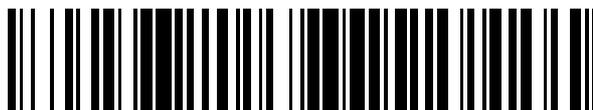


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 990**

51 Int. Cl.:

<b>A23C 9/12</b>	(2006.01) <b>A61K 8/97</b>	(2006.01)
<b>A23L 5/00</b>	(2006.01) <b>A61K 8/99</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/10</b>	(2006.01) <b>A61K 8/02</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)	
<b>C12R 1/01</b>	(2006.01)	
<b>A23C 9/123</b>	(2006.01)	
<b>A23C 9/13</b>	(2006.01)	
<b>A23L 7/10</b>	(2006.01)	
<b>A23L 19/00</b>	(2006.01)	
<b>A61Q 19/08</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2006 E 06756430 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 1900285**

54 Título: **Alimento fermentado que contiene bacterias bifidobacterium y método para producir el mismo**

30 Prioridad:

**02.06.2005 JP 2005162226**  
**12.08.2005 JP 2005234748**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.05.2016**

73 Titular/es:

**KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (100.0%)**  
**1-19, Higashi-Shinbashi 1-chome, Minato-ku**  
**Tokyo 105-8660, JP**

72 Inventor/es:

**HOSHI, RYOTARO;**  
**OGASAWARA, NOBUHIRO;**  
**YOSHIKAWA, MASAKI;**  
**KUDO, TATSUYUKI;**  
**AKAHOSHI, RYOICHI;**  
**MIZUSAWA, SUSUMU;**  
**KIMIZUKA, HARUYUKI y**  
**SUZUKI, TAKAO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 570 990 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**

Alimento fermentado que contiene bacterias bifidobacterium y método para producir el mismo

**5 Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a alimentos fermentados que incluyen bacterias del género Bifidobacterium y, más específicamente, a alimentos fermentados que contienen bacterias viables del género Bifidobacterium a concentración elevada y también a un método de preparación de dichos alimentos fermentados.

10

**Técnica anterior**

Claramente se conoce que las bacterias del género Bifidobacterium tienen diversos efectos, tales como la mejora de la flora intestinal, la mejora del movimiento intestinal, la mejora de la función intestinal, la prevención de infecciones, la inmunoestimulación y la prevención de cánceres como las bacterias del ácido láctico, representadas por las bacterias del género Lactobacillus y similares. Se considera que estos microorganismos mejoran el ambiente intestinal, lo que contribuye a la salud humana.

15

Para obtener los efectos descritos anteriormente con bacterias del género Bifidobacterium es necesario mantener un gran número de recuento de células viables de las bacterias dentro de los productos tales como leches fermentadas. Dado que, sin embargo, las bacterias del género Bifidobacterium generalmente son bacterias anaerobias, tienen una viabilidad escasa y mueren rápidamente, especialmente en presencia de oxígeno.

20

Por tanto, se han propuesto métodos para mejorar la viabilidad de las bacterias del género Bifidobacterium en productos tales como leches fermentadas preparadas usando las bacterias. Ejemplos de los métodos incluyen los que hacen uso de sacarosa o sorbitol (D-glucitol) (Documento de Patente 1), eritritol (Documento de Patente 2) y lactitol (documento de patente 3).

25

Además, para proporcionar bacterias del género Bifidobacterium en su estado activo para los consumidores, se están adoptando medidas, tales como introducir los productos de fermentación que contienen bacterias del género Bifidobacterium inmediatamente después de su preparación en un recipiente hecho de un material impermeable al oxígeno para bloquear completamente el contacto del oxígeno con los productos. En este método, sin embargo, el uso recipientes impermeables al oxígeno implica muchos problemas en términos de eliminación y de costes y, por lo tanto, la usabilidad del recipiente es limitada.

30

El documento JP 2004-222652 A divulga agentes de mejora de la supervivencia para microorganismos, que se obtienen de extracto de té.

35

Por lo tanto, se están realizando estudios sobre métodos para mantener la viabilidad de las bacterias del género Bifidobacterium, incluso bajo condiciones aerobias, y se han notificado varios métodos. Específicamente, se ha informado de un método que usa N-acetilglucosamina, ácido pantoténico, pantetina, panteteína, péptidos y lactulosa. No obstante, en este método, los materiales utilizados tienen, en sí mismos, costes relativamente altos, y cuando se utilizan en alimentos, el sabor y el gusto de los alimentos se ve afectado profundamente. Por lo tanto, teniendo en cuenta los efectos para la viabilidad de las bacterias también, ha habido un deseo de un material más conveniente.

40

Se considera que la viabilidad de las bacterias del género Bifidobacterium se ve influida por las cepas utilizadas, el pH de los productos (bebidas, alimentos y similares), los azúcares añadidos como edulcorante, la cantidad de oxígeno disuelto y similares. Con el fin de mejorar esto, se están realizando consideraciones sobre la adición de levaduras o de bacterias del ácido láctico, uso combinado de vitamina C, el material del recipiente del producto y similares. Sin embargo, para satisfacer la preferencia del consumidor que se está diversificando recientemente y el requisito para mejorar aún más la viabilidad de las bacterias, hay un deseo de un material que se puede utilizar para la mejora de la viabilidad.

45

[Documento de patente 1] JP-A-57-004291  
 [Documento de patente 2] JP-B-2577692  
 [Documento de patente 3] JP-B-3261571

55

**Divulgación de la invención**

**60 Problemas que ha de resolver la invención**

60

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es encontrar un material excelente y nuevo con el uso cuyos varios efectos fisiológicos se pueden obtener al tiempo que se mantiene la viabilidad de las bacterias del género Bifidobacterium en el almacenamiento de un producto, tal como una bebida o alimento, que contiene las bacterias sin desarrollar problemas en el sabor del producto, y utilizar el material para la provisión de un alimento fermentado que contenga bacterias viables del género Bifidobacterium a una concentración elevada, mejorándose la viabilidad

65

de las bacterias con el uso del material. Otro objeto de la presente invención es proporcionar, en la preparación de un alimento fermentado que contiene bacterias del género Bifidobacterium, un método para mejorar la viabilidad de las bacterias en el almacenamiento del alimento fermentado.

## 5 Medios para resolver los problemas

Para conseguir los objetos descritos anteriormente, los presentes inventores han llevado a cabo una extensa investigación. Como resultado, se ha descubierto que mediante la adición de un extracto extraído de una planta específica, el recuento de células viables de bacterias del género Bifidobacterium contenidas en un alimento fermentado se puede mantener de manera estable incluso después del almacenamiento del alimento, lo que lleva a la realización de la presente invención.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona, por tanto, un alimento fermentado que comprende un extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) y bacterias del género Bifidobacterium.

En otro aspecto de la presente invención, también se proporciona un alimento fermentado que comprende un extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) y bacterias del género Bifidobacterium, obteniéndose el extracto mediante extracción con ácido, preferentemente en condiciones ácidas a un pH no superior a 4,0.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona también un método para preparar un alimento fermentado que comprende las bacterias del género Bifidobacterium, que comprende la adición de un extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) en una etapa arbitraria.

En un aspecto adicional más de la presente invención, también se proporciona un método para mejorar la viabilidad de bacterias del género Bifidobacterium, que comprende la adición de un extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae).

Los extractos contenidas en los alimentos fermentados de la presente invención y se han derivado de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae), proporcionan excelentes efectos de mejora de la viabilidad para las bacterias del género Bifidobacterium y, por otra parte, no tienen prácticamente ningún efecto sobre el sabor. Por tanto, un alimento fermentado de la presente invención, que se obtiene mediante el uso del extracto, tiene un sabor satisfactorio sin sufrir mucha disminución del recuento de células viables de las bacterias, incluso después del almacenamiento de los alimentos durante un largo período de tiempo, y es excelente para la estimulación de la salud.

## Mejor modo para realizar la invención

El alimento fermentado de la presente invención contiene un extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) (en adelante en el presente documento se puede denominar simplemente "un extracto").

Entre los materiales vegetales que también se pueden utilizar como materia prima para un extracto no de acuerdo con la invención, la cúrcuma es el rizoma de Curcuma longa L. o Curcuma aromatica Salisb. En la presente invención, Curcuma longa L. es particularmente preferida entre las plantas que pertenecen a Curcuma. Se sabe que Curcuma longa L. tiene efectos tales como efectos de mejora de la función hepática, efectos de prevención de la resaca, efectos antisecretores gástricos y efectos de mejora de la disfunción gastrointestinal.

Houttuynia cordata Thunb. es una planta perteneciente a Houttuynia cordata. Para obtener un extracto de Houttuynia cordata Thunb., se pueden usar las partes aéreas de la hierba y las partes de ramificación, siendo particularmente preferido el uso de partes de hierba. Se sabe que Houttuynia cordata Thunb. tiene efectos de supresión de la inflamación de la mucosa.

Eucommia ulmoides Oliv. es una planta perteneciente a Eucommia ulmoides. Para obtener un extracto de Eucommia ulmoides Oliv se pueden usar hojas y ramas, siendo particularmente preferido el uso de las hojas. Se sabe que Eucommia ulmoides Oliv. tiene efectos tales como el control de la presión arterial, el alivio del estrés y la prevención de enfermedades relacionadas con el estilo de vida.

El salvado de arroz es una mezcla de pericarpios, capas de aleurona y gérmenes de granos (arroz integral) disponibles de Oryza Sativa sin la gluma. Se sabe que este salvado de arroz tiene efectos tales como la mejora de la inmunidad, la prevención del hígado graso y similares.

Las hojas de caqui incluyen hojas de la planta de Diospyros Kaki Thunb., Diospyros lotus L., o Diopyros lotus L. var. glabra Makino. En la presente invención, Diospyros Kaki Thunb. Es particularmente preferida entre las plantas del género Diospyros porque se sabe que las hojas tienen efectos tales como supresión del estornudo, la congestión nasal, la secreción nasal y similares.

Perilla incluye Perillafrustescens (L.) Britton var. acuta Kudo, Perilla frustescens (L.) Britton var. acuta Kudo forma

viridis Makino, Perillafrutescens (L.) Britton var. crispa (Thunb) Decne. En la presente invención, particularmente se prefiere Perilla frutescens (L.) Britton var. acuta Kudo. Para obtener un extracto de perilla, se pueden usar hojas, ramas y semillas, siendo particularmente preferido el uso de las hojas. Se sabe que la perilla tiene efectos tales como efectos antialérgicos, efectos hipoglucémicos y rejuvenecimiento de la piel.

5 El clavo es el capullo de Syzygium aromaticum (L.) Merr. et Perry o de Eugenia caryophyllata Thunb. Se sabe que el clavo tiene efectos de conservación, actividades de contracción uterina, efectos de reducción del dolor dental, y similares.

10 La canela es la corteza de Cinnamomum zeylanicum Nees o Cinnamomum cassia Blume. Cinnamomum zeylanicum Nees es particularmente preferido entre estas plantas de cinnamomum. Se sabe que la canela tiene efectos tales como actividades antibacterianas, efectos de calentamiento del cuerpo, efectos antipiréticos, efectos de activación del sistema digestivo, efectos de mejora de diversos síntomas del resfriado, alivio de la indigestión, alivio de la diarrea y alivio de las náuseas.

15 Rubus sauvissimus S. Lee (Rosaceae) es una planta perteneciente a Rubus. para obtener un extracto de Rubus sauvissimus S. Lee (Rosaceae), se pueden usar sus hojas y el tallo, siendo particularmente preferido el uso de sus hojas. Rubus sauvissimus S. Lee (Rosaceae) está atrayendo la atención en los últimos años por sus actividades antiinflamatorias y efectos antialérgicos.

20 Para obtener un extracto de uno o más de los materiales vegetales descritos anteriormente, solo es necesario extraer con un disolvente el material o materiales de la planta, ya sea como tales o después de, opcionalmente, aplicar procesamientos tales como lavado, pelado, secado y / o molturación. Tales extractos se pueden utilizar de forma individual o en combinación. También se puede usar un extracto mixto, que se obtiene mediante la mezcla de una pluralidad de materiales vegetales y su extracción. De acuerdo con la invención, el extracto es un extracto de Rubus sauvissimus S. Lee (Rosaceae).

25 Los disolventes útiles en la preparación de los extractos incluyen agua y disolventes orgánicos, tales como alcoholes inferiores que tienen de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, etanol, acetato de etilo, glicerol y propilenglicol. Se pueden usar dos o más de estos disolventes en conjunto como un disolvente mixto. Entre estos disolventes, son particularmente preferidos el agua y disolventes acuosos tales como agua-alcoholes inferiores.

30 No se impone limitación concreta alguna sobre el método de extracción que usa el disolvente mencionado anteriormente, pero se prefiere la extracción con ácido, ya que puede extraer de manera eficiente del material o los componentes de los materiales vegetales que mejoran la viabilidad de las bacterias del género Bifidobacterium y también pueden provocar suficientes efectos incluso cuando el extracto se añade en una pequeña cantidad. La extracción con ácido puede llevarse a cabo, preferentemente, en condiciones ácidas de pH 4,0 o inferior, especialmente un pH de 3,0 a 4,0. No se impone limitación concreta alguna sobre el ingrediente ácido adaptado para regular el pH del disolvente en esta extracción con ácido, y se puede utilizar cualquier ingrediente siempre que sea ácido. Entre tales ingredientes ácidos, se prefieren los ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido láctico y ácido acético.

35 Además, las condiciones de la extracción para el extracto con el uso del disolvente mencionado anteriormente no están particularmente limitadas y el procesamiento de extracción puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante tratamiento durante de 30 a 60 minutos, preferiblemente a 60 °C - 120 °C, más preferiblemente a de 80 °C a 100 °C.

40 El extracto obtenido como se ha descrito anteriormente se puede usar como tal o como una solución tal como se obtiene inmediatamente después de la extracción, o como un extracto concentrado obtenido mediante purificación y concentración del extracto obtenido por medio de ultrafiltración, centrifugación o similares, o como un extracto en polvo obtenido mediante secado adicional del extracto concentrado por medio de secado por pulverización, liofilización o similares.

45 La cantidad del extracto mencionado anteriormente para su uso en el alimento fermentado puede determinarse, preferentemente, después de una verificación experimental, ya que los efectos resultantes pueden diferir en función de las especies de las bacterias del género Bifidobacterium y similares. La cantidad preferible del extracto obtenido mediante extracción con agua (en adelante en el presente documento, denominado "extracto de extracción con agua") es aproximadamente 0,01 a 10 % en peso (en adelante en el presente documento, denominado simplemente "%"), más preferiblemente de aproximadamente 0,1 % a 5 % en peso, calculado en términos de un extracto que tiene 10 grados Brix (contenido de azúcar). La cantidad preferible del extracto obtenido mediante extracción con ácido (en adelante en el presente documento, denominado "extracto de extracción con ácido") es aproximadamente 0,001 % a 10 % en peso, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 % a 1,0% en peso, calculado en términos de un extracto que tiene 10 grados Brix (contenido de azúcar).

50 En la preparación del producto de fermentación de la presente invención, el extracto de la extracción con agua o el extracto de la extracción con ácido se pueden añadir en una cantidad mayor que 10 % o más. Sin embargo, los efectos de mejora de la viabilidad no se pueden producir de forma tan proporcional a la cantidad añadida. Por el

contrario, una cantidad excesivamente grande del extracto de este tipo puede afectar el sabor del alimento fermentado. Por tanto, no se prefiere añadir el extracto en una cantidad tan excesivamente grande. Por otro lado, una cantidad del extracto de extracción con agua menor que 0,01 % o del extracto de extracción con ácido menor que 0,001 % puede no producir los efectos de mejora de la viabilidad para las bacterias del género *Bifidobacterium* suficientemente y, por lo tanto, no se prefiere.

Mientras tanto, no se impone ninguna limitación concreta alguna sobre las especies de las bacterias del género *Bifidobacterium*, que se utilizan en la preparación del producto de fermentación de la presente invención y están contenidas en el alimento fermentado, en tanto que son microorganismos que pertenecen a las bacterias del género *Bifidobacterium*. Se prefieren las conocidas como las bacterias principales de la flora intestinal humana, tales como *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium cantenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium angulatum*, las bacterias derivadas de los intestinos humanos tales como *Bifidobacterium gallicum*, las bacterias usadas en alimentos tales como *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium animalis* y similares. Entre estas bacterias del género *Bifidobacterium*, se prefieren particularmente *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium longum* en términos de los efectos de mejora de la viabilidad obtenidos cuando las bacterias se utilizan en combinación con el o los extractos descritos anteriormente.

Es posible obtener los efectos de mejora de la viabilidad para las bacterias del género *Bifidobacterium* con el uso de extracto contenido en el alimento fermentado de la presente invención, aun cuando varios microorganismos distintos de las bacterias del género *Bifidobacterium* están contenidos en los alimentos fermentados. Las bacterias del ácido láctico se pueden dar como ejemplo de otros diversos microorganismos y ejemplos de los mismos incluyen bacterias del género *Lactobacillus* tales como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* y *Lactobacillus johnsonii*, bacterias del género *Streptococcus* tales como *Streptococcus thermophilus*, bacterias del género *Lactococcus* tales como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus plantarum* y *Lactococcus raffinolactis* y bacterias del género *Enterococcus* tales como *Enterococcus faecalis*.

En particular, los efectos de mejora de la viabilidad para las bacterias del género *Bifidobacterium* obtenidos con el uso del extracto en el alimento fermentado de la presente invención pueden exhibirse notablemente cuando el recuento de células de las bacterias del género *Bifidobacterium* contenidas en el alimento fermentado es  $1 \times 10^7$  /ml o más, preferentemente  $1 \times 10^8$  /ml o más.

El alimento fermentado de la presente invención que hace uso de las bacterias del género *Bifidobacterium* (y bacterias del ácido láctico, según sea necesario) se puede preparar de acuerdo con un método conocido para la preparación de un producto de fermentación que usa bacterias del género *Bifidobacterium*, a excepción de la adición del extracto descrito anteriormente en una etapa arbitraria del procedimiento de preparación. Por ejemplo, el extracto puede añadirse antes o después de la esterilización de una solución que contiene leche descremada en polvo, seguida de la inoculación y el cultivo de las bacterias deseadas del género *Bifidobacterium* y similares. A continuación, el producto resultante se homogeneiza para obtener una leche fermentada para servir como base, seguido de la adición y la mezcla de una solución de jarabe que se prepara por separado. Después se pueden añadir aromas y similares para preparar un producto final. Como alternativa, a una solución esterilizada que contiene leche descremada en polvo, las bacterias del género *Bifidobacterium* deseadas y similares se inoculan y se cultivan. El producto resultante se homogeneiza para obtener una leche fermentada para que sirva como base. A continuación una solución de jarabe que se prepara por separado y el extracto descrito anteriormente se pueden añadir y mezclar, también se pueden añadir adicionalmente aromas y similares para preparar un producto final.

La expresión "alimentos fermentados" en la presente invención incluye leches fermentadas, productos lácteos, bebidas, tales como bebidas de bacterias del ácido láctico, yogur duro, yogur suave, yogur natural y, además, kéfir, queso, etc., que están definidos en la Ordenanza Ministerial relativa a los Patrones de Composición, etc., para Leche y Productos Lácteos. Por tanto, los alimentos fermentados de la presente invención incluyen diversas bebidas y alimentos que usan diversas bacterias del ácido láctico, por ejemplo, leches fermentadas, bebidas con bacterias del ácido láctico, kéfir, queso y similares, que pueden ser del tipo normal, del tipo aromatizado, del tipo de fruta, del tipo azucarado, del tipo blando, del tipo bebida, del tipo sólido (duro) o del tipo congelado.

Estos alimentos fermentados se obtienen mediante la adición a los mismos de un edulcorante tal como jarabe de almidón y diversos otros materiales alimenticios, por ejemplo, ingredientes opcionales tales como diversos hidratos de carbono, espesantes, emulsionantes y diversas vitaminas, según sea necesario. Los ejemplos específicos de estos materiales alimenticios incluyen hidratos de carbono tales como sacarosa, glucosa, fructosa, paratínosa, trehalosa, lactosa, xilosa y maltosa; glicolalcoholes tales como sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, palatinato, jarabe de almidón reducido y jarabe de maltosa reducida; edulcorantes de alta intensidad de dulzor tales como aspartamo, taumatina, sucralosa, acesulfamo K y estevia; diversos espesantes (estabilizadores) tales como agar, gelatina, carragenina, goma guar, goma xantana, pectina, goma de algarroba, goma gellan, carboximetilcelulosa, polisacáridos de soja y alginato de propilenglicol; emulsionantes tales como ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de glicerina, ésteres de ácidos grasos de poliglicerina, ésteres de ácidos grasos de

5 sorbitán y lecitina; grasas de la leche tales como crema; mantequilla y crema agria; condimentos agrios tales como ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, ácido málico, ácido tartárico y ácido glucónico; diversas vitaminas tales como vitamina A, vitamina B, vitamina C y vitamina E; minerales tales como calcio, magnesio, cinc, hierro y manganeso; y saborizantes tales como yogur, baya, naranja, membrillo chino, perilla, cítricos, manzana, menta, uva, albaricoque, pera, crema pastelera, melocotón, melón, plátano, tropical, hierbas, té negro y café.

10 En los alimentos fermentados de la presente invención que se han descrito anteriormente, la viabilidad de las bacterias del género *Bifidobacterium* contenidas en los alimentos está mejorada en el almacenamiento de los alimentos mediante la adición y la mezcla de los extractos, en comparación con la de los alimentos fermentados conocidos que contienen bacterias de del género *Bifidobacterium*. Aunque la razón de ello todavía no está clara, se supone que los extractos obtenidos a partir de cada uno de los materiales vegetales que contienen grandes cantidades de minerales que contribuyen a los efectos de mejora de la viabilidad de mejora para las bacterias del género *Bifidobacterium*.

### 15 Ejemplos

A continuación se describirá con mayor detalle la presente invención en base a los ejemplos. No obstante, se debe tener en cuenta que la presente invención no está, de ningún modo, limitada a los ejemplos siguientes. Los ejemplos 1-8 no son de acuerdo con la invención.

20

#### Ejemplo 1

##### <Preparación del extracto 1>

25 La cúrcuma (el rizoma de *Curcuma longa* L.), la parte aérea de la hierba *Houttuynia cordata* Thunb., las hojas de *Eucommia ulmoides* Oliv., el salvado de arroz (una mezcla de pericarpios, capas de aleurona y gérmenes de granos (arroz integral) disponible de *Oryza Sativa* sin la gluma), las hojas de caqui (hojas de *Diospyros kaki* Thunb.), las hojas de *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *acuta* Kudo, el clavo (el capullo de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry) y la canela (la corteza de *Cinnamomum zeylanium* Nees) se sometieron por separado a procesamientos tales como pelado y molidura y después se extrajeron durante 60 minutos con agua caliente a 90 °C (en una cantidad 30 10 veces el peso de la correspondiente materia prima) para preparar extractos de cúrcuma, *Houttuynia cordata* Thunb., salvado de arroz, *Eucommia ulmoides* Oliv., hojas de caqui, perilla, clavo y canela, respectivamente. Los extractos se concentraron cada uno por separado a 10 grados Brix en un evaporador.

#### 35 Ejemplo 2

##### <Comparación de la viabilidad de las bacterias del género *Bifidobacterium*>

40 Como medio basal se formó una solución al 12 % de leche descremada en polvo. Los extractos de cúrcuma, *Houttuynia cordata* Thunb., *Eucommia ulmoides* Oliv. de salvado de arroz, hojas de caqui, perilla, clavo y canela, que se habían preparado y ajustado a 10 grados Brix en el ejemplo 1, se añadieron al 1 % a alícuotas del medio basal, respectivamente, seguido de esterilización para preparar medios esterilizados. A cada uno de dichos medios se inoculó un iniciador de la cepa *Bifidobacterium breve* al 1 % y la cepa bacteriana se cultivó a 37 °C hasta que el pH alcanzó aproximadamente 4,8.

45

50 El recuento de células viables de las bacterias en cada medio se determinó tras la terminación del cultivo y después del almacenamiento a 10 °C durante 14 días usando medio de TOS (producto de Yakult Pharmaceutical Ind. Co., Ltd.). Basado en el recuento de células viables determinado de este modo, la tasa de viabilidad de las bacterias de *Bifidobacterium* se calculó según la siguiente fórmula 1. Además, la tasa de mejora de la viabilidad en cada medio que contiene el extracto se calculó en base a la tasa de viabilidad en el medio basal de acuerdo con la siguiente fórmula 2. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 1.

[Fórmula 1]

$$\text{Tasa de viabilidad (\%)} = \frac{\text{Recuento de células viables tras el almacenamiento a 10 °C durante 14 días}}{\text{Recuento de células viables tras la finalización del cultivo}} \times 100$$

[Fórmula 2]

$$\text{Tasa de mejora de la viabilidad (\%)} = \left( 1 - \frac{100 - \text{tasa de viabilidad en el medio con la adición de extracto (\%)}}{100 - \text{tasa de viabilidad en medio basal (\%)}} \right) \times 100$$

[Tabla 1]

	Medio basal	Extracto de cúrcuma	Extracto de <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	Extracto de <i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	Extracto de salvado de arroz	Extracto de hoja de caqui	Extracto de perilla	Extracto de clavo	Extracto de canela
Recuento de células viables tras la finalización del cultivo (/ml)	9,2 x 10 <sup>8</sup>	9,9 x 10 <sup>8</sup>	1,0 x 10 <sup>9</sup>	9,7 x 10 <sup>8</sup>	1,0 x 10 <sup>9</sup>	1,1 x 10 <sup>9</sup>	9,1 x 10 <sup>8</sup>	8,9 x 10 <sup>9</sup>	9,5 x 10 <sup>8</sup>
Recuento de células viables tras el almacenamiento (/ml)	5,3 x 10 <sup>8</sup>	7,0 x 10 <sup>8</sup>	6,8 x 10 <sup>8</sup>	7,1 x 10 <sup>8</sup>	7,3 x 10 <sup>8</sup>	8,3 x 10 <sup>8</sup>	6,2 x 10 <sup>8</sup>	5,5 x 10 <sup>8</sup>	6,1 x 10 <sup>8</sup>
Tasa de mejora de la viabilidad (%)	-	31,0	23,8	35,7	35,7	40,1	23,8	9,5	14,3

Como es evidente en la Tabla 1, se ha confirmado que la viabilidad de las bacterias del género *Bifidobacterium* mejoró en un medio con un extracto de cúrcuma, *Houttuynia cordata* Thunb., *Eucommia ulmoides* Oliv. salvado de arroz, hojas de caqui, perilla, clavo o canela añadidos al mismo, en comparación con la del medio basal.

### 5 Ejemplo 3

#### <Verificación de efectos del extracto de extracción con ácido sobre los efectos que mejoran la viabilidad para bacterias del género *Bifidobacterium* >

10 En condiciones similares a las de la preparación del extracto en el Ejemplo 1 excepto por el uso de agua y soluciones acuosas, cuyos pH se han ajustado a 3,0, 4,0 y 5,0, respectivamente, con ácido cítrico en lugar de con agua caliente, se trataron las hojas de caqui. A alícuotas de un medio de leche descremada en polvo al 12 %, al que se habían añadido los extractos obtenidos de este modo al 1 %, respectivamente, se inoculó el iniciador de *Bifidobacterium breve* YIT10001. La cepa bacteriana se cultivó después a 37 °C hasta que el pH alcanzó aproximadamente 4,8. El recuento de células viables de las bacterias en cada medio se determinó tras la terminación del cultivo y después de almacenamiento del cultivo a 10 °C durante 14 días de una manera similar a la del Ejemplo 2. La tasa de viabilidad y la tasa de mejora de la viabilidad se calcularon, respectivamente, de la misma manera que en el ejemplo 2. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 2.

20 [Tabla 2]

	Medio basal	Agua caliente	pH 5,0	pH 4,0	pH 3,0
Recuento de células viables tras la finalización del cultivo (/ml)	$9,2 \times 10^8$	$9,5 \times 10^8$	$9,4 \times 10^8$	$9,8 \times 10^8$	$9,6 \times 10^8$
Recuento de células viables tras el almacenamiento (/ml)	$5,3 \times 10^8$	$7,0 \times 10^8$	$7,4 \times 10^8$	$8,4 \times 10^8$	$8,3 \times 10^8$
Tasa de mejora de la viabilidad (%)	-	38,1	50,0	66,7	69,0

25 Como se muestra en la Tabla 2, se ha confirmado que los efectos de mejora de la viabilidad para las bacterias del género *Bifidobacterium* tienden a ser notables con un extracto obtenido mediante el ajuste del pH de un disolvente de extracción a 5,0 o menos, preferiblemente a 4,0 o menos.

### Ejemplo 4

#### <Preparación del extracto 2>

30 La cúrcuma (el rizoma de *Curcuma longa* L.), la parte aérea de la hierba *Houttuynia cordata* Thunb., las hojas de *Eucommia ulmoides* Oliv., el salvado de arroz (una mezcla de pericarpios, capas de aleurona y gérmenes de granos (arroz integral) disponible de *Oryza Sativa* sin la gluma), las hojas de caqui (hojas de *Diospyros kaki* Thunb.), las hojas de *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *acuta* Kudo, el clavo (el capullo de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry) y la canela (la corteza de *Cinnamomum zeylanicum* Nees) se sometieron por separado a procesamientos tales como pelado y molidura y después se extrajeron en condiciones similares a las del ejemplo 1, a excepción del uso de agua y una solución acuosa cuyo pH se había ajustado a pH 4,0 con ácido cítrico (en cantidades 10 veces el peso de la correspondiente materia prima) para preparar extractos de cúrcuma, *Houttuynia cordata* Thunb., salvado de arroz, *Eucommia ulmoides* Oliv., salvado de arroz, hojas de caqui, perilla, clavo y canela, respectivamente. Se concentraron cada uno por separado a 10 grados Brix en un evaporador.

### Ejemplo 5

#### <Verificación de efectos del extracto sobre los efectos que mejoran la viabilidad para bacterias del género *Bifidobacterium* >

45 Como medio basal se formó una leche descremada en polvo al 15 %. El extracto de cúrcuma, *Houttuynia cordata* Thunb., *Eucommia ulmoides* Oliv., salvado de arroz, hojas de caqui, perilla, clavo y canela, que se había ajustado a 10 grados Brix en el ejemplo 4, se añadieron al 1 % a alícuotas del medio basal para preparar medios, respectivamente. En cada uno de dichos medios, los iniciadores de diversas bacterias del género *Bifidobacterium* se inocularon al 1 % y dichas cepas bacterianas se cultivaron a 37 °C durante 48 horas. El recuento de células viables de las bacterias en cada medio se determinó tras la terminación del cultivo y después de almacenamiento del cultivo a 10 °C durante 14 días de una manera similar a la del Ejemplo 2. La tasa de viabilidad y la tasa de mejora de la viabilidad se calcularon, respectivamente, de la misma manera que en el ejemplo 2. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 3.

55 Para las bacterias del género *Bifidobacterium* que se van a cultivar se usaron cepas de *Bifidobacterium breve*, cepas de *Bifidobacterium bifidum* y cepas de *Bifidobacterium longum*.

[Tabla 3]

Bacterias del género Bifidobacterium	Medio basal	Extracto de cúrcuma	Extracto de <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	Extracto de <i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	Extracto de hoja de caqui	Extracto de perilla	Extracto de clavo	Extracto de canela
<i>Bifidobacterium Breve</i>	-(58*)	60,0	52,4	57,1	66,7	54,8	50,0	47,6
<i>Bifidobacterium Bifidum</i>	-(66*)	65,0	67,6	55,9	70,6	44,1	55,9	50,0
<i>Bifidobacterium Longum</i>	-(60*)	47,5	52,4	52,4	57,1	50,0	47,5	52,5

\*Tasa de viabilidad (%)

Como es evidente en la Tabla 3, los efectos de estos extractos sobre la viabilidad de diversas bacterias del género *Bifidobacterium* se han confirmado con sustancialmente todas las cepas, aunque varían dependiendo de la especie de las cepas. Se han confirmado efectos importantes, en particular con los extractos de cúrcuma, *Houttuynia cordata* Thumb., *Eucommia ulmoides* Oliv. y hojas de caqui.

5

### Ejemplo 6

#### <Preparación del producto lácteo 1>

10 Como medio basal se formó un medio de leche descremada en polvo al 15 %. Se añadieron los diferentes extractos preparados en el Ejemplo 4 al 0,1 % a alícuotas del medio basal para proporcionar medios de ensayo, respectivamente. Después de la esterilización de dichos medios con calor, el iniciador de *Bifidobacterium breve* YIT10001 se inoculó al 1 % y el iniciador de *Lactococcus lactis* YIT2027 y el iniciador de *Streptococcus thermophilus* YIT2021 se inocularon cada uno al 0,1 % a los respectivos medios y las cepas bacterianas se cultivaron a 35 °C durante 24 horas para obtener los respectivos cultivos. Cada cultivo se homogeneizó a 15 MPa y a 40 partes en peso de dicho cultivo se añadieron 60 partes en peso de una solución de azúcar al 10 %, que se había esterilizado a 100 °C durante 5 minutos, y un saborizante de yogur (producto de Yakult Material Co., Ltd.) se añadió adicionalmente a 0,1 % para preparar un producto lácteo. Cinco asesores experimentados realizaron una prueba de sabor en cada uno de los productos lácteos obtenidos como se ha descrito anteriormente. No se confirmaron diferencias entre ninguno de los productos lácteos y el producto de control que contenía el cultivo obtenido con el uso del medio basal.

15

20

Además, se evaluaron los diversos extractos para no dar efectos relacionados con el sabor al medio basal y que se ajusten muy bien. Por tanto, también se ha confirmado que su uso en cultivos para bebidas o alimentos, tales como productos lácteos, no conducen a deterioros en sus sabores.

25

### Ejemplo 7

#### <Efectos de la cantidad añadida de extracto de hoja de caqui sobre el sabor y efectos de mejora de la viabilidad>

30

##### (1) Preparación de extractos de hoja de caqui

Usando agua y una solución cuyo pH se ha ajustado a 4,0 con ácido cítrico, en cantidades 10 veces las de las hojas de caqui, se prepararon extractos de hojas de caqui en condiciones similares a las del Ejemplo 1. Esos extractos se concentraron cada uno por separado a 10 grados Brix en un evaporador.

35

##### (2) Determinación de una cantidad para añadir

40 A alícuotas de un medio de leche descremada en polvo al 15 %, los extractos de hojas de caqui preparados anteriormente en (1) se añadieron a concentraciones en un intervalo de 0,001 a 10 %, respectivamente, seguido de esterilización a 100 °C durante 60 minutos para preparar medios para el cultivo de bacterias del ácido láctico. A dichos medios, el iniciador de *Bifidobacterium breve* YIT10001 se inoculó al 1 % y el iniciador de *Lactococcus lactis* YIT2027 y el iniciador de *Streptococcus thermophilus* YIT2021 se inocularon cada uno al 0,1 % y las cepas bacterianas se cultivaron a 35 °C durante 24 horas para obtener los respectivos cultivos. Cada cultivo se homogeneizó a 15 MPa y a 40 partes en peso del cultivo homogeneizado se añadieron 60 partes en peso de una solución de azúcar al 10 %, que se había esterilizado a 100 °C durante 5 minutos, y un saborizante de yogur (producto de Yakult Material Co., Ltd.) se añadió adicionalmente a 0,1 % para preparar un producto lácteo. Con respecto a dichos productos lácteos, cinco asesores organolépticos formados realizaron una evaluación del sabor según las siguientes normas. El recuento de células viables de las bacterias en cada medio se determinó inmediatamente después de la preparación del producto y después del almacenamiento del producto a 10 °C durante 14 días de una manera similar a la del Ejemplo 2. La tasa de viabilidad y la tasa de mejora de la viabilidad se calcularon, respectivamente, de la misma manera que en el ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

45

50

#### <Normas para la evaluación>

55

(Clasificación)	(Descripción)
A:	Muy bueno
B:	Bueno
C:	Medio
D:	Malo
E:	Muy malo

[Tabla 4]

	Cantidad añadida de extracto de hoja de caqui (% en peso)	Recuento celular de las bacterias del género <i>Bifidobacterium</i> tras la preparación (/ml)	Recuento celular de las bacterias del género <i>Bifidobacterium</i> tras el almacenamiento (/ml)	Tasa de mejora de la viabilidad (%)	Evaluación del sabor
Medio basal	No añadido	$1,2 \times 10^9$	$3,1 \times 10^8$	-	A
Extracción con agua	0,001	$1,2 \times 10^9$	$3,2 \times 10^8$	1,4	A
	0,01	$1,3 \times 10^9$	$4,2 \times 10^8$	8,1	A
	0,1	$1,1 \times 10^9$	$4,4 \times 10^8$	18,9	A
	1	$1,1 \times 10^9$	$4,6 \times 10^8$	21,6	B
	5	$1,2 \times 10^9$	$4,9 \times 10^8$	20,3	B
	10	$1,0 \times 10^9$	$3,8 \times 10^8$	16,2	D
Extracción con ácido (pH 4,0)	0,001	$1,2 \times 10^9$	$3,7 \times 10^8$	6,8	A
	0,01	$1,1 \times 10^9$	$4,2 \times 10^8$	16,2	A
	0,1	$1,2 \times 10^9$	$5,0 \times 10^8$	21,6	A
	1	$1,3 \times 10^9$	$5,2 \times 10^8$	18,9	B
	5	$1,3 \times 10^9$	$5,1 \times 10^8$	17,6	B
	10	$1,1 \times 10^9$	$4,3 \times 10^8$	17,6	D

- 5 A partir de la Tabla 4 se ha confirmado que la adición de un extracto de hojas de caqui a 0,01 %, o así proporciona efectos de mejora de la viabilidad para las bacterias del género *Bifidobacterium*. También se ha comprobado que la adición de un extracto de hojas de caqui, incluso tanto como 10 % a un medio, no puede producir ningún efecto excelente adicional en proporción a las cantidades añadidas, pero, por el contrario, el sabor derivado del extracto tiende a afectar al sabor del producto preparado. También se ha confirmado que los efectos de mejora de la viabilidad del extracto de hojas de caqui son exhibidos más notablemente con uno obtenido mediante extracción con ácido que con uno obtenido mediante extracción con agua.

### Ejemplo 8

#### 15 <Efectos del método de adición del extracto de hoja de caqui sobre el sabor y los efectos de mejora de la viabilidad>

##### (1) Preparación de extractos de hoja de caqui

- 20 Usando agua y una solución cuyo pH se ha ajustado a 4,0 con ácido cítrico, en cantidades 10 veces las de las hojas de caqui, se prepararon extractos de hojas de caqui en condiciones similares a las del Ejemplo 1. Esos extractos se concentraron cada uno por separado a 10 grados Brix en un evaporador.

##### (2) Determinación del método de adición

- 25 Un medio de leche descremada en polvo al 15 % se esterilizó a 100 °C durante 60 minutos al que el iniciador de *Bifidobacterium breve* YIT10001 se inoculó al 1 % y el iniciador de *Lactococcus lactis* YIT2027 y el iniciador de *Streptococcus thermophilus* YIT2021 se inocularon cada uno al 0,1 % y las cepas bacterianas se cultivaron a 35 °C durante 24 horas para obtener los respectivos cultivos. El recuento celular de las bacterias del ácido láctico en cada cultivo se midió de la misma manera que en el ejemplo 2. Después, cada cultivo se homogeneizó a 15 Mpa y a 40 partes en peso del cultivo homogeneizado se añadieron 60 partes en peso de una solución de azúcar al 10 %, que se habían esterilizado a 100 °C durante 5 minutos, o una solución que se había obtenido mediante adición y mezclado de una solución que contiene los extractos de hoja de caqui preparados en (1) anteriormente a 0,1 % a una solución de azúcar al 10 % y esterilización a 100 °C durante 5 minutos, y también se añadió un aromatizante de yogur (producto de Yakult Material Co., Ltd.) a 0,1 % para preparar un producto lácteo. Con respecto a este tipo de productos lácteos, cinco asesores organolépticos formados realizaron una evaluación del sabor en base a las normas del ejemplo 7. El recuento de células viables de las bacterias en cada medio se determinó inmediatamente después de la preparación del producto y después del almacenamiento del producto a 10 °C durante 14 días de una manera similar a la del ejemplo 2. La tasa de viabilidad y la tasa de mejora de la viabilidad se calcularon, respectivamente, de misma manera que en el ejemplo 2. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 5.

40

[Tabla 5]

Extracto de hoja de caqui	Recuento celular de las bacterias del género <i>Bifidobacterium</i> tras la preparación (/ml)	Recuento celular de las bacterias del género <i>Bifidobacterium</i> tras el almacenamiento (/ml)	Tasa de mejora de la viabilidad (%)	Evaluación del sabor
No añadido	1,2×10 <sup>9</sup>	3,0×10 <sup>8</sup>	-	A
Extracción con agua	1,2×10 <sup>9</sup>	4,2×10 <sup>8</sup>	13,3	A
Extracción con ácido (pH 4,0)	1,3×10 <sup>9</sup>	4,9×10 <sup>8</sup>	17,3	A

A partir de la Tabla 5 se ha confirmado que los efectos de mejora de la viabilidad para las bacterias del género *Bifidobacterium* se exhiben incluso cuando se añade un extracto de hojas de caqui después del cultivo en lugar de su adición antes del cultivo. También se confirmó que el sabor de un producto lácteo no se deteriora incluso cuando se añade el extracto después del cultivo.

**Ejemplo 9**

**<Preparación del extracto 3>**

Hojas de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae) se sometieron a procesamientos tales como pelado, molturación y tostado y después se extrajeron durante 60 minutos con agua caliente a 90 °C (en una cantidad 10 veces el peso de las hojas de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae)), para preparar un de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae). El extracto resultante se concentró a 10 grados Brix en un evaporador.

**Ejemplo 10**

**<Verificación de los efectos del extracto para bacterias del género *Bifidobacterium*>**

Como medio basal se formó una solución al 12 % de leche descremada en polvo. El extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae), que se había preparado y ajustado a 10 grados Brix en el ejemplo 9, se añadió al 1 % al medio basal, seguido de esterilización para preparar un medio esterilizado. A dicho medio esterilizado, se inoculó el iniciador de la cepa *Bifidobacterium breve* al 1 % y la cepa bacteriana se cultivó a 37 °C hasta que el pH alcanzó aproximadamente 4,8.

El recuento de células viables de las bacterias en el medio se determinó tras la terminación del cultivo y después del almacenamiento del cultivo a 10 °C durante 14 días usando medio de TOS (producto de Yakult Pharmaceutical Ind. Co., Ltd.). Sobre la base del recuento de células viables determinado de este modo, la tasa de viabilidad de las bacterias de *Bifidobacterium* se calculó de acuerdo a la siguiente Fórmula 3. Adicionalmente, la tasa de mejora de la viabilidad en el medio que contiene el extracto se calculó en base a la tasa de viabilidad en el medio basal de acuerdo con la siguiente fórmula 4. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 6.

[Fórmula 3]

$$\text{Tasa de viabilidad (\%)} = \frac{\text{Recuento de células viables tras el almacenamiento a 10 °C durante 14 días}}{\text{Recuento de células viables tras la finalización del cultivo}} \times 100$$

[Fórmula 4]

$$\text{Tasa de mejora de la viabilidad (\%)} = \left(1 - \frac{100 - \text{tasa de viabilidad en el medio con la adición de extracto (\%)}}{100 - \text{tasa de viabilidad en medio basal (\%)}}\right) \times 100$$

[Tabla 6]

	Medio basal	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee (Rosaceae)
Recuento de células viables tras la finalización del cultivo (/ml)	1,2×10 <sup>9</sup>	1,2×10 <sup>9</sup>

	Medio basal	Extracto de <u>Rubus suavissimus</u> S. Lee (Rosaceae)
Recuento de células viables tras el almacenamiento (/ml)	6,1×10 <sup>8</sup>	7,8×10 <sup>8</sup>
Tasa de mejora de la viabilidad (%)	-	40,8

Como se confirma a partir de la Tabla 6, un medio añadido con un extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) proporciona mejores efectos de mejora de la viabilidad para las bacterias del género Bifidobacterium en comparación con un medio basal.

5

### Ejemplo 11

#### <Verificación del extracto de extracción con ácido 1>

10 En condiciones similares a las de la preparación del extracto en el Ejemplo 9 excepto por el uso de agua y soluciones acuosas, cuyos pH se han ajustado a 3,0, 4,0 y 5,0, respectivamente, con ácido cítrico en lugar de con agua caliente, se trató Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae). A alícuotas de un medio de leche descremada en polvo al 12 %, al que se habían añadido los extractos obtenidos de este modo al 1 %, respectivamente, se inoculó el iniciador de Bifidobacterium breve YIT10001. La cepa bacteriana se cultivó después a 37 °C hasta que el pH alcanzó

15 aproximadamente 4,8. El recuento de células viables de las bacterias en cada medio se determinó tras la terminación del cultivo y después de almacenamiento del cultivo a 10 °C durante 14 días de una manera similar a la del Ejemplo 10. La tasa de viabilidad y la tasa de mejora de la viabilidad se calcularon, respectivamente, de la misma manera que en el ejemplo 10. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 7.

20

[Tabla 7]

	Medio basal	Agua caliente	pH 5,0	pH 4,0	pH 3,0
Recuento de células viables tras la finalización del cultivo (/ml)	1,2×10 <sup>9</sup>	1,2×10 <sup>9</sup>	1,1×10 <sup>9</sup>	1,2×10 <sup>9</sup>	1,2×10 <sup>9</sup>
Recuento de células viables tras el almacenamiento (/ml)	6,1×10 <sup>8</sup>	7,8×10 <sup>8</sup>	7,6×10 <sup>8</sup>	8,8×10 <sup>8</sup>	8,9×10 <sup>8</sup>
Tasa de mejora de la viabilidad (%)	-	29	37	45	47

A partir de la Tabla 7 se confirma que los efectos de mejora de la viabilidad para las bacterias del género Bifidobacterium tienden a ser notables cuando se utiliza un disolvente añadido con un extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) que tiene un pH más alto.

25

### Ejemplo 12

#### <Preparación del extracto 4>

30

Hojas de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) se sometieron a procesamientos tales como pelado, molturación y tostado y después se extrajeron en condiciones similares a las del ejemplo 9 con una solución acuosa de ácido cítrico ajustado a un pH de 4,0 (en una cantidad 10 veces el peso de las hojas de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)), para preparar un de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae). El extracto obtenido de este modo se

35 concentró a 10 grados Brix en un evaporador.

### Ejemplo 13

#### <Verificación del extracto de extracción con ácido 2>

40

Como medio basal se formó un medio de leche descremada en polvo al 15 %. El extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae), que se había ajustado a 10 grados Brix en el ejemplo 12, se añadió al 1,0 % a alícuotas del medio basal para preparar medios, respectivamente. En cada uno de esos medios, los iniciadores de diversas bacterias del género Bifidobacterium se inocularon al 1 % y las cepas bacterianas se cultivaron a 37 °C hasta que el pH alcanzó

45 aproximadamente 4. El recuento de células viables de las bacterias en cada medio se determinó tras la terminación del cultivo y después de almacenamiento del cultivo a 10 °C durante 14 días de una manera similar a la del Ejemplo 10. La tasa de viabilidad y la tasa de mejora de la viabilidad se calcularon, respectivamente, de la misma manera que en el Ejemplo 10. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 8.

50

Para las bacterias del género Bifidobacterium que se van a cultivar se usaron cepas de Bifidobacterium breve, cepas de Bifidobacterium bifidum y cepas de Bifidobacterium longum.

[Tabla 8]

Bacterias del género	Medio basal			Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee (Rosaceae)				
	Recuento de células viables tras la finalización del cultivo (/ml)	Recuento de células viables tras el almacenamiento (/ml)	Tasa de mejora de la viabilidad (%)	Tiempo de cultivo (h)	Recuento de células viables tras la finalización del cultivo (/ml)	Recuento de células viables tras el almacenamiento (/ml)	Tasa de mejora de la viabilidad (%)	Tiempo de cultivo (h)
<u>Bifidobacterium Breve</u>	$1,2 \times 10^9$	$6,1 \times 10^8$	-	41	$1,1 \times 10^9$	$8,1 \times 10^8$	47	40
<u>Bifidobacterium Bifidum</u>	$1,0 \times 10^9$	$4,8 \times 10^8$	-	48	$1,2 \times 10^9$	$9,8 \times 10^8$	65	44
<u>Bifidobacterium Longum</u>	$1,1 \times 10^9$	$5,6 \times 10^8$	-	45	$1,2 \times 10^9$	$8,4 \times 10^8$	39	44

Como es evidente en la Tabla 8, los efectos del extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) sobre la mejora de la viabilidad de las bacterias del género Bifidobacterium se han confirmado con sustancialmente todas las cepas, aunque varían dependiendo de la especie de las cepas. También se confirmó un efecto que con algunas de las cepas se acortó el tiempo de cultivo.

5

#### Ejemplo 14

##### <Preparación del producto lácteo 2>

10 Como medio basal se formó un medio de leche descremada en polvo al 20 %. Se añadió el extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) preparado en el Ejemplo 12 al 0,1 % a alícuotas del medio basal para proporcionar medios de ensayo, respectivamente. Después de la esterilización de dichos medios con calor, el iniciador de Bifidobacterium breve YIT10001 se inoculó al 1 % y el iniciador de Lactococcus lactis YIT2027 y el iniciador de Streptococcus thermophilus YIT2021 se inocularon cada uno al 0,1 % a los respectivos medios y las cepas bacterianas se cultivaron a 35 °C durante 24 horas para obtener los respectivos cultivos. Cada cultivo se  
15 homogeneizó a 15 MPa y a 40 partes en peso de dicho cultivo se añadieron 60 partes en peso de una solución de azúcar al 10 %, que se había esterilizado a 100 °C durante 5 minutos, y un saborizante de yogur (producto de Yakult Material Co., Ltd.) se añadió adicionalmente a 0,1 % para preparar un producto lácteo. Cinco asesores experimentados realizaron una prueba de sabor en cada uno de los productos lácteos obtenidos como se ha descrito anteriormente. No se confirmaron diferencias entre ninguno de los productos lácteos y el producto de control que contenía el cultivo obtenido con el uso del medio basal.

Además, se evaluó el extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) para no dar efectos relacionados con el sabor al medio basal y que se ajusten muy bien. Por tanto, también se ha confirmado que su uso en cultivos para  
25 bebidas o alimentos, tales como productos lácteos, no conducen a deterioros en sus sabores.

#### Ejemplo 15

##### <Efectos de la cantidad añadida de extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) sobre el sabor, capacidad de proliferación y efectos de mejora de la viabilidad>

30

##### (1) Preparación de extractos de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)

Usando agua y una solución cuyo pH se ha ajustado a 4,0 con ácido cítrico, en cantidades 10 veces las de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae), Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) se prepararon extractos en condiciones similares a las del Ejemplo 9. Esos extractos se concentraron cada uno por separado a 10 grados Brix en un evaporador.

35

##### (2) Determinación de una cantidad para añadir

40

A alícuotas de un medio de leche descremada en polvo al 20 %, los extractos de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) preparados anteriormente en (1) se añadieron a concentraciones en un intervalo de 0,001 a 10 %, respectivamente, seguido de esterilización a 100 °C durante 60 minutos para preparar medios de cultivo. A dichos medios, el iniciador de Bifidobacterium breve YIT10001 se inoculó al 1 % y el iniciador de Lactococcus lactis YIT2027 y el iniciador de Streptococcus thermophilus YIT2021 se inocularon cada uno al 0,1 % y las cepas bacterianas se cultivaron a 35 °C durante 24 horas para obtener los respectivos cultivos. El recuento celular de las bacterias del ácido láctico en cada cultivo se midió de una manera similar a la del ejemplo 10. Cada cultivo se  
45 homogeneizó a 15 MPa y a 40 partes en peso del cultivo homogeneizado se añadieron 60 partes en peso de una solución de azúcar al 10 %, que se había esterilizado a 100 °C durante 5 minutos, y un saborizante de yogur (producto de Yakult Material Co., Ltd.) se añadió adicionalmente a 0,1 % para preparar un producto lácteo. Con respecto a dichos productos lácteos, cinco asesores organolépticos formados realizaron una evaluación del sabor según las siguientes normas. El recuento de células viables de las bacterias en cada medio se determinó inmediatamente después de la preparación del producto y después del almacenamiento del producto a 10 °C durante 14 días de una manera similar a la del Ejemplo 10. La tasa de viabilidad y la tasa de mejora de la viabilidad se calcularon, respectivamente, de la misma manera que en el ejemplo 10. Los resultados se muestran en la Tabla  
50 9.

55

##### <Normas para la evaluación>

(Clasificación)	(Descripción)
A:	Muy bueno
B:	Bueno
C:	Promedio
D:	Malo
E:	Muy malo

60

[Tabla 9]

	Cantidad añadida de <u>Rubus suavissimus</u> S. <u>Lee</u> (Rosaceae) (% en peso)	Recuento celular de las bacterias del género Bifidobacterium tras la preparación (/ml)	Recuento celular de las bacterias del género Bifidobacterium tras el almacenamiento (/ml)	Tasa de mejora de la viabilidad (%)	Sabor
Medio basal	No añadido	$1,3 \times 10^9$	$3,1 \times 10^8$	-	A
Extracción con agua caliente	0,001	$1,2 \times 10^9$	$3,3 \times 10^8$	5	A
	0,01	$1,3 \times 10^9$	$4,5 \times 10^8$	14	A
	0,1	$1,4 \times 10^9$	$4,9 \times 10^8$	15	A
	1	$1,3 \times 10^9$	$4,9 \times 10^8$	18	B
	5	$1,2 \times 10^9$	$5,1 \times 10^8$	24	C
	10	$1,2 \times 10^9$	$4,3 \times 10^8$	16	D
Extracción con ácido (pH 4,0)	0,001	$1,2 \times 10^9$	$3,7 \times 10^8$	9	A
	0,01	$1,2 \times 10^9$	$4,6 \times 10^8$	18	A
	0,1	$1,2 \times 10^9$	$6,3 \times 10^8$	27	A
	1	$1,3 \times 10^9$	$5,6 \times 10^8$	25	B
	5	$1,3 \times 10^9$	$5,6 \times 10^8$	25	C
	10	$1,2 \times 10^9$	$4,8 \times 10^8$	21	D

A partir de la Tabla 9 se ha confirmado que la adición de un extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) a 0,01 %, o así proporciona efectos de mejora de la viabilidad para las bacterias del género Bifidobacterium. También se ha comprobado que la adición de un extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae), incluso tanto como 10 % a un medio, no puede producir ningún efecto excelente adicional en proporción a las cantidades añadidas, pero, por el contrario, el sabor del producto preparado se vio afectado. También se ha confirmado que los efectos de mejora de la viabilidad del extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) son exhibidos más notablemente con uno obtenido mediante extracción con ácido que con uno obtenido mediante extracción con agua caliente.

### Ejemplo 16

**<Verificación de los efectos del método de adición del extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) sobre la mejora de la viabilidad para las bacterias del género Bifidobacterium>**

#### (1) Preparación de extractos de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)

Usando agua y una solución cuyo pH se ha ajustado a 4,0 con ácido cítrico, en cantidades 10 veces las de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae), Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) se prepararon extractos en condiciones similares a las del Ejemplo 9. Esos extractos se concentraron cada uno por separado a 10 grados Brix en un evaporador.

#### (2) Determinación del método de adición

Un medio de leche descremada en polvo al 20% se esterilizó a 100 °C durante 60 minutos al que el iniciador de Bifidobacterium breve YIT10001 se inoculó al 1 % y el iniciador de Lactococcus lactis YIT2027 y el iniciador de Streptococcus thermophilus YIT2021 se inocularon cada uno al 0,1 % y las cepas bacterianas se cultivaron a 35 °C durante 24 horas para obtener los respectivos cultivos. Después, cada cultivo se homogeneizó a 15 Mpa y a 40 partes en peso del cultivo homogeneizado se añadieron 60 partes en peso de una solución de azúcar al 10 %, que se habían esterilizado a 100 °C durante 5 minutos, o una solución que se había obtenido mediante adición y mezclado de una solución que contiene los extractos de hoja de caqui preparados en (1) anteriormente a 0,1 % a una solución de azúcar al 10 % y esterilización a 100 °C durante 5 minutos, y también se añadió un aromatizante de yogur (producto de Yakult Material Co., Ltd.) a 0,1 % para preparar un producto lácteo. Con respecto a dichos productos lácteos, el recuento de células viables de las bacterias en cada medio se determinó tras la terminación del cultivo y después de almacenamiento a 10 °C durante 14 días de una manera similar a la del Ejemplo 2. La tasa de viabilidad y la tasa de mejora de la viabilidad se calcularon, respectivamente, de la misma manera que en el ejemplo 10. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 10.

[Tabla 10]

Extracto de <u>Rubus suavissimus</u> S. <u>Lee</u> (Rosaceae)	Recuento celular de las bacterias del género Bifidobacterium tras la preparación (/ml)	Recuento celular de las bacterias del género Bifidobacterium tras el almacenamiento (/ml)	Tasa de mejora de la viabilidad (%)
No añadido	$1,3 \times 10^9$	$3,1 \times 10^8$	-

Extracto de <u>Rubus suavissimus</u> S. <u>Lee</u> (Rosaceae)	Recuento celular de las bacterias del género <u>Bifidobacterium</u> tras la preparación (/ml)	Recuento celular de las bacterias del género <u>Bifidobacterium</u> tras el almacenamiento (/ml)	Tasa de mejora de la viabilidad (%)
Extracción con agua caliente	$1,2 \times 10^9$	$4,0 \times 10^8$	12
Extracción con ácido (pH 4,0)	$1,3 \times 10^9$	$4,8 \times 10^8$	17

Como se puede entender a partir de la Tabla 10, los efectos de mejora de la viabilidad para las bacterias del género Bifidobacterium junto con el uso de extracto de Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae) puede exhibirse con independencia del momento de la adición del extracto.

5

**Aplicabilidad industrial**

El alimento fermentado de la presente invención contiene bacterias del género Bifidobacterium mientras no sufre muchos deterioros en el sabor y mantiene el recuento de células de las bacterias, incluso después del almacenamiento de los alimentos durante un largo período de tiempo. De acuerdo con lo anterior, este producto fermentado se puede utilizar adecuadamente en la estimulación de la salud.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un alimento fermentado que comprende un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae) y bacterias del género *Bifidobacterium*.
- 5 2. Un alimento fermentado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el extracto se ha obtenido mediante extracción con ácido.
- 10 3. Un alimento fermentado de acuerdo con la reivindicación 2, donde el extracto se ha obtenido mediante extracción con ácido en condiciones ácidas no superiores a pH 4,0.
4. Un alimento fermentado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además bacterias del ácido láctico.
- 15 5. Un método para preparar un alimento fermentado que comprende las bacterias del género *Bifidobacterium*, que comprende la adición de un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae) en una etapa arbitraria.
6. Un método para mejorar la viabilidad de las bacterias del género *Bifidobacterium*, que comprende la adición de un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae).