

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 065**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2013 PCT/JP2013/058911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13146836**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2013 E 13768123 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2843038**

54 Título: **Cultivo de Lactobacillus y procedimiento de producción del mismo**

30 Prioridad:

27.03.2012 JP 2012070473

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

17.08.2017

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;
MATSUI AKIHISA y
SUZUKI TAKAO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

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

ES 2 630 065 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

Cultivo de *Lactobacillus* y procedimiento de producción del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un producto de cultivo de bacterias lácticas que se obtiene cultivando una bacteria láctica, así como a un procedimiento de producción de la misma.

10 **Técnica anterior**

El cultivo de bacterias lácticas se ha llevado a cabo de diversas maneras y se lleva a cabo a menudo utilizando leche animal como medio de cultivo para la producción de formulaciones de bacterias lácticas o la producción de leche fermentada, bebidas con bacterias lácticas, queso y similares. Sin embargo, puesto que, en general, las necesidades nutricionales de las bacterias lácticas varían entre las especies, algunas bacterias lácticas pueden no crecer suficientemente en un medio de cultivo que consiste únicamente en leche animal. Además, incluso cuando se utilizan cepas bacterianas que exhiben una actividad de proliferación relativamente más alta en dicho medio de cultivo que consiste únicamente en leche animal, es necesario llevar a cabo el cultivo de las bacterias durante varios días con el fin de obtener productos fermentados con un nivel de ácido láctico suficiente en la producción de leche fermentada, bebidas con bacterias lácticas y similares.

Sin embargo, puesto que el cultivo de bacterias lácticas durante un largo período de tiempo causa una reducción en el recuento de células viables, dicha técnica de cultivo no siempre se considera como un procedimiento de cultivo favorable para la producción de bebidas con bacterias lácticas, leche fermentada y similares en los que se esperan diversos efectos fisiológicos y para los que se considera importante el recuento de células viables.

Además, para la producción de diversas bebidas o alimentos en los que los sabores de los productos fermentados obtenidos mediante el cultivo de bacterias lácticas se consideran críticos, las cepas bacterianas utilizadas en el mismo no se pueden seleccionar únicamente desde el punto de vista de sus capacidades proliferativas. En consecuencia, hay casos en los que se seleccionan y utilizan bacterias lácticas que proporcionan productos fermentados que tienen buen sabor, incluso si sus capacidades proliferativas son inferiores.

Por lo tanto, en el cultivo de bacterias lácticas, una técnica ordinaria consiste en la adición previa de varias sustancias promotoras de crecimiento a los medios de cultivo con el fin de mejorar las eficiencias de cultivo, y dicha técnica es bien conocida. En general, como ejemplos de sustancias que se han considerado eficaces como promotoras del crecimiento se pueden mencionar extractos de *Chlorella*, sales de hierro, vitaminas, productos de digestión de proteínas que contienen aminoácidos o péptidos, extractos de levadura y similares.

El presente solicitante también ha informado de la adición de un extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* o similares a los medios de cultivo con el fin de aumentar las capacidades proliferativas o la capacidad de supervivencia en el cultivo de bacterias lácticas (Documento de Patente 1).

Sin embargo, en productos como la leche fermentada a la que ha añadido un extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)*, aunque se podía aumentar la capacidad proliferativa o capacidad de supervivencia de las bacterias lácticas, los productos presentaban amargor derivado del *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* y, por lo tanto, tenían un problema de sabor.

Lista de citas

50 Documentos de Patente

Documento de patente 1: WO2006/126476

55 **Sumario de la invención**

Problema técnico

De acuerdo con ello, un objetivo de la presente invención es proporcionar una técnica para mejorar los sabores de los productos manteniendo al mismo tiempo el efecto de un extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* para aumentar la capacidad proliferativa o la capacidad de supervivencia de bacterias lácticas en su cultivo.

Solución al problema

65 La presente invención se refiere a un producto de cultivo de bacterias lácticas que se obtiene cultivando una bacteria láctica en un medio de cultivo, en el que el medio de cultivo contiene una esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* que es un concentrado obtenido mediante electrodiálisis de una mezcla obtenida por adición de una sal

inorgánica a un extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* que se ha obtenido mediante extracción ácida, en el que las bacterias lácticas son bacterias anaerobias facultativas, y en el que la sal inorgánica es al menos una seleccionada entre una sal de potasio, una sal de sodio, una sal de calcio y una sal de magnesio.

5 Además, la presente invención se refiere a un producto lácteo fermentado, que comprende dicho producto de cultivo de bacterias lácticas.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un producto lácteo fermentado que comprende mezclar dicho producto de cultivo de bacterias lácticas con materiales auxiliares.

10 Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de cultivo de bacterias lácticas, en el que el procedimiento comprende: mezclar una esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* en un medio de cultivo en una etapa arbitraria en la producción del producto de cultivo de bacterias lácticas que se obtiene cultivando una bacteria láctica en el medio de cultivo, en el que la esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* es un concentrado obtenido mediante electrodiálisis de una mezcla obtenida por adición de una sal inorgánica a un extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* que se ha obtenido mediante extracción ácida, en el que las bacterias lácticas son bacterias anaerobias facultativas, y en el que la sal inorgánica es al menos una seleccionada entre una sal de potasio, una sal de sodio, una sal de calcio y una sal de magnesio.

20 Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para promover el crecimiento de una bacteria láctica, en el que el procedimiento incluye mezclar una esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* en un medio de cultivo, en el que la esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* es un concentrado obtenido mediante electrodiálisis de una mezcla obtenida por adición de una sal inorgánica a un extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* que se ha obtenido mediante extracción ácida, y cultivo de la bacteria láctica en el medio de cultivo, en el que las bacterias lácticas son bacterias anaerobias facultativas, y en el que la sal inorgánica es al menos una seleccionada entre una sal de potasio, una sal de sodio, una sal de calcio y una sal de magnesio.

Efectos ventajosos de la invención

30 En el producto de cultivo de bacterias lácticas de acuerdo con la presente invención, la capacidad proliferativa y la capacidad de supervivencia de las bacterias lácticas se incrementan debido a la adición de una esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* que es un concentrado obtenido mediante electrodiálisis de una mezcla obtenida por adición de una sal inorgánica a un extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)*, durante el cultivo de bacterias lácticas. En consecuencia, el recuento de células viables en el producto de cultivo es mayor, mientras que se mantendrá un recuento de células viables más alto y, además, el producto de cultivo no presenta amargor derivado del *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* y, por lo tanto, tiene un mejor sabor.

40 Por consiguiente, el producto de cultivo de bacterias lácticas de acuerdo con la presente invención no tiene ningún problema de sabor y se puede utilizar para obtener diversos productos lácteos fermentados. Además, en dichos productos lácteos fermentados, el deterioro de los sabores o las reducciones en los recuentos de células viables apenas se producen durante el almacenamiento y, por lo tanto, los productos lácteos fermentados son muy valiosos y son útiles para mejorar la salud.

Descripción de modos de realización

45 El producto de cultivo de bacterias lácticas de la presente invención se obtiene cultivando una bacteria láctica en un medio de cultivo, en el que el medio de cultivo contiene una esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)*, en el que la esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* es un concentrado obtenido mediante electrodiálisis de una mezcla obtenida por adición de una sal inorgánica a un extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)*.

50 La esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* que se utiliza para obtener el producto de cultivo de bacterias lácticas mencionado anteriormente y que es un concentrado obtenido mediante electrodiálisis de una mezcla obtenida por adición de una sal inorgánica a un extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* se puede obtener de la siguiente manera. En primer lugar, hojas o tallos (preferentemente hojas) de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* pertenecientes al género *Rubus* de la familia *Rosaceae* se someten a una extracción con disolvente sin ningún tratamiento o se someten a tratamientos tales como lavado, pelado, secado y trituración, si se desea, y luego se someten a una extracción con disolvente, obteniendo así el extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)*.

60 El disolvente utilizado para la producción del extracto anterior de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* no se limita particularmente y, por ejemplo, se puede mencionar agua o disolventes orgánicos tales como alcoholes inferiores C₁-C₅ (por ejemplo, etanol), acetato de etilo, glicerina y propilenglicol. Estos disolventes se pueden usar singularmente, o se pueden mezclar dos o más de los disolventes. Entre estos disolventes, son particularmente preferentes el agua o disolventes acuosos tales como agua / alcoholes inferiores.

65 El procedimiento de extracción del extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* utilizando el disolvente anteriormente descrito es una extracción ácida. El procedimiento de extracción ácida se lleva a cabo

preferentemente bajo una condición ácida de un pH de 4,0 o inferior, más preferentemente de un pH de 3,0 a 4,0. Para el componente ácido utilizado para ajustar el pH del disolvente en la realización de la extracción ácida, se puede utilizar cualquier sustancia sin limitaciones particulares siempre que la sustancia sea ácida. Como ejemplos preferentes de los mismos, se pueden mencionar ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido láctico y ácido acético.

Además, las condiciones para la extracción del extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) utilizando el disolvente anteriormente descrito no se limitan particularmente y, por ejemplo, es preferente que el tratamiento de extracción se lleve a cabo 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 suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) obtenido de este modo se somete a filtración, centrifugación y similares, si se desea, y luego se añade una sal inorgánica; a continuación, la mezcla resultante se somete a electrodiálisis.

La sal inorgánica añadida al extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) es al menos una seleccionada entre una sal de potasio tal como cloruro de potasio, una sal de sodio tal como cloruro de sodio, una sal de calcio tal como cloruro de calcio, y una sal de magnesio tal como cloruro de magnesio. Entre estas sales inorgánicas, es preferente una sal de magnesio, y el cloruro de magnesio es más preferente. La cantidad de la sal inorgánica añadida al extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) no se limita particularmente, pero es preferente de 0,01 a 0,5 mol/l y más preferente de 0,02 a 0,2 mol/l, en términos de anhídrido. Estas sales inorgánicas pueden ser hidratos o anhídridos.

Con respecto al electrodiálizador utilizado para la electrodiálisis, se puede mencionar, por ejemplo, un electrodiálizador en el que una región entre un cátodo y un ánodo se divide alternativamente con una pluralidad de membranas de intercambio catiónico y una pluralidad de membranas de intercambio aniónico y, por tanto, se proporcionan una cámara de cátodo, una cámara de ánodo, una pluralidad de cámaras de desalación y una pluralidad de cámaras de concentración. En dicho electrodiálizador se obtiene una solución de concentrado en la que se concentran sustancias iónicas y una disolución desalada en la que se han eliminado las sustancias iónicas. Es decir, las regiones que se dividen cada una con las membranas de intercambio catiónico situadas cada una en el lado en el que el cátodo está presente y las membranas de intercambio aniónico situadas cada una en el lado opuesto en el que el ánodo está presente se corresponden con las cámaras de concentración y cada líquido que se somete a reflujo en cada cámara de concentración se corresponde con la solución concentrada. Además, las regiones que se dividen cada una con las membranas de intercambio aniónico situadas cada una en el lado en el que el cátodo está presente y las membranas de intercambio catiónico situadas cada una en el lado opuesto en el que el ánodo está presente se corresponden con las cámaras de desalación y cada líquido que se somete a reflujo en cada cámara de desalación se corresponde con la solución desalada. Existen electrodiálizadores comercialmente disponibles, por ejemplo, con nombres comerciales como "ACILYZER" (ASTOM Corporation) y similares, y dichos electrodiálizadores comercialmente disponibles también se pueden utilizar.

La esencia anteriormente descrita de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) se puede obtener de la siguiente manera. Es decir, el extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) al que se ha añadido una sal inorgánica se somete a reflujo en una cámara de desalación de un electrodiálizador, mientras que el agua o similar se somete a reflujo en una cámara de concentración, para llevar a cabo el tratamiento de electrodiálisis, y el concentrado resultante se recoge como la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*). Las condiciones para la electrodiálisis no se limitan particularmente. Por ejemplo, se puede mencionar un procedimiento en el que, mientras que una cantidad de agua equivalente a un 5 % a un 50 % (preferentemente un 10 % a un 30 %) en masa (en lo sucesivo, simplemente denominado "%") del extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) se somete a reflujo en la cámara de concentración, se aplica una tensión de 10 a 200 V, preferentemente de 50 a 100 V, a la región situada entre el ánodo y el cátodo, y se pasa una corriente eléctrica de 10 a 200 A, preferentemente de 50 a 100 A, a través de la región para llevar a cabo el tratamiento de electrodiálisis hasta que la conductividad eléctrica en la cámara de desalación alcanza el equilibrio (2 milisiemens por centímetro (mS/cm)) y, a continuación, se recoge un concentrado para obtener la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*). Para el líquido que se somete a reflujo en la cámara de concentración, además de agua, por ejemplo, también se puede usar una solución de electrolitos tal como una solución de salmuera o una solución acuosa de ácido cítrico.

En cuanto a la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) obtenida de la manera anteriormente descrita, se puede usar la esencia obtenida directamente de la electrodiálisis; o la esencia resultante de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) se puede someter a un procedimiento de purificación / concentración por ultrafiltración, centrifugación o similar, y se puede usar el producto purificado / concentrado así obtenido. Alternativamente, el producto purificado / concentrado se puede secar adicionalmente por medio de secado por pulverización, liofilización o similar, y se puede usar el producto en polvo así obtenido.

La cantidad de la esencia anteriormente descrita de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) añadida al medio de cultivo en el que pueden crecer bacterias lácticas no se limita particularmente. Por ejemplo, en cuanto a una esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) que presenta un Brix de 12, la concentración de la esencia en el medio de

cultivo es de un 0,01 % a un 1,0 %, preferentemente de un 0,01 % a un 0,5 %, más preferentemente de un 0,02 % a un 0,2 %. El valor Brix se refiere a un valor medido con un refractómetro digital tal como "RX-7000α" (ATAGO CO., LTD.).

5 Además, en cuanto a cuándo añadir la esencia anteriormente descrita de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) al medio de cultivo, es preferente que la esencia se añada antes de fermentar la bacteria láctica. Sin embargo, el momento de la adición no se limita a dicho momento, y la esencia se puede añadir al medio de cultivo incluso durante la fermentación de la bacteria láctica o después de la finalización de la fermentación de la bacteria láctica. Además, la esencia también se puede añadir al medio de cultivo más de una vez. En particular, la adición de la
10 esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) al medio de cultivo antes de la fermentación de la bacteria láctica es preferente, ya que el recuento de células y la capacidad de supervivencia después de completar el cultivo se pueden mantener en un nivel más alto.

15 Además, en cuanto al medio de cultivo al cual se añade la esencia anteriormente descrita de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*), se pueden mencionar medios de cultivo de leche animal que incluyen leche cruda (por ejemplo, leche de vaca, leche de cabra, leche de caballo y leche de oveja) o productos lácteos (por ejemplo, leche desnatada en polvo, leche entera en polvo y crema fresca); leche líquida derivada de plantas (por ejemplo, leche de soja); o diversos medios de cultivo sintéticos. Adicionalmente, ingredientes que se usan en medios de cultivo generales para bacterias lácticas se pueden añadir a los medios de cultivo mencionados anteriormente. Como ejemplos de tales
20 ingredientes, se pueden mencionar vitaminas tales como vitamina A, vitaminas del complejo B, vitamina C y vitamina E, diversos péptidos, aminoácidos, sales de calcio, magnesio y similares.

Adicionalmente, el ácido oleico o derivados del mismo se pueden añadir a los medios de cultivo descritos anteriormente. Como ejemplos de dicho ácido oleico o derivados del mismo, se pueden mencionar ácido oleico o derivados de ácido oleico tales como sales de ácido oleico (por ejemplo, oleato de sodio, oleato de potasio) y ésteres de ácido oleico tales como ésteres de glicerina y ácido oleico, ésteres de poliglicerina y ácido oleico o ésteres de sacarosa y ácido oleico. El ácido oleico o derivados del mismo se pueden añadir al medio de cultivo hasta una concentración final de aproximadamente 5 a 50 ppm, preferentemente de 5 a 25 ppm en términos de ácido
25 oleico.

30 La bacteria láctica que se cultiva con el fin de obtener el producto fermentado con bacterias lácticas de la presente invención no se limita particularmente, siempre y cuando sea una bacteria láctica generalmente usada para la fabricación de alimentos. Por ejemplo, se puede mencionar una bacteria perteneciente al género *Lactobacillus* (por ejemplo, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus cremoris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus yoghurti*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* y *Lactobacillus johnsonii*); una bacteria perteneciente al género *Streptococcus* (por ejemplo, *Streptococcus thermophilus*); una bacteria perteneciente al género *Lactococcus* (por ejemplo, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus plantarum* y *Lactococcus raffinolactis*) y una bacteria perteneciente al género *Enterococcus* (por ejemplo, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*). Entre estas bacterias lácticas, son preferentes una o más bacterias lácticas seleccionadas del grupo que consiste en una bacteria perteneciente al género *Lactobacillus*, una bacteria perteneciente al género *Streptococcus* y una bacteria perteneciente al género *Lactococcus*. Entre ellas, *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus gasseri* son preferentes, y *Lactobacillus casei* YIT9029 (FERM BP-1366, fecha de recepción: 12 de enero de 1981; el Organismo Internacional Depositario de la Patente, el Instituto Internacional de Tecnología y Evaluación (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, JAPÓN) es particularmente preferente. En la presente invención, el término "bacteria láctica (bacterias lácticas)" se refiere a una bacteria láctica que es una bacteria anaerobia facultativa y, por lo tanto, no incluye una bacteria perteneciente al género *Bifidobacterium* que es una bacteria anaerobia obligada.
40
45

50 Las condiciones para cultivar la bacteria láctica para obtener el producto fermentado con bacterias lácticas de la presente invención no se limitan particularmente. Por ejemplo, se pueden mencionar condiciones en las que la bacteria láctica se inocula en el medio de cultivo de tal manera que el recuento de bacterias en el medio de cultivo es de aproximadamente $1,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^9$ ufc/ml y luego la bacteria láctica se cultiva a aproximadamente 30 °C a 40 °C durante aproximadamente 1 a 7 días. Adicionalmente, en cuanto a la condición de cultivo en este caso, se
55 puede seleccionar apropiadamente una técnica que sea adecuada para cultivar una bacteria láctica usada en la misma entre cultivo estático, cultivo con agitación magnética, cultivo con agitación mecánica, cultivo con aireación y similares para llevar a cabo el cultivo de la bacteria láctica.

60 El producto fermentado con bacterias lácticas obtenido de esta manera exhibirá un recuento de células viables más alto y mantendrá dicho recuento de células viables más alto, sin presentar amargor derivado de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) y con un mejor sabor. A continuación, el producto fermentado con bacterias lácticas se puede utilizar solo como producto lácteo fermentado o se puede mezclar con otros materiales auxiliares que se pueden añadir a los productos lácteos fermentados generales, para preparar un producto lácteo fermentado final.

65 En la presente invención, el producto lácteo fermentado incluye leche de soja fermentada o leche fermentada definida en la Orden Ministerial Japonesa sobre Leche y Productos Lácteos con respecto a los Estándares de

Composición y similares; bebidas tales como bebidas lácteas con bacterias lácticas, yogur duro, yogur suave, yogur natural, incluso kéfir, queso y similares. Además, el producto lácteo fermentado de la presente invención incluye bebidas y alimentos que utilizan diversas bacterias lácticas e incluye leche fermentada, bebidas con bacterias lácticas, kéfir, queso y similares, por ejemplo de tipo natural, aromatizado, con frutas, de tipo edulcorado, tipo 5 blando, tipo bebible, tipo sólido (duro) o tipo congelado.

Estos productos lácteos fermentados se pueden obtener mezclando, además de agentes edulcorantes tales como jarabes, otros diversos materiales alimenticios (por ejemplo, ingredientes opcionales tales como diversos 10 carbohidratos, agentes espesantes, agentes emulsionantes o diversas vitaminas) con el producto fermentado con bacterias lácticas descrito anteriormente, según sea necesario. Como ejemplos de tales materiales alimenticios, se pueden mencionar carbohidratos tales como sacarosa, glucosa, fructuosa, palatinosa, trehalosa, lactosa, xilosa y maltosa; alcoholes de azúcar tales como sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, palatinol, jarabe de almidón reducido y jarabe de maltosa reducido; edulcorantes de alta intensidad tales como aspartamo, taumatina, sucralosa, acesulfamo K y 15 estevia; diversos agentes espesantes (estabilizantes) tales como agar, gelatina, carragenano, goma de guayacol, goma xantana, pectina, goma garrofín, goma gellan, carboximetilcelulosa, polisacáridos de soja y alginato de propilenglicol; agentes emulsionantes tales como ésteres de sacarosa y ácidos grasos, ésteres de glicerina y ácidos grasos, ésteres de poliglicerina y ácidos grasos, ésteres de sorbitano y ácidos grasos y lecitina; grasas de leche tales como nata, manteca y crema agria; ingredientes ácidos tales como ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, 20 ácido málico, ácido tartárico y ácido glucónico; diversas vitaminas tales como vitamina A, vitaminas del complejo B, vitamina C y vitamina E; minerales tales como calcio, magnesio, cinc, hierro y manganeso; y sabores tales como yogur, bayas, naranja, membrillo, perilla, cítrico, manzana, menta, uva, albaricoque, pera, crema de nata, melocotón, melón, banana, tropical, hierba, té negro o café.

El producto lácteo fermentado obtenido de esta manera tiene mejor sabor y, además, el deterioro en el sabor y una 25 reducción en el recuento de células viables apenas ocurren incluso durante el almacenamiento. Por lo tanto, el producto lácteo fermentado es muy valioso, y es útil para mejorar la salud.

Ejemplos

30 A continuación se describirá la presente invención con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se considera limitada a los ejemplos.

Ejemplo de referencia 1

35 Producción de un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*):

Hojas de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) se sometieron a tratamientos tales como trituración y, a continuación, a las hojas tratadas se añadieron 15 veces su volumen de agua y una cantidad de ácido cítrico 40 equivalente a un 5 % de las hojas, se ajustó el pH a 3,8 y se llevó a cabo una extracción a 20 °C durante 60 minutos. Además, la solución de extracción resultante se concentró 5 veces con un evaporador, obteniéndose así un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) que presentaba un Brix de 13.

Ejemplo de producción 1

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

Se añadió hexahidrato de cloruro de magnesio al extracto anterior de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) 50 obtenido mediante extracción a 20 °C durante 60 minutos hasta una concentración final de 0,05 mol/l. A continuación, la solución resultante se cargó en las cámaras de desalación de un electrodiálizador (membrana electrodialítica: AC220-50; nombre del producto: Micro Acilyzer-S-3; fabricante del equipo: ASTOM Corporation), mientras se cargaba una cantidad de agua equivalente a un 17 % del extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) en las cámaras de concentración; a continuación, se llevó a cabo un tratamiento de electrodiálisis hasta que la conductividad eléctrica en las cámaras de desalación alcanzó el equilibrio (específicamente, hasta que la 55 conductividad eléctrica alcanzó 2 milisiemens por centímetro (mS/cm) y se recogió un concentrado. Además, el concentrado se concentró 5 veces con un evaporador, obteniéndose así la Esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) 1. que presentaba un Brix de 12.

Ejemplo 1

60 Producción de un producto de cultivo (1)

Se utilizó una solución de leche desnatada en polvo al 10 % como medio base, se añadió un 0,2 % de Esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) 1 preparada en el Ejemplo de Producción 1 al medio base y el medio 65 resultante se sometió a esterilización térmica a 100 °C durante 15 minutos, preparando con ello un medio de cultivo. Se inoculó un 0,1 % de un iniciador de *Lactobacillus casei* (YIT9029) a medio de cultivo (recuento inicial de bacterias: $1,5 \times 10^6$ ufc/ml). El medio de cultivo inoculado se incubó a 37 °C durante 24 horas, y después se enfrió

por debajo de 10 °C, obteniéndose así un producto de cultivo. Además, para comparación, en lugar de la Esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) 1, se añadió un 0,2 % del extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) al medio base, obteniendo de este modo otro medio de cultivo, y se obtuvo otro producto de cultivo de la misma manera con este otro medio de cultivo.

Los valores de pH de los productos de cultivo se midieron con un medidor de pH (HORIBA F-52) y los recuentos de bacterias lácticas se midieron con medios de cultivo BCP (fabricados por EIKEN CHEMICAL CO., LTD). También se midió la acidez de los productos de cultivo (un título obtenido tomando 9 g del producto de cultivo y titulando ácidos orgánicos con una solución de hidróxido sódico 0,1 N hasta que el pH alcanzó 8,5; unidad: ml). Además, un panel de tres expertos evaluó los sabores de los productos lácteos resultantes basándose en los criterios de evaluación descritos a continuación y los resultados se muestran en la Tabla 1.

<Criterios de evaluación sobre sabores>

Puntuación	Contenido
5	: No se percibió ningún amargor.
4	: Se percibió poco amargor.
3	: Se percibió un ligero amargor.
2	: Se percibió el amargor.
1	: Se percibió un fuerte amargor.

[Tabla 1]

Aditivos	Valores de pH de los productos de cultivo	Acidez de los productos de cultivo	Recuento de células viables de los productos de cultivo (ufc/ml)	Sabor
Ninguno	5,40	3,7	$8,3 \times 10^8$	5
Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee (<i>Rosaceae</i>)	4,42	8,0	$6,6 \times 10^9$	2
Esencia de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee (<i>Rosaceae</i>) 1	4,40	8,1	$6,3 \times 10^9$	5

Como se desprende de la Tabla 1, se reconoció que los productos lácteos a los que se había añadido el extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) o Esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) 1 presentaban valores de pH inferiores, en comparación con el producto lácteo derivado del medio base solo, y que se podían obtener recuentos de células viables más altos en los productos lácteos a los que se había añadido el extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) o Esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) 1. Adicionalmente, se reconoció que el producto lácteo obtenido utilizando Esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) 1 tenía un sabor muy bueno, mientras que tenía un valor de pH y un recuento de células viables casi equivalentes a los del producto lácteo obtenido utilizando el extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*).

Ejemplo de producción 2

Producción de una esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) (2)

Las Esencias de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) 2 a 5 se produjeron de la misma manera que el Ejemplo de Producción 1, excepto que se usaron las mismas cantidades de cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y citrato tripotásico, respectivamente, en lugar de hexahidrato de cloruro de magnesio.

Ejemplo 2

Producción de productos de cultivo (2)

Los productos de cultivo (recuentos iniciales de bacterias: $1,5 \times 10^6$ ufc/ml) se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1 excepto que se usaron las mismas cantidades de Esencias de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) 2 a 5 en lugar de Esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) 1. Con respecto a estos productos de cultivo, los valores de pH, la acidez y los recuentos de células viables se midieron y los sabores se evaluaron de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

[Tabla 2]

Aditivos	Sal inorgánica o sal orgánica	Valores de pH de los productos de cultivo	Acidez de los productos de cultivo	Recuento de células viables de los productos de cultivo (ufc/ml)	Sabor
Ninguno	Ninguno	5,40	3,7	$8,3 \times 10^8$	5
Esencia de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee (Rosaceae) 1	Cloruro de magnesio	4,40	8,1	$6,3 \times 10^9$	5
Esencia de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee (Rosaceae) 2	Cloruro de sodio	5,23	3,9	$1,2 \times 10^9$	4
Esencia de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee (Rosaceae) 3	Cloruro de potasio	5,09	4,2	$2,1 \times 10^9$	5
Esencia de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee (Rosaceae) 4	Cloruro de calcio	4,88	6,0	$5,4 \times 10^9$	4
Esencia de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee (Rosaceae) 5	Citrato tripotásico	5,39	3,7	$9,1 \times 10^8$	5

Como se desprende de la Tabla 2, se reconoció que la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae) obtenida por adición de cloruro de magnesio fue superior en cuanto al efecto promotor del crecimiento en comparación con las esencias de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae) obtenidas por adición de otras sales. Además, sólo se reconoció un pequeño efecto promotor del crecimiento en el citrato tripotásico, que es una sal orgánica.

Ejemplo de producción 3

Producción de una esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae) (3)

Las Esencias de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae) 6 a 10 se produjeron de la misma manera que en el Ejemplo de Producción 1, excepto que se usaron 0,01, 0,02, 0,1, 0,2 y 0,5 mol/l, respectivamente, de cloruro de magnesio en lugar de 0,05 mol/l de cloruro de magnesio.

Ejemplo 3

Producción de productos de cultivo (3)

Los productos de cultivo (recuentos iniciales de bacterias: $1,5 \times 10^6$ ufc/ml) se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1 excepto que se usaron las mismas cantidades de Esencias de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae) 6 a 10 producidas en el Ejemplo de Producción 3 en lugar de Esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae) 1. Con respecto a estos productos de cultivo, los valores de pH, la acidez y los recuentos de células viables se midieron y los sabores se evaluaron de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

[Tabla 3]

Aditivos	Cantidades de cloruro de magnesio añadidas (mol/l)	Valores de pH de los productos de cultivo	Acidez de los productos de cultivo	Recuento de células viables de los productos de cultivo (ufc/ml)	Sabor
Ninguno	0	5,40	3,7	$8,3 \times 10^8$	5
Esencia de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee (Rosaceae) 6	0,01	5,04	4,4	$2,2 \times 10^9$	5
Esencia de <i>Rubus</i>	0,02	4,72	6,8	$5,7 \times 10^9$	5

<i>suavissimus S. Lee</i> (Rosaceae) 7					
Esencia de <i>Rubus suavissimus S. Lee</i> (Rosaceae) 1	0,05	4,40	8,1	$6,3 \times 10^9$	5
Esencia de <i>Rubus suavissimus S. Lee</i> (Rosaceae) 8	0,1	4,31	8,5	$6,6 \times 10^9$	5
Esencia de <i>Rubus suavissimus S. Lee</i> (Rosaceae) 9	0,2	4,30	8,5	$7,0 \times 10^9$	5
Esencia de <i>Rubus suavissimus S. Lee</i> (Rosaceae) 10	0,5	4,30	8,6	$6,4 \times 10^9$	4

Como se desprende de la Tabla 3, se reconoció que el uso de esencias de *Rubus suavissimus S. Lee* (Rosaceae) que eran concentrados obtenidos por electrodiálisis de extractos de *Rubus suavissimus S. Lee* (Rosaceae) a los que se había añadido cloruro de magnesio, particularmente esencias de *Rubus suavissimus S. Lee* (Rosaceae) a las que se había añadido un 0,02 % o más de cloruro de magnesio, tendían a producir efectos promotores del crecimiento significativos frente a bacterias lácticas. Además, se reconoció que, incluso cuando se añadió cloruro de magnesio al extracto de *Rubus suavissimus S. Lee* (Rosaceae), el sabor no resultó afectado, siempre y cuando la cantidad de cloruro de magnesio fuera de un 0,2 % o menos.

10 Ejemplo 4

Producción de productos de cultivo (4)

Los productos de cultivo (recuentos iniciales de bacterias: $1,5 \times 10^6$ ufc/ml) se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1 excepto que la cantidad de Esencia de *Rubus suavissimus S. Lee* (Rosaceae) 1 añadida se cambió a un 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,1 % y 0,5 %, respectivamente. Con respecto a estos productos de cultivo, los valores de pH, la acidez y los recuentos de células viables se midieron y los sabores se evaluaron de la misma manera que en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 4. El medio de cultivo 5 de la Tabla 4 es idéntico al medio de cultivo del Ejemplo 1 al que se añadió Esencia de *Rubus suavissimus S. Lee* (Rosaceae) 1.

[Tabla 4]

Aditivos	Cantidades de Esencia de <i>Rubus suavissimus S. Lee</i> (Rosaceae) 1 añadidas (%)	Valores de pH de los productos de cultivo	Acidez de los productos de cultivo	Recuento de células viables de los productos de cultivo (ufc/ml)	Sabor
Medio base	0	5,40	3,7	$8,3 \times 10^8$	5
Medio de cultivo 1	0,01	4,75	6,2	$4,9 \times 10^9$	5
Medio de cultivo 2	0,02	4,45	7,8	$6,0 \times 10^9$	5
Medio de cultivo 3	0,05	4,40	8,0	$5,8 \times 10^9$	5
Medio de cultivo 4	0,1	4,39	8,1	$6,4 \times 10^9$	5
Medio de cultivo 5	0,2	4,40	8,1	$6,3 \times 10^9$	5
Medio de cultivo 6	0,5	4,40	8,2	$6,9 \times 10^9$	4

Como se desprende de la Tabla 4, se reconoció que los efectos promotores del crecimiento frente a bacterias

lácticas se proporcionaron mediante la adición de la esencia de *Rubus suavissimus S. Lee* (*Rosaceae*), mientras que los sabores de los productos lácteos resultaron poco afectados. En particular, se reveló que se obtuvieron mayores recuentos de células viables y mejores sabores por adición de un 0,02 % a un 0,2 % de la esencia de *Rubus suavissimus S. Lee* (*Rosaceae*).

5

Ejemplo 5

Producción de productos de cultivo (5)

10 Utilizando *Lactobacillus casei* (YIT9029) o *Lactobacillus gasseri* (YIT0192) como la bacteria láctica y utilizando el medio base y el medio de cultivo (medio de cultivo 5) que contiene un 0,2 % de la esencia de *Rubus suavissimus S. Lee* (*Rosaceae*), se obtuvieron productos de cultivo (recuento inicial de bacterias: $1,5 \times 10^6$ ufc/ml para *Lactobacillus casei* y $4,5 \times 10^5$ ufc/ml para *Lactobacillus gasseri*) de la misma manera que en el Ejemplo 1. Con respecto a estos productos de cultivo, los valores de pH, la acidez y los recuentos de células viables se midieron y los sabores se evaluaron de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

15

[Tabla 5]

	Medio base			Medio de cultivo 5		
	Acidez	pH	Recuento de células viables de los productos de cultivo (ufc/ml)	Acidez	pH	Recuento de células viables de los productos de cultivo (ufc/ml)
<i>Lactobacillus casei</i>	3,7	5,40	$8,3 \times 10^8$	8,1	4,40	$6,3 \times 10^9$
<i>Lactobacillus gasseri</i>	2,6	5,73	$4,3 \times 10^7$	3,8	5,34	$2,4 \times 10^8$

20 Como se desprende de la Tabla 5, se reconoció que se proporcionó un efecto promotor del crecimiento también frente a una bacteria láctica tal como *Lactobacillus gasseri*, que no creció bien en el medio base, mediante la adición de la esencia de *Rubus suavissimus S. Lee* (*Rosaceae*).

Ejemplo 6

25

Producción de un producto de cultivo (6)

30 Se utilizó una solución de leche desnatada en polvo al 15 % que contenía un 4 % de glucosa y un 3 % de fructosa como medio base, se añadió un 0,2 % de Esencia de *Rubus suavissimus S. Lee* (*Rosaceae*) 1 preparada en el Ejemplo de Producción 1 y el medio se sometió a una esterilización por calor a 100 °C durante 60 minutos, preparando con ello un medio de cultivo. Se inoculó un 0,5% de un iniciador de *Lactobacillus casei* (YIT9029) a medio de cultivo (recuento inicial de bacterias: $7,6 \times 10^7$ ufc/ml). El medio de cultivo inoculado se incubó a 37 °C hasta que el pH alcanzó 3,7, y después se enfrió por debajo de 10 °C, obteniéndose así un producto de cultivo. Con respecto a los productos de cultivo, el tiempo requerido para el cultivo y el recuento de células viables en el producto de cultivo se midieron de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

35

[Tabla 6]

Aditivo	Tiempo requerido para el cultivo (horas)	Recuento de células viables en los productos de cultivo (ufc/ml)	Sabor
Ninguno	90	$3,2 \times 10^9$	5
Esencia de <i>Rubus suavissimus S. Lee</i> (<i>Rosaceae</i>) 1	61	$6,2 \times 10^9$	5

40 Como se desprende de la Tabla 6, el tiempo requerido para el cultivo de *Lactobacillus casei* se podría reducir a dos tercios añadiendo la esencia de *Rubus suavissimus S. Lee* (*Rosaceae*) al medio de cultivo.

Ejemplo 7

45 Producción de una bebida con bacterias lácticas:

Una solución acuosa que contenía un 30 % de jarabe de azúcar de glucosa-fructosa, un 25 % de jarabe de almidón hidrogenado, un 0,3 % de vitamina C, un 0,3 % de polisacáridos de soja y un 0,03 % de sucralosa se esterilizó a 100 °C durante 10 minutos, se añadieron 75 partes en peso de la solución acuosa esterilizada a 25 partes en peso de una mezcla obtenida por homogeneización del producto de cultivo producido en el Ejemplo 6 a 15 MPa y, a

50

5 continuación, se añadió a la mezcla un 0,1 % de un sabor a yogur (fabricado por Kabushiki Kaisha Yakult Material), produciendo de este modo una bebida con bacterias lácticas. La bebida con bacterias lácticas se envasó en un recipiente de poliestireno de 65 ml. Con respecto a la bebida con bacterias lácticas obtenida, de la misma manera que en el Ejemplo 1, se midió el recuento de células viables y se evaluó el sabor inmediatamente después de la producción (inmediatamente después del envasado) y después de 21 días de almacenamiento a 10 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Adicionalmente, la tasa de supervivencia después de 21 días de almacenamiento de la bebida con bacterias lácticas a 10 °C se calculó mediante la siguiente fórmula.

[Tabla 7]

10

Aditivo	Inmediatamente después del envasado		Después de 21 días de almacenamiento a 10 °C		Tasa de supervivencia (%)
	Recuentos de células viables (ufc/ml)	Sabor	Recuentos de células viables (ufc/ml)	Sabor	
Ninguno	$7,9 \times 10^8$	5	$3,4 \times 10^8$	5	43
Esencia de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee (Rosaceae) 1	$1,6 \times 10^9$	5	$1,0 \times 10^9$	5	62,5

[Fórmula matemática 1]

15 Tasa de supervivencia (%) = recuento de células viables después de 21 días de almacenamiento a 10 °C / recuento de células viables inmediatamente después del envasado x 100

20 Como se desprende de la Tabla 7, se observó que, con respecto a la bebida con bacterias lácticas preparada con el medio de cultivo que contiene la esencia de *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae), la reducción en el recuento de células viables después del almacenamiento se suprimió en comparación con la bebida con bacterias lácticas preparada con el medio de cultivo que no contenía la esencia.

Aplicabilidad industrial

25 El producto de cultivo de bacterias lácticas de la presente invención se puede usar para producir productos lácteos fermentados y similares que son útiles para mejorar la salud.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un producto de cultivo de bacterias lácticas que se obtiene cultivando una bacteria láctica en un medio de cultivo, en el que el medio de cultivo comprende una esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* que es un concentrado obtenido mediante electrodiálisis de una mezcla obtenida por adición de una sal inorgánica a un extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* que se ha obtenido mediante extracción ácida, donde las bacterias lácticas son bacterias anaerobias facultativas, y donde la sal inorgánica es al menos una seleccionada entre una sal de potasio, una sal de sodio, una sal de calcio y una sal de magnesio.
- 10 2. El producto de cultivo de bacterias lácticas según la reivindicación 1, donde la sal inorgánica es una sal de magnesio.
- 15 3. El producto de cultivo de bacterias lácticas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la cantidad de la sal inorgánica añadida a la misma es de 0,02 a 0,2 mol/l.
- 20 4. Un producto lácteo fermentado, que comprende el producto de cultivo de bacterias lácticas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25 5. Un procedimiento para preparar un producto lácteo fermentado que comprende mezclar el producto de cultivo de bacterias lácticas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 con materiales auxiliares.
- 30 6. Un procedimiento para producir un producto de cultivo de bacterias lácticas, donde el procedimiento comprende:
mezclar una esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* en un medio de cultivo en una etapa arbitraria en la producción del producto de cultivo de bacterias lácticas que se obtiene cultivando una bacteria láctica en el medio de cultivo, en el que la esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* es un concentrado obtenido mediante electrodiálisis de una mezcla obtenida por adición de una sal inorgánica a un extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* que se ha obtenido mediante extracción ácida, donde las bacterias lácticas son bacterias anaerobias facultativas, y donde la sal inorgánica es al menos una seleccionada entre una sal de potasio, una sal de sodio, una sal de calcio y una sal de magnesio.
- 35 7. Un procedimiento para promover el crecimiento de una bacteria láctica, donde el procedimiento comprende:
mezclar una esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* en un medio de cultivo, donde la esencia de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* es un concentrado obtenido mediante electrodiálisis de una mezcla obtenida por adición de una sal inorgánica a un extracto de *Rubus suavissimus S. Lee (Rosaceae)* que se ha obtenido mediante extracción ácida, y cultivo de la bacteria láctica en el medio de cultivo, donde las bacterias lácticas son bacterias anaerobias facultativas, y donde la sal inorgánica es al menos una seleccionada entre una sal de potasio, una sal de sodio, una sal de calcio y una sal de magnesio.
- 40