado obtenido se puede usar como tal, como un agente protector congelado o liofilizado de la presente invención.

40

(Preparación de células microbianas liofilizadas)

45 En la suspensión preparada de bifidobacterias, se añadieron agua (muestra 1), un líquido de mezcla que contiene 10 % de leche descremada en polvo (fabricado por Snow Brand Milk Products KK) y 1 % de L-glutamato monosódico (fabricado por Wako Junyaku KK) (Muestra 2), solución al 10 % de agua de lactosa (fabricado por Wako Junyaku KK) (Muestra 3), y permeado preparado en el Ejemplo 1 (Muestra 4), en la misma cantidad para tener cuatro suspensiones de bifidobacterias cada uno en el que las bifidobacterias se concentraron hasta 12,5 veces.

50 Cada suspensión microbiana obtenida se liofilizó por un método convencional (Kyowa aparato de liofilizado de vacío RLE-308, fabricado por Kyowa Shinku Gijutsu KK, temperatura de la bandeja 35 °C o menos, grado de vacío: $1,0 \times 10^{-1}$ torr) para obtener aproximadamente 3 g de cada una de las células microbianas bifidobacterias liofilizadas.

55 Usando las células microbianas de bifidobacterias liofilizadas obtenidas se llevó a cabo una prueba de deterioro forzado a 37 °C, y después de tres semanas desde el comienzo de la prueba, el número de las bacterias de supervivencia se contó en cada muestra, y se calcularon las viabilidades. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Ejemplo 2

60 (Preparación de grupo de bacterias del ácido láctico)

65 En medio M17 (fabricado por DIFCO) al que se ha añadido lactosa para tener una concentración final de 0,5 %, 2 % del pre-cultivo de Lactococcus lactis ssp. lactis se inoculó JCM5808^T y se cultivó a 30 °C durante 16 horas para obtener 1000 ml de la suspensión de las bifidobacterias. La suspensión microbiana se trató de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1, se obtuvo la suspensión de las bacterias del ácido láctico en el que las bacterias del ácido láctico estaban concentradas 25 veces.

(Preparación de la permeación)

5 En la suspensión de bacterias, agua (muestra 1), una solución de mezcla que contiene 10 % de leche descremada en polvo (fabricado por Snow Brand Milk Products KK) y 1 % de L-glutamato monosódico (fabricado por Wako Junyaku KK) (Muestra 2), solución al 10 % en agua de lactosa (fabricado por Wako Junyaku KK) (Muestra 3), y el permeado preparado en el Ejemplo 1 (Muestra 4) se añadieron en la misma cantidad para obtener cuatro tipos de suspensiones de bifidobacterias en cada una de las cuales las bifidobacterias de ácido láctico estaban concentradas 12,5 veces.

10 Cada suspensión microbiana obtenida se liofilizó por un método convencional para obtener aproximadamente 3 g de cada una de las células microbianas de bacterias de ácido láctico liofilizadas.

15 Usando las células microbianas de bacterias de ácido láctico liofilizadas obtenidas se llevó a cabo una prueba de deterioro forzado a 37 °C, y después de tres semanas desde el comienzo de la prueba, el número de las bacterias de supervivencia se contó en cada muestra, y se calcularon las viabilidades. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Ejemplo 3

20 (Preparación de grupo de bacterias del ácido láctico)

25 En medio MRS (fabricado por DIFCO), 2 % de pre-cultivo de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* JCM 1002^T, o *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T, o *Lactobacillus casei* JCM 1134^T o *Lactobacillus plantarum* JCM 1149^T se inoculó y se cultivó a 37 °C durante 16 horas con el fin de obtener 1, 000 ml de la suspensión de bacterias de ácido láctico. Con el mismo tratamiento de la suspensión de bacterias como se describe en el Ejemplo 1, se obtuvo cada una de las suspensiones de bacterias de ácido láctico en la que las bacterias del ácido láctico estaban concentradas 25 veces.

(Preparación de células microbianas liofilizadas)

30 En el líquido de bacterias, agua (muestra 1), una solución de mezcla que contiene 10 % de leche descremada en polvo (fabricado por Snow Brand Milk Products KK) y 1 % de L-glutamato monosódico (fabricado por Wako Junyaku KK) (Muestra 2), solución al 10 % en agua de lactosa (fabricado por Wako Junyaku KK) (Muestra 3), y el permeado preparado en el Ejemplo 1 (Muestra 4) se añadieron en la misma cantidad para obtener cuatro tipos de suspensiones de bifidobacterias en cada una de las suspensiones de bacterias de ácido láctico en las que las bacterias de ácido láctico estaban concentradas 12,5 veces.

35 Cada suspensión microbiana obtenida se liofilizó por un método convencional para obtener aproximadamente 3 g de cada una de las células microbianas de bacterias de ácido láctico liofilizadas.

40 Usando las células microbianas de bacterias de ácido láctico liofilizadas obtenidas se llevó a cabo una prueba de deterioro forzado a 37 °C, y después de tres semanas desde el comienzo de la prueba, el número de las bacterias de supervivencia se contó en cada muestra, y se calcularon las viabilidades. Los resultados se muestran en la tabla 1.

45 **Tabla 1**
Viabilidad de cada muestra en el ensayo de deterioro forzado a 37 °C durante tres semanas (unidad:%)

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
<i>B. longum</i> JCM 1217 ^T	0,08	0,30	0,86	1,22
<i>Lc. lactis</i> JCM 5805 ^T	30,30	55,25	70,12	85,65
<i>Lb. bulgaricus</i> JCM 1002 ^T	< 0,01	0,16	0,83	1,12
<i>Lb. gasseri</i> JCM 1131 ^T	< 0,01	< 0,01	0,12	0,32
<i>Lb. casei</i> JCM 1134 ^T	< 0,01	< 0,01	0,05	0,10
<i>Lb. plantarum</i> JCM 1149 ^T	0,17	0,51	0,78	0,99

50 De los resultados mostrados en la Tabla 1, se confirmó para cada grupo de bacterias del ácido láctico que la Muestra 4 en la que se utilizó el permeado tratado con la membrana tenía una alta viabilidad en comparación con la Muestra 1 en la que no se utilizó el agente de protección, y con la Muestra 2 y 3 en la que se utilizaron agentes protectores conocidos. Muestra 4 de la presente invención contiene casi la misma cantidad de lactosa que la Muestra 3, pero mostró una alta viabilidad en comparación con la Muestra 3. Se confirmó que el permeado tratado con la membrana tenía una superioridad sobre los efectos en la viabilidad.

Ejemplo 4

(Preparación de grupo de bacterias del ácido láctico)

- 5 Con el mismo método descrito en el Ejemplo 1, se obtuvo la suspensión microbiana de *Bifidobacterium longum* JCM 1217^T en el que estaba concentrado hasta 25 veces.

(Preparación de permeado)

- 10 Con el mismo método que se describe en el Ejemplo 1, se obtuvieron 75 kg de permeado UF. Después, el permeado obtenido se concentró mediante concentración a presión reducida con el fin de tener un 65 % en peso del contenido de sólidos totales. Se añadieron 25 g de β -galactosidasa (Sumilacto L, fabricado por Shinnihon Kagaku Kogyo KK) a los 5 kg obtenidos del permeado tratado con membrana de UF concentrado, se llevó a cabo una reacción enzimática a 55 °C durante dos horas, a continuación se calentó hasta 85 °C durante cinco minutos usando un intercambiador de calor de tipo placa que tiene un tubo de retención para detener la reacción enzimática. Por tanto, se obtuvieron 4 kg de la composición de jarabe descompuesta con lactosa. El permeado obtenido puede ser utilizado como agente protector de la congelación o liofilización de la invención como tal.

(Preparación de células microbianas liofilizadas)

- 20 En cada una de las suspensiones microbianas de bifidobacterias preparadas (muestra 1), un líquido de mezcla que contiene 10 % de leche descremada en polvo (fabricado por Snow Brand Milk Products KK) y 1 % de L-glutamato monosódico (fabricado por Wako Junyaku KK) (Muestra 2), solución al 10 % de agua de lactosa (fabricado por Wako Junyaku KK) (Muestra 3), y composición de jarabe descompuesto con lactosa (muestra 5) permeado se añadieron en la misma cantidad para obtener cuatro tipos de cada una de las suspensiones de bifidobacterias en las que *Lactobacillus bifidus* estaba concentrado hasta 12,5 veces.

Cada suspensión microbiana obtenida se liofilizó por el mismo método descrito en el Ejemplo 1 a fin de obtener aproximadamente 3 g de cada célula microbiana de bifidobacterias liofilizadas.

- 30 Usando las células microbianas de bifidobacterias liofilizadas se llevó a cabo una prueba de deterioro forzado a 37 °C, y después de tres semanas desde el comienzo de la prueba, el número de las bacterias de supervivencia se contó en cada muestra, y se calcularon las viabilidades. Los resultados se muestran en la tabla 2.

35 Ejemplo 5

(Preparación de grupo de bacterias del ácido láctico)

- 40 Con el mismo método descrito en el Ejemplo 2, se obtuvo la suspensión microbiana de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* JCM 5805^T en el que estaba concentrado hasta 25 veces.

(Preparación de células microbianas liofilizadas)

- 45 En la suspensión microbiana, agua (muestra 1), una solución de mezcla que contiene 10 % de leche descremada en polvo (fabricado por Snow Brand Milk Products KK) y 1 % de L-glutamato monosódico (fabricado por Wako Junyaku KK) (Muestra 2), solución al 10 % en agua de lactosa (fabricado por Wako Junyaku KK) (Muestra 3), o la composición de jarabe descompuesta con lactosa preparada en el Ejemplo 4 (Muestra 5) se añadieron en la misma cantidad para obtener cuatro tipos de suspensiones microbianas de bacterias de ácido láctico en las que las bacterias de ácido láctico estaban concentradas 12,5 veces.

Cada suspensión microbiana obtenida se liofilizó por el mismo método descrito en el Ejemplo 1 a fin de obtener aproximadamente 3 g de las células microbiana de bacterias de ácido láctico liofilizadas.

- 55 Usando las células microbianas de bacterias de ácido láctico liofilizadas se llevó a cabo una prueba de deterioro forzado a 37 °C. Después de tres semanas desde el comienzo de la prueba, el número de las bacterias de supervivencia se contó en cada muestra, y se calcularon las viabilidades. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Ejemplo 6

- 60 (Preparación de grupo de bacterias del ácido láctico)

Con el mismo método descrito en el Ejemplo 3, se obtuvo cada suspensión microbiana de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* JCM 1002^T, o *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T, o *Lactobacillus plantarum* JCM 1149^T en la cual la suspensión microbiana estaba concentrada hasta 25 veces.

65

ES 2 529 359 T3

(Preparación de células microbianas liofilizadas)

5 En la suspensión microbiana, agua (muestra 1), una solución de mezcla que contiene 10 % de leche descremada en polvo (fabricado por Snow Brand Milk Products KK) y 1 % de L-glutamato monosódico (fabricado por Wako Junyaku KK) (Muestra 2), solución al 10 % en agua de lactosa (fabricado por Wako Junyaku KK) (Muestra 3), o la composición de jarabe descompuesta con lactosa preparada en el Ejemplo 4 (Muestra 5) se añadieron en la misma cantidad para obtener cuatro tipos de suspensiones microbianas de bacterias de ácido láctico en las que las bacterias de ácido láctico estaban concentradas 12,5 veces.

10 Cada suspensión microbiana obtenida se liofilizó por el mismo método descrito en el Ejemplo 1 a fin de obtener aproximadamente 3 g de las células microbianas de bacterias de ácido láctico liofilizadas.

15 Usando las células microbianas de bacterias de ácido láctico liofilizadas se llevó a cabo una prueba de deterioro forzado a 37 °C. Después de tres semanas desde el comienzo de la prueba, el número de las bacterias de supervivencia se contó en cada muestra, y se calcularon las viabilidades. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2
Viabilidad de cada muestra en el ensayo de deterioro forzado a 37 °C durante tres semanas (unidad:%)

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 5
B. longum JCM 1217 ^T	0,08	0,30	0,86	0,95
Lc. lactis JCM 5805 ^T	30,30	55,25	70,12	82,66
Lb. bulgaricus JCM 1002 ^T	< 0,01	0,16	0,83	1,55
Lb. gasseri JCM 1131 ^T	< 0,01	< 0,01	0,12	0,25
Lb. plantarum JCM 1149 ^T	0,17	0,51	0,78	0,95

20 De los resultados mostrados en la Tabla 2, se confirmó para la muestra 5, en la que se utilizó el permeado tratado con la membrana, tenía una alta viabilidad para todas las bacterias de ácido láctico, en comparación con la Muestra 1 en la que no se utilizó el agente de protección, y con las Muestras 2 y 3 en la que se utilizaron agentes protectores conocidos.

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de células microbianas congeladas o liofilizadas, **caracterizado por que** dicho método comprende obtener un permeado mediante el filtrado de leche o de suero de leche utilizando membrana de ultrafiltración (UF), conteniendo el permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o del suero de leche con membrana de ultrafiltración (UF) de 8 a 20 g/100 g de lactosa, minerales que comprenden de 20 mg a 1.000 mg/100 g de calcio, 30 a 1000 mg/100 g de potasio, 30 a 300 mg/100 g de fósforo y 10 a 100 mg/100 g de magnesio, y vitaminas que comprenden de 0,04 mg a 2 mg/100 g de vitamina B2, de 0,01 mg a 0,5 mg/100 g de vitamina B1, de 0,03 mg a 1,5 mg/100 g de niacina, de 0,5 mg a 25 mg/100 g de vitamina C, y en **por que** el permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o del suero de leche con membrana de ultrafiltración (UF) se mezcla con células microbianas y la mezcla se congela o se liofiliza.
2. Un método de preparación de células microbianas congeladas o liofilizadas, **caracterizado por que** dicho método comprende obtener un permeado mediante el filtrado de leche o de suero de leche utilizando membrana de ultrafiltración (UF), conteniendo el permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o del suero de leche con membrana de ultrafiltración (UF) de 8 a 20 g/100 g de lactosa, minerales que comprenden de 20 mg a 1.000 mg/100 g de calcio, 30 a 1000 mg/100 g de potasio, 30 a 300 mg/100 g de fósforo y 10 a 100 mg/100 g de magnesio, y vitaminas que comprenden de 0,04 mg a 2 mg/100 g de vitamina B2, de 0,01 mg a 0,5 mg/100 g de vitamina B1, de 0,03 mg a 1,5 mg/100 g de niacina, de 0,5 mg a 25 mg/100 g de vitamina C, y **por que** la lactosa en el permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o del suero de leche con membrana de ultrafiltración se descompone con enzimas y, opcionalmente con calor, y, después, el permeado se mezcla con las células microbianas y la mezcla se congela o se liofiliza.
3. El método de preparación de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** los microbios son uno o más de Bifidobacterium, Lactobacillus, Streptococcus y Lactococcus.
4. El método de preparación de células microbianas congeladas o liofilizadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el permeado obtenido se utiliza en una forma de solución en agua como tal o toma la forma de polvo mediante concentración o secado.
5. Una mezcla congelada o liofilizada que se puede preparar obteniendo un permeado mediante el filtrado de leche o de suero de leche utilizando membrana de ultrafiltración (UF), conteniendo el permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o del suero de leche con membrana de ultrafiltración (UF) de 8 a 20 g/100 g de lactosa, minerales que comprenden de 20 mg a 1.000 mg/100 g de calcio, 30 a 1000 mg/100 g de potasio, 30 a 300 mg/100 g de fósforo y 10 a 100 mg/100 g de magnesio, y vitaminas que comprenden de 0,04 mg a 2 mg/100 g de vitamina B2, de 0,01 mg a 0,5 mg/100 g de vitamina B1, de 0,03 mg a 1,5 mg/100 g de niacina, de 0,5 mg a 25 mg/100 g de vitamina C, mezclando el permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o del suero de leche con membrana de ultrafiltración (UF) con una o más de las células microbianas de Bifidobacterium, Lactobacillus, Streptococcus y Lactococcus, y congelando o liofilizando la mezcla.
6. Una mezcla congelada o liofilizada que se puede preparar obteniendo un permeado mediante el filtrado de leche o de suero de leche utilizando membrana de ultrafiltración (UF), conteniendo el permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o del suero de leche con membrana de ultrafiltración (UF) de 8 a 20 g/100 g de lactosa, minerales que comprenden de 20 mg a 1.000 mg/100 g de calcio, 30 a 1000 mg/100 g de potasio, 30 a 300 mg/100 g de fósforo y 10 a 100 mg/100 g de magnesio, y vitaminas que comprenden de 0,04 mg a 2 mg/100 g de vitamina B2, de 0,01 mg a 0,5 mg/100 g de vitamina B1, de 0,03 mg a 1,5 mg/100 g de niacina, de 0,5 mg a 25 mg/100 g de vitamina C, descomponiendo la lactosa en el permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o del suero de leche con membrana de ultrafiltración (UF) con enzima y/o calor y, después, mezclando el permeado con una o más de las células microbianas de Bifidobacterium, Lactobacillus, Streptococcus y Lactococcus, y congelando o liofilizando la mezcla.
7. Uso de un permeado obtenido mediante el filtrado de leche o de suero de leche por membrana de ultrafiltración (UF) como un componente activo de un agente de protección para células microbianas congeladas o liofilizadas, comprendiendo dicho uso mezclar el permeado con células microbianas, y la congelación o liofilización de la mezcla, conteniendo el permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o del suero de leche con membrana de ultrafiltración (UF) de 8 a 20 g/100 g de lactosa, minerales que comprenden de 20 mg a 1.000 mg/100 g de calcio, de 30 a 1000 mg/100 g de potasio, de 30 a 300 mg/100 g de fósforo y de 10 a 100 mg/100 g de magnesio, y vitaminas que comprenden de 0,04 mg a 2 mg/100 g de vitamina B2, de 0,01 mg a 0,5 mg/100 g de vitamina B1, de 0,03 mg a 1,5 mg/100 g de niacina, de 0,5 mg a 25 mg/100 g de vitamina C.
8. Uso de un permeado producido mediante el filtrado de leche o de suero de leche por membrana de ultrafiltración (UF) para inhibir los daños o la muerte de las células microbianas en el proceso de congelación y/o liofilización, conteniendo el permeado obtenido mediante el filtrado de la leche o del suero de leche con membrana de ultrafiltración (UF) de 8 a 20 g/100 g de lactosa, minerales que comprenden de 20 mg a 1.000 mg/100 g de calcio, de 30 a 1000 mg/100 g de potasio, de 30 a 300 mg/100 g de fósforo y de 10 a 100 mg/100 g de magnesio, y vitaminas que comprenden de 0,04 mg a 2 mg/100 g de vitamina B2, de 0,01 mg a 0,5 mg/100 g de vitamina B1, de 0,03 mg a

1,5 mg/100 g de niacina, de 0,5 mg a 25 mg/100 g de vitamina C.