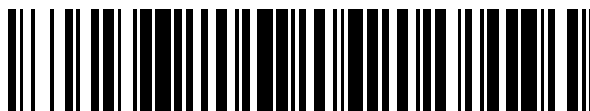


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 182**

51 Int. Cl.:

A23C 9/127 (2006.01)

A23L 33/105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2011** **E 11829085 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016** **EP 2622965**

54 Título: **Alimento fermentado y método para la producción del mismo**

30 Prioridad:

01.10.2010 JP 2010223517

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

13.07.2016

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;
UTSUMI HIROE;
MATSUI AKIHISA y
SUZUKI TAKAO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 577 182 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 y método para la producción del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a alimentos fermentados que contienen bacterias del género *Bifidobacterium*, y a métodos para la producción de dichos alimentos fermentados.

10 **Antecedentes de la técnica**

Se ha esclarecido que las bacterias del género *Bifidobacterium*, como sucede con el caso de las bacterias ácido lácticas tales como las bacterias de *Lactobacillus*, tienen diversos efectos, incluyendo la mejora de la flora intestinal, movimiento intestinal y funciones del tracto intestinal, la protección contra las infecciones, la inmunoestimulación y la prevención de cáncer. Se cree que estas bacterias contribuyen a la salud del ser humano a través de mejoras del entorno enteral.

Para exhibir dichos efectos, las bacterias de *Bifidobacterium* requieren el mantenimiento de un alto recuento de bacterias viables en productos tales como leche fermentada. Sin embargo, debido a que las bacterias de *Bifidobacterium* son normalmente anaerobias, tienen una pobre viabilidad y mueren rápidamente en particular en presencia de oxígeno.

Los solicitantes de la presente solicitud han informado de la adición de un extracto de té dulce (*Rubus suavissimus* S. Lee) o similares a productos que usan las bacterias de *Bifidobacterium* tales como leche fermentada para mejorar la viabilidad de las bacterias de *Bifidobacterium* en dichos productos (Documento de Patente 1).

Sin embargo, a pesar de que la adición de un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee mejora satisfactoriamente la viabilidad de las bacterias de *Bifidobacterium* en los productos tales como leche fermentada, todavía ha permanecido un problema de sabor debido al amargor derivado del *Rubus suavissimus* S. Lee.

30 **Lista de la técnica relacionada**

Documento de Patente

35 Documento de Patente 1: WO 2006/129508

Sumario de la invención

Problemas que la invención ha de resolver

40 Por consiguiente es un objeto de la presente invención proporcionar una técnica por medio de la cual el sabor de los productos tales como leche fermentada que usan las bacterias de *Bifidobacterium* pueda mejorarse manteniendo al mismo tiempo el efecto del *Rubus suavissimus* S. Lee para la mejora de la viabilidad de las bacterias de *Bifidobacterium*.

45 Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos para resolver el problema anterior, y han encontrado que el problema puede resolverse cuando el extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee, usado en la técnica relacionada, se añade después de haberse electrodializado en condiciones específicas. La presente invención se ha completado en base a este descubrimiento.

Específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente.

55 (1) un alimento fermentado que incluye:

una esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee que se obtiene como un concentrado a través de la electrodialización de un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee añadido con una sal inorgánica; y bacterias del género *Bifidobacterium*.

60 (2) un método para la producción de un alimento fermentado que contiene bacterias del género *Bifidobacterium*, incluyendo el método mezclar una esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee, que se obtiene como un concentrado a través de la electrodialización de un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee añadido con una sal inorgánica, con el alimento fermentado en cualquier etapa de la producción del alimento fermentado.

65 También se describe:

Un método para la mejora la viabilidad de las bacterias del género *Bifidobacterium*, incluyendo el método, mezclar una esencia de *Rubus suavisissimus* S. Lee, que se obtiene como un concentrado a través de la electrodiálisis de un extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee añadido con una sal inorgánica, con un alimento fermentado que contiene bacterias del género *Bifidobacterium*; una esencia de *Rubus suavisissimus* S. Lee que se obtiene como un concentrado a través de la electrodiálisis de un extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee añadido con una sal inorgánica;

un método para la producción de una esencia de *Rubus suavisissimus* S. Lee, incluyendo el método electrodiálisis un extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee añadido con una sal inorgánica, y obtener un concentrado; y

un método para mejorar el sabor de un extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee. Incluyendo el método electrodiálisis un extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee añadido con una sal inorgánica, y obtener un concentrado.

Ventaja de la invención

El alimento fermentado de la presente invención contiene una esencia de *Rubus suavisissimus* S. Lee que se obtiene como un concentrado a través de la electrodiálisis de un extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee añadido con una sal inorgánica. De este modo puede mejorarse la viabilidad de las bacterias de *Bifidobacterium* contenidas en el alimento fermentado, y el alimento no tiene el amargor derivado del *Rubus suavisissimus* S. Lee, y es deseable en términos de sabor.

Modo para llevar a cabo la invención

La esencia de *Rubus suavisissimus* S. Lee que se obtiene como un concentrado a través de la electrodiálisis de un extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee añadido con una sal inorgánica y contenido en el alimento fermentado de la presente invención se obtiene como sigue. Primero, las hojas y/o tallos, preferentemente las hojas de *Rubus suavisissimus* S. Lee (Rosaceae) perteneciente al género *Rubus* de la familia de la rosa Rosaceae se extraen con un disolvente o bien directamente o después de procesos tales como lavado, descascarrillado, secado y triturado para obtener un extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee.

El disolvente usado para producir el extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee no se limita particularmente, y puede ser, por ejemplo, agua, y disolventes orgánicos tales como alcoholes inferiores de 1 a 5 átomos de carbono (tales como etanol), acetato de etilo, glicerina y propilenglicol. Estos pueden usarse o solos o como una mezcla de dos o más. De estos disolventes, se prefieren agua y un disolvente acuoso tal como una mezcla de agua y un alcohol inferior.

El método usado para extraer el extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee con el disolvente no se limita particularmente, y se realiza preferentemente mediante, por ejemplo, extracción ácida. La extracción ácida se realiza en condiciones ácidas de preferentemente pH 4,0 o menos, más preferentemente pH de 3,0 a 4,0. El componente ácido usado para ajustar el pH del disolvente en la extracción ácida no se limita particularmente, mientras que sea ácido. Los ejemplos preferidos del componente ácido incluyen ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido láctico y ácido acético.

Las condiciones de extracción para la extracción del extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee con el disolvente no se limitan particularmente, y la extracción se realiza preferentemente, por ejemplo, a una temperatura de 0 °C a 100 °C, más preferentemente de 10 °C a 40 °C durante aproximadamente 30 a 60 minutos.

El extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee obtenido de esta manera se somete a procesos tales como filtración y centrifugación si se requieren, y después se añade con una sal inorgánica seguido de electrodiálisis.

La sal inorgánica añadida al extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee no se limita particularmente, siempre y cuando sea una sal formada por un ácido inorgánico y una base inorgánica. Los ejemplos de dicha sal inorgánica incluyen una o más seleccionadas de sales de potasio tales como cloruro de potasio, sales de sodio tales como cloruro de sodio, sales de calcio tales como cloruro de calcio y sales de magnesio tales como cloruro de magnesio. De estas sales inorgánicas, se prefieren las sales de magnesio, y se prefiere más el cloruro de magnesio. La sal inorgánica se añade a preferentemente de 0,02 a 0,2 moles/l, más preferentemente de 0,05 a 0,1 moles/l desde un punto de vista anhidro. Estas sales inorgánicas pueden ser hidratadas o anhidras.

El electrodiálisis usado para la electrodiálisis puede ser, tal que un cátodo y un ánodo se dividen organizando alternativamente una multitud de membranas de intercambio catiónico y una multitud de membranas de intercambio aniónico y que incluye una cámara del cátodo, una cámara del ánodo, una multitud de cámaras de desalinización y una multitud de cámaras de concentración. Dicho electrodiálisis produce un líquido concentrado de una sustancia iónica (concentrado), y un líquido libre de la sustancia iónica (líquido desalinizado). Específicamente, las cámaras de concentración ocupan partes separadas por las membranas de intercambio catiónico del lado del ánodo y las membranas de intercambio aniónico del lado del cátodo, y el líquido sometido a reflujo en las cámaras de concentración es el concentrado. Las cámaras de desalinización ocupan partes separadas por las membranas de intercambio aniónico del lado del ánodo y las membranas de intercambio catiónico del lado del cátodo, y el líquido sometido a reflujo en las cámaras de desalinización es el líquido desalinizado. También pueden usarse los

electrodializadores disponibles en el mercado, por ejemplo, el Acilyzer (disponible de Astom Co., Ltd.).

La esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee usada en la presente invención puede obtenerse recogiendo el concentrado que se obtiene a través de la electrodiálisis realizada mediante reflujo del extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee añadido con una sal inorgánica en las cámaras de desalinización del electrodializador, y reflujo de agua o similar en las cámaras de concentración. Las condiciones de electrodiálisis no se limitan particularmente. Por ejemplo, la electrodiálisis puede realizarse mediante reflujo de agua en las cámaras de concentración en cantidades equivalentes de 5 a 50 % en masa (de ahora en adelante, simplemente "%"), preferentemente de 10 a 30 % del extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee, seguido de la aplicación de un voltaje de 10 a 200 V, preferentemente de 50 a 100 V a través del cátodo y el ánodo, y pasando una corriente de 10 a 200 A, preferentemente de 50 a 100 A hasta que las conductividades eléctricas de las cámaras de desalinización alcancen el equilibrio (2 miliSiemens por centímetro (mS/cm)). Después puede recogerse el concentrado. Aparte del agua, el líquido de reflujo en las cámaras de concentración puede ser, por ejemplo, una solución electrolítica tal como salmuera, y ácido cítrico en agua.

La esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee puede usarse o bien como está después de la electrodiálisis, o como un concentrado después de purificarse y concentrarse a través de la ultrafiltración, centrifugación, o similar, o como una forma en polvo después del secado del concentrado mediante secado por atomización, liofilización, o similar.

La cantidad de la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee usada en el alimento fermentado de la presente invención no se limita particularmente. Por ejemplo, en el caso de una esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee de 12 Brix, la concentración de la esencia en el alimento fermentado es de 0,001 a 0,1 %, preferentemente de 0,001 a 0,05 %, más preferentemente de 0,002 a 0,02 %. Observar que el valor Brix es un valor medido obtenido de, por ejemplo, un refractómetro digital tal como RX-7000 α (Atago Co., Ltd.).

Las bacterias de *Bifidobacterium* usadas para la producción del alimento fermentado de la presente invención y contenidas en el mismo no se limitan particularmente, siempre y cuando sean microorganismos que pertenezcan al género *Bifidobacterium*. Los ejemplos preferidos incluyen miembros de la mayor flora intestinal de los seres humanos tales como *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, y *Bifidobacterium angulatum* y *Bifidobacterium* aislado o derivado de los intestinos de los seres humanos y *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium animalis* usados para alimentos. Se prefieren particularmente entre estas bacterias de *Bifidobacterium* desde el punto de vista del efecto de mejora de la viabilidad cuando se usan junto con el extracto la *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum*, y, se prefieren más la *Bifidobacterium breve* YIT12272 (FERM BP-11320 depositada el 16 de febrero de 2010), *Bifidobacterium breve* YIT4065 (FERM BP-6223, depositada el 29 de febrero de 1996), *Bifidobacterium breve* YIT10001 (FERM BP-8205, depositada el 14 de agosto de 2001), *Bifidobacterium bifidum* YIT4007 (FERM BP-791, depositada: 1 de mayo de 1981) y *Bifidobacterium bifidum* YIT10347 (FERM BP-10613, depositada el 23 de junio de 2005).

El efecto de mejora de la viabilidad de las bacterias de *Bifidobacterium* en el alimento fermentado de la presente invención con el uso de la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee puede mejorarse adicionalmente conteniendo microorganismos aparte de las bacterias de *Bifidobacterium*, particularmente las bacterias ácido lácticas en el alimento fermentado con las bacterias de *Bifidobacterium*. Los ejemplos de dichos microorganismos incluyen bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* (tales como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie bulgaricus, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie delbrueckii y *Lactobacillus johnsonii*), el género *Streptococcus* (tales como *Streptococcus thermophilus*), el género *Lactococcus* (tales como *Lactococcus lactis* subespecie lactis, *Lactococcus lactis* subespecie cremoris, *Lactococcus plantarum* y *Lactococcus raffinolactis*) y el género *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*). Entre estas bacterias ácido lácticas se prefieren *Lactococcus lactis* y/o *Streptococcus thermophilus*, y, más preferentemente *Lactococcus lactis* YIT2027 (FERM BP-6224, depositada el 10 de febrero de 1997) y/o *Streptococcus thermophilus* YIT2021 (FERM BP-7537, depositada el 1 de noviembre de 1996).

Las bacterias indicadas anteriormente con las fechas de depósito se depositan en The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary (1-chuo, dai-6, 1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8566, Japón).

El efecto de mejora de la viabilidad de las bacterias de *Bifidobacterium* con la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee en el alimento fermentado de la presente invención puede mejorar enormemente cuando el recuento de bacterias de *Bifidobacterium* en el alimento fermentado en el momento de producción del alimento fermentado es 1×10^7 ufc/ml o más, particularmente 1×10^8 ufc/ml o más.

El alimento fermentado de la presente invención puede producirse de acuerdo con métodos conocidos de producción del alimento fermentado que usa las bacterias de *Bifidobacterium*, excepto por la adición de la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee en cualquier etapa de la producción del alimento fermentado que usa las bacterias de *Bifidobacterium*. En un método de producción ejemplar del alimento fermentado, la esencia de *Rubus suavissimus* S.

Lee se añade antes o después de la esterilización de una solución de leche desnatada en polvo, y se inoculan y cultivan las bacterias de *Bifidobacterium* u otros microorganismos deseados. Después el producto se homogeniza para obtener una base de leche fermentada, y se añade y mezcla una solución de jarabe preparada por separado. Finalmente, se añaden un sabor u otros ingredientes para obtener el producto final. En otro método ejemplar, las bacterias de *Bifidobacterium* u otros microorganismos deseados se inoculan y cultivan en una solución de leche desnatada en polvo esterilizada. Después el producto se homogeniza para obtener una base de leche fermentada, y se añaden y mezclan una solución de jarabe preparada por separado y la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee. Finalmente, se añaden un sabor u otros ingredientes para obtener el producto final. Cuando el alimento fermentado de la presente invención contiene las bacterias de *Bifidobacterium* y las bacterias ácido lácticas, puede usarse un cultivo mezclado de las bacterias de *Bifidobacterium* y las bacterias ácido lácticas para la producción del alimento fermentado, o estas bacterias pueden cultivarse por separado, y después mezclarse y usarse para la producción del alimento fermentado.

Como se usa en el presente documento, un "alimento fermentado" abarca productos especificados por la orden ministerial para los productos lácteos, incluyendo bebidas (tales como leche fermentada y bebidas lácteas con bacterias ácido lácticas), yogur firme, yogur blando, yogur natural, kéfir y queso. El alimento fermentado de la presente invención también abarca diversos tipos de alimentos y bebidas que usan bacterias ácido lácticas, tales como leche fermentada, bebida con bacterias ácido lácticas, kéfir y queso de clases tales como un tipo sencillo, un tipo saborizado, un tipo con fruta, un tipo dulce, un tipo blando, un tipo para beber, un tipo sólido (duro) y un tipo congelado.

El alimento fermentado de la presente invención puede contener edulcorantes tales como jarabes, y otros materiales alimenticios, por ejemplo, cualquiera de los componentes tales como diversos azúcares, espesantes, emulsionantes y diversas vitaminas, según se requiera. Los ejemplos específicos de tales materiales alimenticios incluyen azúcares tales como sacarosa, glucosa, fructosa, palatinosa, trehalosa, lactosa, xilosa y maltosa; alcoholes de azúcar tales como sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, Palatinit, jarabe de almidón reducido y jarabe de maltosa de almidón reducido; edulcorantes de alta intensidad tales como aspartamo, taumatina, sucralosa, acesulfamo K y stevia; diversos espesantes (estabilizadores) tales como agar, gelatina, carragenano, goma guar, goma xantana, pectina, goma de algarrobo, goma gellan, carboximetilcelulosa, polisacáridos de soja y alginato de propilenglicol; emulsionantes tales como éster de ácido graso con sacarosa, éster de ácido graso con glicerina, éster de ácido graso con poliglicerina, éster de ácido graso con sorbitano y lecitina; grasas lácteas, tales como crema, mantequilla y crema agria; acidulantes tales como ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, ácido málico, ácido tartárico y ácido glucónico; vitaminas tales como vitamina A, vitamina B, vitamina C y vitamina E; minerales tales como calcio, magnesio, cinc, hierro y manganeso; y diversos sabores de yogur, fruta del bosque, naranja, membrillo, perilla, cítricos, manzana, menta, uva, albaricoque, pera, crema pastelera, melocotón, melón, plátano, productos tropicales, hierbas, té negro y café.

El alimento fermentado de la presente invención obtenido como anteriormente puede mantener una tasa de viabilidad de bacterias de *Bifidobacterium* del 20 % o más, y/o un recuento de bacterias viables de $1,5 \times 10^8$ ufc/ml, preferentemente 2×10^8 ufc/ml incluso después de almacenarse a 10 °C durante 21 días, y el alimento no tiene el amargor derivado del *Rubus suavissimus* S. Lee, y es deseable en términos de sabor. La tasa de viabilidad puede determinarse de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos a continuación.

Ejemplos

La presente invención se describe a continuación en más detalle usando Ejemplos. Debe mencionarse, sin embargo, que la presente invención no se limita de ningún modo mediante los siguientes Ejemplos.

Ejemplo de referencia 1

Producción de extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (1)

Tras el tratamiento de las hojas de *Rubus suavissimus* S. Lee mediante procesos tales como trituración, se añadió agua en una cantidad de 15 veces la cantidad de las hojas de *Rubus suavissimus* S. Lee. Después de ajustar el pH a 3,8 mediante la adición de ácido cítrico en una cantidad equivalente al 5 % de las hojas de *Rubus suavissimus* S. Lee, la muestra se extrajo a 20 °C durante 60 minutos, y el extracto resultante se concentró cinco veces con un evaporador para obtener un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee de 13 Brix.

Ejemplo 1

Producción de esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (1)

Tras el tratamiento de las hojas de *Rubus suavissimus* S. Lee mediante procesos tales como trituración, se añadió agua en una cantidad de 15 veces la cantidad de las hojas de *Rubus suavissimus* S. Lee. Después de ajustar el pH a 3,8 mediante la adición de ácido cítrico en una cantidad equivalente al 5 % de las hojas de *Rubus suavissimus* S. Lee, la muestra se extrajo a 20 °C durante 60 minutos. Después se añadió cloruro de magnesio hexahidratado al

extracto de manera que la concentración de cloruro de magnesio era de 0,05 moles/l. La mezcla se cargó en las cámaras de desalinización de un electrodializador (membrana de electrodialisis: AC220-50; Microacilyzer S-3, Astom), y se cargó agua equivalente al 17 % del extracto en las cámaras de concentración. El proceso de electrodialisis se continuó hasta que las conductividades eléctricas de las cámaras de desalinización alcanzaron el equilibrio (2 miliSiemens por centímetro (mS/cm)), y se recogió el concentrado. Adicionalmente el concentrado se concentró cinco veces con un evaporador, y se obtuvo una esencia 1 de *Rubus suavisissimus* S. Lee de 12 Brix.

Ejemplo 2

Producción del producto lácteo (1)

Se añadió un 0,2 % de esencia 1 de *Rubus suavisissimus* S. Lee preparada en el Ejemplo 1 a un medio de leche desnatada en polvo al 20 % preparado como medio basal, y se esterilizó por calor a 120 °C durante 3 segundos para preparar un medio de cultivo. El medio se inoculó con un cultivo iniciador de *Bifidobacterium breve* YIT12272 (1 %), un cultivo iniciador de *Lactococcus lactis* YIT2027 (0,1 %) y un cultivo iniciador de *Streptococcus thermophilus* YIT2021 (0,01 %) y se cultivó a 37 °C durante 24 horas para obtener un cultivo. El cultivo se homogenizó a 15 MPa, y 60 partes en masa de una solución de azúcar al 10 % que se esterilizó a 100 °C durante 5 minutos se añadieron a 40 partes en masa del cultivo homogenizado. Después se añadió un ingrediente saborizante de yogur al 0,1 % (producto de Kabushiki Kaisha Yakult Material) para producir un producto lácteo. Para la comparación, se produjo un producto lácteo de la misma manera que anteriormente, excepto por el uso de un medio preparado añadiendo un extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee (0,2 %) al medio basal, en lugar de la esencia 1 de *Rubus suavisissimus* S. Lee. Las concentraciones de la esencia 1 de *Rubus suavisissimus* S. Lee y el extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee en los productos lácteos eran del 0,08 %.

El recuento de bacterias viables (ufc/ml) en el producto lácteo se midió en la producción y después el producto se almacenó a 10 °C durante 21 días, usando un medio TOS (Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.). También se determinó la tasa de viabilidad de las bacterias de *Bifidobacterium* de acuerdo con la ecuación a continuación. Los resultados se presentan en la Tabla 1. El producto lácteo también se evaluó para el sabor por tres panelistas entrenados de acuerdo con los siguientes criterios. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Ecuación 1

Tasa de viabilidad (%) = $\frac{\text{recuento de bacterias viables tras el almacenamiento}}{\text{recuento de bacterias viables en la producción}} \times 100$

Criterios de evaluación del sabor	
Puntuación	Descripción
5:	Sin amargor
4:	Casi sin amargor
3:	Ligero amargor
2:	Amargo
1:	Amargor fuerte

Tabla 1

Aditivo	Recuento de células viables en la producción (ufc/ml)	Recuento de células viables tras el almacenamiento (ufc/ml)	Tasa de viabilidad (%)	Sabor
Ninguno	$8,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	16	5
Extracto de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee	$8,9 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	40	2
Esencia 1 de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee	$9,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	42	5

Como se ve claro a partir de la Tabla 1, tanto los productos lácteos que contienen el extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee como la esencia 1 de *Rubus suavisissimus* S. Lee tenían tasas de viabilidad aumentadas para las bacterias de *Bifidobacterium* comparado con el producto lácteo preparado con solo el medio basal. También se encontró que la esencia 1 de *Rubus suavisissimus* S. Lee produjo un buen sabor sin amargor en el producto lácteo, a pesar de que se añadió en una cantidad que mejora la tasa de viabilidad más que el extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee.

Ejemplo 3

Producción de esencia de *Rubus suavisissimus* S. Lee (2)

Las esencias 2 a 5 de *Rubus suavisissimus* S. Lee se produjeron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usó cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio dihidratado o citrato de tripotasio monohidratado en

lugar del cloruro de magnesio hexahidratado, y se añadió para fabricar la concentración anhidra de 0,05 moles/l.

Ejemplo 4

5 Producción del producto lácteo (2)

Los productos lácteos se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 2, excepto que se usaron las esencias 2 a 5 de *Rubus suavisissimus* S. Lee producidas en el Ejemplo 3 en lugar de la esencia 1 de *Rubus suavisissimus* S. Lee en la misma cantidad. Estos productos lácteos se midieron para el recuento de bacterias viables en la producción y tras el almacenamiento a 10 °C durante 21 días de la misma manera que en el Ejemplo 2. También se determinó la tasa de viabilidad, y se evaluó el sabor. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

Aditivo	Sal inorgánica o sal orgánica	Recuento de células viables en la producción (ufc/ml)	Recuento de células viables tras el almacenamiento (ufc/ml)	Tasa de viabilidad (%)	Sabor
Ninguno	Ninguna	$8,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^5$	16	5
Esencia 1 de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee	Cloruro de magnesio	$9,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^5$	42	5
Esencia 2 de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee	Cloruro de sodio	$7,8 \times 10^8$	$1,3 \times 10^5$	17	4
Esencia 3 de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee	Cloruro de potasio	$8,5 \times 10^8$	$1,9 \times 10^5$	22	5
Esencia 4 de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee	Cloruro de calcio	$8,3 \times 10^8$	$2,5 \times 10^5$	30	4
Esencia 5 de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee	Citrato de tripotasio	$7,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^5$	16	5

- 15 Como se ve claro a partir de la Tabla 2, la esencia de *Rubus suavisissimus* S. Lee obtenida añadiendo cloruro de magnesio tenía un efecto superior de mejora de la viabilidad que las esencias de *Rubus suavisissimus* S. Lee obtenidas añadiendo otras sales. El efecto de mejora de la viabilidad no se obtuvo mediante la adición de la sal orgánica citrato de tripotasio.

20 Ejemplo 5

Producción de esencia de *Rubus suavisissimus* S. Lee (3)

- 25 Las esencias 6 a 10 de *Rubus suavisissimus* S. Lee se produjeron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usó cloruro magnesio hexahidratado para fabricar la concentración de cloruro de magnesio de 0,01, 0,02, 0,1, 0,2 o 0,5 moles/l, respectivamente, en lugar de 0,05 moles/l.

Ejemplo 6

30 Producción del producto lácteo (3)

Los productos lácteos se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 2, excepto que se usaron las esencias 6 a 10 de *Rubus suavisissimus* S. Lee producidas en el Ejemplo 5 en lugar de la esencia 1 de *Rubus suavisissimus* S. Lee en la misma cantidad. Estos productos lácteos se midieron para el recuento de bacterias viables en la producción y tras el almacenamiento a 10 °C durante 21 días de la misma manera que en el Ejemplo 2. También se determinó la tasa de viabilidad, y se evaluó el sabor. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3

Aditivo	Cantidad de cloruro de magnesio añadida (moles/l)	Recuento de células viables en la producción (ufc/ml)	Recuento de células viables tras el almacenamiento (ufc/ml)	Tasa de viabilidad (%)	Sabor
Ninguno	0	$8,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^5$	16	5
Esencia 6 de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee	0,01	$8,5 \times 10^8$	$1,9 \times 10^5$	22	5
Esencia 7 de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee	0,02	$9,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^5$	31	5
Esencia 1 de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee	0,05	$9,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^5$	42	5

Aditivo	Cantidad de cloruro de magnesio añadida (moles/l)	Recuento de células viables en la producción (ufc/ml)	Recuento de células viables tras el almacenamiento (ufc/ml)	Tasa de viabilidad (%)	Sabor
Esencia 8 de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee	0,1	$8,8 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	42	5
Esencia 9 de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee	0,2	$8,4 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	44	4
Esencia 10 de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee	0,5	$9,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	42	3

Como se ve claro a partir de la Tabla 3, el efecto de mejora de la viabilidad para las bacterias de *Bifidobacterium* tenía la tendencia a aumentar enormemente con el uso de las esencias de *Rubus suavisissimus* S. Lee obtenidas como concentrados en la electrodialisis realizada añadiendo cloruro de magnesio al extracto de *Rubus suavisissimus* S. Lee, particularmente las esencias de *Rubus suavisissimus* S. Lee que contenían cloruro de magnesio a 0,02 moles/l o más. También se encontró que la adición de cloruro de magnesio no tiene efectos adversos en el sabor cuando se añade a 0,2 moles/l o menos. El efecto de mejora de la viabilidad era particularmente notorio, y el sabor era deseable en las muestras que contenían cloruro de magnesio de 0,05 moles/l a 0,1 moles/l.

Ejemplo 7

Producción del producto lácteo (4)

Se añadió la esencia 1 de *Rubus suavisissimus* S. Lee preparada en el Ejemplo 1 a un medio de leche desnatada en polvo al 20 % al 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 o 0,5 % y se esterilizó por calor a 120 °C durante 3 segundos para preparar un medio de cultivo. Cada medio se inoculó con un cultivo iniciador de *Bifidobacterium breve* YIT12272 (1 %) y un cultivo iniciador de *Lactococcus lactis* YIT2027 (0,01 %), y se cultivó a 37 °C durante 24 horas para obtener un cultivo A. De manera separada, se inoculó un medio de leche desnatada en polvo al 16 % con un cultivo iniciador de *Streptococcus thermophilus* YIT2021 (0,5 %), y se cultivó a 37 °C durante 24 horas para obtener un cultivo B. Adicionalmente, se disolvieron en agua jarabe de almidón de maltosa reducido (8 %), polidextrosa (4 %), azúcar líquido de galactooligosacárido (4 %), pectina (0,5 %), péptido de colágeno (0,2 %), preparación de vitamina B (0,05 %), sucralosa (0,007 %), hierro emulsionado (fosfato de hierro; 0,6 %), y se esterilizaron a 121 °C durante 3 segundos para obtener un jarabe.

El cultivo A y el cultivo B se homogeneizaron cada uno a 15 MPa, y 10 partes en masa del cultivo A y 40 partes en masa del cultivo B se mezclaron con 50 partes en masa del jarabe. Después, se añadieron tres ingredientes saborizantes de yogur diferentes ((Ogawa & Co., Ltd., T. Hasegawa Co., Ltd., y Yakult Material) a la mezcla en un total de 0,1 % para producir los productos lácteos. Las concentraciones de la esencia 1 de *Rubus suavisissimus* S. Lee en estos productos lácteos eran del 0,001, 0,002, 0,005, 0,01, 0,02 y 0,05 %.

Los productos lácteos se midieron para el recuento de bacterias viables de *Bifidobacterium breve* en la producción y tras un periodo de almacenamiento de 21 días, a 10 °C de la misma manera que en el Ejemplo 2. También se determinó la tasa de viabilidad, y se evaluó el sabor. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4

	Concentración de esencia 1 de <i>Rubus suavisissimus</i> S. Lee en el producto lácteo	Recuento de células viables en la producción (ufc/ml)	Recuento de células viables tras el almacenamiento (ufc/ml)	Tasa de viabilidad (%)	Sabor
Medio basal	0	$8,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	16	5
Medio de cultivo	0,001	$8,4 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	24	5
Medio de cultivo	0,002	$8,1 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	30	5
Medio de cultivo	0,005	$8,5 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	36	5
Medio de cultivo	0,01	$8,9 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	38	5
Medio de cultivo	0,02	$9,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	42	5
Medio de cultivo	0,05	$8,7 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	38	3

Como se ve claro a partir de la Tabla 4, la adición de la esencia de *Rubus suavisissimus* S. Lee logró el efecto de mejora de la viabilidad para las bacterias de *Bifidobacterium* sin tener casi ninguno efecto adverso en el sabor del producto lácteo. Particularmente, se encontró que la adición de la esencia de *Rubus suavisissimus* S. Lee (12 Brix) a concentraciones del 0,002 al 0,02 % en los productos lácteos produce productos lácteos que tienen una alta viabilidad y un sabor deseable.

Ejemplo 8

Producción del producto lácteo (5)

- 5 Los productos lácteos se produjeron de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que se usó la *Bifidobacterium breve* YIT4065 en lugar de la *Bifidobacterium breve* YIT12272. Como con el caso de los productos lácteos obtenidos en el Ejemplo 7, los productos lácteos tenían un efecto de mejora de la viabilidad mejorado para las bacterias de *Bifidobacterium* mediante la adición de la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee, sin tener casi ningún efecto adverso en el sabor de los productos lácteos.

10

Ejemplo 9

Producción del producto lácteo (6)

- 15 Los productos lácteos se produjeron de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que se usó la *Bifidobacterium breve* YIT10001 en lugar de la *Bifidobacterium breve* YIT12272. Como con el caso de los productos lácteos obtenidos en el Ejemplo 7, los productos lácteos tenían un efecto de mejora de la viabilidad mejorado para las bacterias de *Bifidobacterium* mediante la adición de la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee, sin tener casi ningún efecto adverso en el sabor de los productos lácteos.

20

Ejemplo 10

Producción del producto lácteo (7)

- 25 Los productos lácteos se produjeron de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que se usó la *Bifidobacterium bifidum* YIT4007 en lugar de la *Bifidobacterium breve* YIT12272. Como con el caso de los productos lácteos obtenidos en el Ejemplo 7, los productos lácteos tenían un efecto de mejora de la viabilidad mejorado para las bacterias *Bifidobacterium* mediante la adición de la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee, sin tener casi ningún efecto adverso en el sabor de los productos lácteos.

30

Ejemplo 11

Producción del producto lácteo (8)

- 35 Los productos lácteos se produjeron de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que se usó la *Bifidobacterium bifidum* YIT10347 en lugar de la *Bifidobacterium breve* YIT12272. Como con el caso de los productos lácteos obtenidos en el Ejemplo 7, los productos lácteos tenían un efecto de mejora de la viabilidad mejorado para las bacterias de *Bifidobacterium* mediante la adición de la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee, sin tener casi ningún efecto adverso en el sabor de los productos lácteos.

40

Utilidad industrial

El alimento fermentado de la presente invención puede proporcionar diversos efectos de las bacterias de *Bifidobacterium* y puede contribuir a la salud del ser humano.

45

REIVINDICACIONES

1. Un alimento fermentado que comprende:

5 una esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee que se obtiene como un concentrado a través de la electrodiálisis de un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee añadido con una sal inorgánica; y bacterias del género *Bifidobacterium*.

10 2. El alimento fermentado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sal inorgánica es al menos una seleccionada de sal de potasio, sal de sodio, sal de calcio y sal de magnesio.

3. El alimento fermentado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sal inorgánica es sal de magnesio.

15 4. El alimento fermentado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la sal inorgánica se añade de 0,02 a 0,2 moles/l.

20 5. Un método para la producción de un alimento fermentado que contiene bacterias del género *Bifidobacterium*, el método que comprende mezclar una esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee, que se obtiene como un concentrado a través de la electrodiálisis de un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee añadido con una sal inorgánica, con el alimento fermentado en cualquier etapa de la producción del alimento fermentado.