

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 626**

51 Int. Cl.:

A23C 9/123 (2006.01)

A23C 9/13 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2013 PCT/KR2013/002982**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13154343**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2013 E 13775024 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2837292**

54 Título: **Composición alimentaria simbiótica que contiene tagatosa y bacterias acidolácticas probióticas**

30 Prioridad:

10.04.2012 KR 20120037424

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2017

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
500, Namdaemunro 5-ga, Jung-gu
Seoul 100-749, KR**

72 Inventor/es:

**KOH, JI HOON;
KIM, YOUNG JAE y
PARK, SEUNG WON**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 647 626 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

Composición alimentaria simbiótica que contiene tagatosa y bacterias acidolácticas probióticas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición alimentaria simbiótica, que es una composición alimentaria para promover el crecimiento intestinal activo de bacterias acidolácticas *Lactobacillus* sp., que contiene bacterias acidolácticas y tagatosa como fuente de nutrientes para la cepa bacteriana.

10 Más particularmente, la presente invención se refiere a una composición alimentaria simbiótica que contiene la cepa *Lactobacillus casei* o la cepa *Lactobacillus rhamnosus* como probiótico, y tagatosa como prebiótico.

15 **Técnica antecedente**

El término "probiótico" significa microorganismos vivos que tienen un efecto beneficioso sobre la salud de huéspedes tales como seres humanos, animales, o similares, o un componente de los mismos, y se sabe que los probióticos proporcionan un efecto beneficioso, por ejemplo, el mantenimiento de un equilibrio en la microflora intestinal, en los huéspedes que toman los probióticos.

20 En general, los probióticos incluyen bacterias beneficiosas tales como bacterias acidolácticas y bifidobacterias y una variedad de levaduras. Entre ellas, se han estudiado y utilizado principalmente las bacterias acidolácticas que pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus*, y similares.

25 Las bacterias acidolácticas (LAB) se han utilizado como reconocidas generalmente como seguras (GRAS) para producir distintos alimentos fermentados durante un largo periodo de tiempo. Las bacterias acidolácticas utilizan distintos azúcares incluyendo la lactosa como sustrato para convertir el azúcar en ácido láctico, y suprime el crecimiento de bacterias perjudiciales dando un sabor agrio a los alimentos y bajando el pH mediante el proceso que se ha descrito anteriormente. Como las bacterias acidolácticas han tenido efectos beneficiosos en seres humanos en distintos aspectos, por ejemplo, los efectos de control de la microflora intestinal de un huésped para suprimir distintas enfermedades intestinales y promover la inmunidad así como un efecto antibiótico, ha sido creciente el interés en el desarrollo de bacterias acidolácticas así como distintos materiales alimentarios.

35 Como se ha descrito anteriormente, las bacterias acidolácticas que son probióticos representativos, se han utilizado ampliamente en la vida humanas, por ejemplo, en distintos alimentos fermentados, sojas fermentadas, medicinas, aditivos del pienso de animales de granja, y similares, así como productos de leche fermentada. Recientemente, se ha llevado a cabo una investigación que ha enfatizado distintos efectos funcionales saludables de las bacterias acidolácticas en el intestino del huésped además de los efectos nutricionales de los mismos.

40 Con el fin de aumentar las actividades *in vivo* de las bacterias acidolácticas como se ha descrito anteriormente, se ha llevado a cabo una investigación en simbióticos obtenidos mezclando probióticos que se corresponden con bacterias vivas y prebióticos que se corresponden con una fuente de nutrientes para los probióticos. Sin embargo, los prebióticos utilizados en los simbióticos de acuerdo con la técnica relacionada eran digeridos significativamente en el órgano digestivo del huésped, de manera que los prebióticos no actuaban eficazmente como fuente de nutrientes para los probióticos, y la especificidad para la especie de los prebióticos es insuficiente, ya que los prebióticos no aumentaban eficazmente la actividad de bacterias acidolácticas específicas.

45 En otro orden, la tagatosa, que es un isómero de fructosa, es un azúcar natural bajo en calorías que se produce naturalmente. La tagatosa tiene un sabor dulce similar al azúcar, y un grado de dulzor de la misma que es aproximadamente del 92 % del azúcar, pero las calorías de la misma son solo de un 38 % las del azúcar y un índice glucémico (GI) de la misma que es solo de aproximadamente un 4 % del azúcar, de manera que se ha resaltado la tagatosa como un edulcorante sustituto del azúcar.

50 Además, se ha desvelado la posibilidad de que se puede utilizar la tagatosa como prebiótico en la Patente coreana N° 10-0620477, pero casi no había investigación en planes de aplicación detallados tales como la variedad de probióticos a los que se puede aplicar actualmente la tagatosa, y similares.

55 El documento DE 695 06 002 T2 desvela la capacidad del *Lactobacillus paracasei* DN114001 para fermentar la tagatosa y Hans Bertelsen et al. ("Fermentation of D-tagatose by Human Intestinal Bacteria and Dairy Lactic Acid Bacteria INTRODUCTION", *Microbial Ecology in Health and Disease*, 1 de enero de 2001, páginas 87-95) desvela la capacidad de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* para fermentar la tagatosa. Sin embargo estas dos divulgaciones no dicen nada del *Lactobacillus casei* shirota y *Lactobacillus casei*-01®.

60

Problema técnico

5 La presente invención proporciona una composición alimentaria que proporciona simbióticos que contienen tagatosa como prebiótico y una bacteria acidoláctica de *Lactobacillus* sp. como probiótico que utiliza específicamente al tagatosa que de esta manera ayuda a la proliferación dominante de la bacteria acidoláctica específica en el intestino de un huésped que se alimenta de la composición alimentaria.

Solución técnica

10 La presente descripción se refiere a una composición alimentaria simbiótica, que es una composición alimentaria para promover el crecimiento intestinal activo de bacterias acidolácticas de *Lactobacillus* sp., que contiene bacterias acidolácticas y tagatosa como fuente de nutrientes para la cepa bacteriana.

15 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición alimentaria que comprende tagatosa y *Lactobacillus casei* donde el *Lactobacillus casei* es uno o más que se selecciona de entre un grupo que consiste en *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus casei*-01®.

20 De acuerdo con una realización ejemplar del primer aspecto de la presente invención, basándose en 100 partes por peso de la composición, la composición alimentaria puede contener más de 0 a 20 partes por peso de tagatosa; y más de 0 a 1 parte por peso de *Lactobacillus casei*.

25 De acuerdo con otra realización ejemplar del primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de leche fermentada que contiene: basándose en 100 partes por peso de la composición completa, más de 0 a 20 partes por peso de tagatosa; más de 0 a 1 parte por peso de *Lactobacillus casei*; más de 0 a 10 partes por peso de leche en polvo desnatada; y 50 a 99 partes por peso de agua purificada.

30 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición alimentaria que comprende tagatosa y *Lactobacillus rhamnosus* GG, donde basándose en 100 partes por peso de la composición, contiene más de 0 a 20 partes por peso de tagatosa; y más de 0 a 12 partes por peso de *Lactobacillus rhamnosus* GG.

35 De acuerdo con una realización ejemplar del segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición concentrada de leche fermentada que contiene: basándose en 100 partes por peso de la composición completa, más de 0 a 20 partes por peso de tagatosa; más de 0 a 1 parte por peso de *Lactobacillus rhamnosus*; 50 a 99 partes por peso de leche cruda; más de 0 a 1 parte por peso de pectina; y más de 0 a 50 partes por peso de agua purificada.

Efectos ventajosos

45 La presente invención puede proporcionar simbióticos que contienen tagatosa como prebiótico y una bacteria acidoláctica específica de *Lactobacillus* sp. como probiótico que utiliza específicamente la tagatosa, de manera que la bacteria acidoláctica específica pueda proliferar predominantemente en el intestino de un huésped que se alimenta con el simbiótico.

Descripción de los dibujos

50 La FIG. 1 muestra una curva de crecimiento de un *Lactobacillus casei*.
 La FIG. 2 muestra una curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota.
 La FIG. 3 muestra una curva de crecimiento de un *Lactobacillus casei* DN114001.
 La FIG. 4 muestra una curva de crecimiento de *Lactobacillus casei*-01®.
 55 La FIG. 5 muestra una curva de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus*.
 La FIG. 6 muestra una curva de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* GG.
 La FIG. 7 muestra una curva de crecimiento de *Pediococcus pentosaceus*.
 La FIG. 8 muestra una curva de crecimiento de *Lactobacillus farciminis*.
 La FIG. 9 muestra una curva de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*.

Mejor modo

60 De aquí en adelante, la presente invención se describirá en detalle. Como los contenidos que no se describen en la presente memoria descriptiva pueden ser reconocidos y deducidos suficientemente por los expertos en la técnica o técnica similar, se omitirá una descripción de los mismos.

65

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición alimentaria que comprende tagatosa y *Lactobacillus casei*, donde el *Lactobacillus casei* es uno o más que se selecciona de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus-01*®.

5 La presente descripción proporciona una composición que contiene tagatosa, bacterias acidolácticas de *Lactobacillus* sp., leche cruda, pectina, y agua purificada.

La composición alimentaria no está particularmente limitada y puede utilizarse como distintos alimentos o composiciones alimentarias.

10 La composición alimentaria se puede utilizar preferentemente como productos lácteos, por ejemplo, leche fermentada y/o leche fermentada concentrada, o similares.

15 De acuerdo con una realización específica dicha composición contiene, basándose en 100 partes por peso de la composición completa, más de 0 a 20 partes por peso de tagatosa; y más de 0 a 1 parte por peso de *Lactobacillus casei*.

20 De acuerdo con otra realización específica, dicha composición alimentaria es una composición de leche fermentada que contiene, basándose en 100 partes por peso de la composición completa, más de 0 a 20 partes por peso de tagatosa; más de 0 a 1 parte por peso de *Lactobacillus casei*; más de 0 a 10 partes por peso, más preferentemente 3 a 5 partes por peso de leche desnatada en polvo; y
25 más de 50 a 99 partes por peso, más preferentemente, más de 80 a 95 partes por peso de agua purificada.

30 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición alimentaria que comprende tagatosa y *Lactobacillus rhamnosus* GG, donde basándose en 100 partes por peso de la composición, contiene más de 0 a 20 partes por peso de tagatosa; y más de 0 a 1 parte por peso de *Lactobacillus rhamnosus* GG.

35 De acuerdo con una realización específica, dicha composición alimentaria es una composición de leche fermentada concentrada que contiene, basándose en 100 partes por peso de la composición completa, más de 0 a 20 partes por peso de tagatosa; más de 0 a 1 parte por peso de *Lactobacillus rhamnosus*; 50 a 99 partes por peso, más preferentemente, 70 a 90 partes por peso de leche cruda; más de 0 a 1 parte por peso, más preferentemente, más de 0 a 0,5 partes por peso de pectina; y más de 0 a 50 partes por peso, más preferentemente, 1 a 10 partes por peso de agua purificada.

40 La expresión "leche cruda" como se utiliza en el presente documento, que se utiliza como una expresión reconocida en general en la técnica, significa leche no procesada producida por las vacas.

45 El término "pectina" como se utiliza en el presente documento, que se utiliza como un término reconocido en general en la técnica, significa carbohidratos polisacáridicos purificados ampliamente distribuidos en animales terrestres y plantas y que se obtienen por extracción acuosa particularmente de manzanas, frutos cítricos (limón, lima, naranja, o similares), o similares.

La composición de leche fermentada concentrada puede contener adicionalmente (mezclados) leche desnatada en polvo, azúcar, fructosa, glucosa, zumo de fruta (concentrado), productos especiados procesados, o similares.

50 La expresión "leche desnatada en polvo" como se utiliza en el presente documento, que se utiliza como una expresión reconocida en general en la técnica, significa el resultado obtenido por separación y eliminación de un componente graso de la leche. La leche desnatada en polvo que se utiliza en la presente invención se puede ser leche desnatada en polvo mezclada, donde la leche desnatada en polvo mezclada significa un producto que se obtiene por mezclado, por ejemplo, de harina de cereales (harina de arroz, o similares), productos de cereales
55 (harina de trigo, o similares), aditivos alimentarios tales como productos del coco, suero de leche en polvo, o similares, con leche desnatada en polvo o leche en polvo en la que se mezclan leche desnatada en polvo y crema de leche en polvo, y se procesa y se la mezcla hace en polvo.

60 La composición de leche fermentada puede contener adicionalmente glucosa, azúcar, productos especiados procesados, o similares.

65 Las bacterias acidolácticas de *Lactobacillus* sp. tales como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus farciminis*, o *Lactobacillus acidophilus* tienen una excelente capacidad para utilizar la tagatosa como una fuente de nutrientes en un huésped en comparación con otras cepas, estas cepas pueden utilizarse eficazmente como probióticos en la composición simbiótica utilizando tagatosa como prebiótico, de manera que estas cepas están equilibradas en la microflora intestinal del huésped y particularmente, se convierten en dominantes en el

intestino del huésped, teniendo por ello un efecto positivo sobre el metabolismo del huésped.

Se ha sabido que entre las bacterias acidolácticas mencionadas anteriormente, particularmente, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*, tiene efectos beneficiosos en el cuerpo humano tal como distintos efectos funcionales asociados con la inmunidad, un efecto anticáncer, y similares, además de acciones de regulación intestinal, de manera que el *Lactobacillus casei* y el *Lactobacillus rhamnosus* se han comercializado en varios productos en todo el mundo.

El *Lactobacillus casei* que es una cepa conocida que pertenece a las bacterias acidolácticas, puede incluir el *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* DN114001, y *Lactobacillus casei*-01® (Referencia: Kazumasa Matsumoto et al., "Effects of a Probiotic Fermented Milk Beverage Containing *Lactobacillus casei* Strain Shirota on Defecation Frequency, Intestinal Microbiota, and the Intestinal Environment of Healthy Individuals with Soft Stools", Journal of Bioscience and Bioengineering VOL. 110 N° 5.547-552, 2010; Chu-Ting Liu et al., "Antiproliferative and Anticytotoxic Effects of Cell Fractions and Exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01", Mutation Research 721(2011)157-162; Maija Saxelin et al., "Probiotic and Other Functional Microbes: from Markets to Mechanisms", Current Opinion in Biotechnology 2005, 16:204-211; Antonis Ampatzoglou et al., "Influence of Fermentation on the Acid Tolerance and Freeze drying Survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG", Biochemical Engineering Journal, 52(2010) 65-70; o similares).

El *Lactobacillus casei* que se utiliza en la presente invención es uno o más que se seleccionan de entre un grupo que consiste en *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus casei*-01®.

El *Lactobacillus rhamnosus* que se utiliza en la presente invención es *Lactobacillus rhamnosus* GG.

De aquí en adelante la presente invención se describirá en detalle mediante Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos son solamente para ilustrar la presente invención, y el alcance de la presente invención no está limitado por los mismos.

Ejemplo 1: Selección de bacterias acidolácticas que tienen una capacidad excelente para utilizar la tagatosa

La capacidad de utilización de la tagatosa se evaluó en bacterias acidolácticas conocidas (250 cepas comerciales, 25 cepas aisladas de seres humanos, y 110 cepas de bacterias acidolácticas aisladas de productos lácteos del mercado).

(1) Aislamiento de la cepa

Se inocularon soluciones de cultivo puras (un 1 % de solución de cultivo en fase estacionaria en la que el recuento celular de cada una de las cepas era de aproximadamente 10^8 a 10^9 ufc/ml) de un total de 385 cepas de bacterias acidolácticas en un medio selectivo, respectivamente, y se cultivaron en una incubadora a 37 °C durante 18 horas, seguido por sub-cultivo tres veces. Después, los experimentos se llevaron a un estado en el que la viabilidad de la cepa era la óptima.

(2) Preparación del medio de cultivo

Con el fin de evaluar la capacidad del uso de tagatosa de cada una de las bacterias acidolácticas, se utilizó un medio mínimo compuesto por 5 g de peptona, 2,5 g de acetato sódico trihidrato, 0,5 ml de sulfato magnésico heptahidrato, 0,5 ml de sulfato de manganeso tetrahidrato, 5 ml de Tween 80, 1 g de citrato diamónico, 1 g de fosfato potásico, y 480 ml de agua destilada.

Después de esterilizar el medio a 121 °C durante 15 minutos y dividirse en tres muestras, se añadieron 20 ml de solución de tagatosa al 50 %, 20 ml de solución de glucosa al 50 %, y 20 ml de solución de fructooligosacáridos (FOS) al 50 % a cada una de las tres muestras, preparando de esta manera los medios líquidos.

(3) Cultivo

Se inoculó un 1 % de cada una de las cepas de bacterias acidolácticas cultivadas como se ha descrito anteriormente en el medio preparado y se cultivó en una incubadora a 37 °C durante 24 horas. A continuación, se midió la absorbancia de cada una de las cepas cultivadas utilizando un lector de ELISA, y se midió un recuento celular a lo largo de la placa de cultivo utilizando una solución de dilución, evaluando de esta manera la capacidad de utilización de tagatosa.

Ejemplo 2: Identificación de la cepa excelente de acuerdo con los resultados del Ejemplo 1

Se seleccionaron 19 cepas que tenían una excelente capacidad para utilizar la tagatosa de cada una de las bacterias acidolácticas cultivadas en el Ejemplo 1 y se identificaron aislando los ADNr 16S de las mismas.

Se extrajeron 2 ml de una solución de cultivo de cada bacteria acidoláctica cultivada (D.O (600): 0,8 a 1,0) y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto, retirando de esta manera un sobrenadante. Después, se mezclaron adecuadamente 50 µl de un pre-tampón refrigerado (que contenía 15 µl de RNasa A) y 3 µl de una solución de lisozima uno con otro, y se trató el aglomerado celular con esta mezcla.

El aglomerado celular tratado se daba la vuelta cada 5 minutos mientras se dejaba a 37 °C durante 15 minutos, llevando a cabo de esta manera una reacción. A continuación, se añadieron al mismo 250 µl de un G-tampón refrigerado (que contenía 210 µl de una solución de RNasa A y proteinasa K) y se mezcló con el mismo completamente.

El resultado se dio la vuelta cada 5 minutos mientras se dejaba a 65 °C durante 15 minutos, llevando a cabo de esta manera una reacción. Después, se añadieron al mismo 250 µl de un tampón de unión refrigerado y se mezcló con el mismo completamente.

A continuación, después de cargar el lisado celular (800 ul o menos) en una columna y de centrifugarse a 13.000 rpm durante 1 minuto, se añadieron 500 ul de tampón A de lavado (que contenía 21 ml de etanol absoluto (EtOH) para el lavado en la columna y se centrifugó de nuevo a 13.000 rpm durante 1 minuto.

A continuación, después de retirar la solución, se colocó una columna G-spin en un nuevo tupo Eppendorf de 1,5 ml. Después, se cargaron directamente 50 a 200 ul de un tampón de elución en una membrana, se dejó a temperatura ambiente durante 1 minuto, y entonces se llevó a cabo la centrifugación, obteniendo de esta manera el gADN.

Después de la extracción del ADN de los especímenes, se amplifica una secuencia de interfaz entre rARN 16S, rARN 23S, o rARN 16S y rARN 23S, que son comunes en bacterias, mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR). Después, tras llevar a cabo la secuenciación terminadora fluorescente, se aisló el ADN en un gel de secuencia mediante electroforesis, y se determinó una secuencia de bases de un componente nucleotídico utilizando un secuenciador automático. A continuación, la secuencia de bases resultante se introdujo en una computadora y se comparó con la secuencia de bases de ADN de acuerdo con la cepa introducida en la computadora, identificando de esta manera la cepa.

Como resultado de la selección, 19 cepas que tenían la más excelente capacidad para utilizar la tagatosa del total de 385 cepas y aislando e identificando los rADN 16S de las mismas como se ha descrito anteriormente, se confirmaron 9 cepas de *Lactobacillus casei*, 6 cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, 2 cepas de *Pediococcus pentosaceus*, una única cepa de *Lactobacillus farciminis*, y una única cepa de *Lactobacillus acidophilus*.

Las 19 cepas seleccionadas se muestran en la Tabla 1 siguiente. Como se muestra en la Tabla 1, entre ellos, el *L. casei* Shirota, *L. casei* DN114001, *L. casei*-01, y *L. rhamnosus* GG tenían una capacidad significativamente excelente para utilizar la tagatosa en comparación con las otras cepas.

[Tabla 1]

	Cepa	Valor del log ₁₀ del recuento de células vivas				Tagatosa/ Glucosa
		0 h	24 h Glucosa	24 h Fructo oligo sacáridos	24 h Tagatosa	
1	<i>L. casei</i>	6,648	7,855	8,349	7,882	100,3 %
2	<i>L. casei</i>	7,364	8,127	8,139	8,137	100,1 %
3	<i>L. casei</i>	6,829	8,273	8,206	8,240	99,6 %
4	<i>L. casei</i>	6,941	8,512	7,518	8,424	99,0 %
5	<i>L. casei</i>	7,077	9,078	7,716	8,449	93,1 %
6	<i>L. casei</i>	7,329	8,877	8,340	8,767	98,8 %
7	<i>L. casei</i> Shirota	7,309	8,932	8,289	9,054	101,4*
8	<i>L. casei</i> DN114001	7,273	8,803	8,268	8,953	101,7 %
9	<i>L. casei</i>-01®	7,448	8,940	8,228	9,068	101,4 %
10	<i>L. rhamnosus</i>	6,835	8,057	7,518	7,939	98,5 %
11	<i>L. rhamnosus</i>	6,875	8,096	7,475	8,031	99,2 %
12	<i>L. rhamnosus</i>	6,975	8,179	7,556	8,059	98,5 %
13	<i>L. rhamnosus</i>	6,812	8,206	7,322	8,169	99,5 %

	Cepa	Valor del log ₁₀ del recuento de células vivas				Tagatosa/ Glucosa
		0 h	24 h Glucosa	24 h Fructo oligo sacáridos	24 h Tagatosa	
14	<i>L. rhamnosus</i> GG	6,938	8,144	7,439	8,548	105,0 %
15	<i>L. rhamnosus</i> GG	7,242	8,520	8,779	8,822	103,5 %
16	<i>P. pentosaceus</i>	7,275	8,877	8,082	8,798	99,1 %
17	<i>P. pentosaceus</i>	7,579	9,062	8,087	8,953	98,8 %
18	<i>L. farciminis</i>	7,140	8,666	8,402	8,601	99,2 %
19	<i>L. acidophilus</i>	7,028	8,045	7,160	7,913	98,4 %

Ejemplo 3: Capacidad de utilizar otros prebióticos en algunas bacterias acidolácticas identificadas en el Ejemplo 2

- 5 Se evaluó, comparó y analizó la capacidad de utilizar otros prebióticos en vez de tagatosa utilizando 9 cepas que tenían una capacidad excelente para utilizar la tagatosa entre las 19 cepas identificadas en el Ejemplo 2.

Para la presente evaluación, en el momento de preparar el medio utilizado en el Ejemplo 1, como grupo de control positivo, se utilizó la glucosa en vez de tagatosa, y como grupos de control negativo, se utilizaron fructooligosacáridos, lactitol, lactulosa, y xilitol.

Se inocularon cada uno de *Lactobacillus casei* (FIG. 1), *Lactobacillus casei* Shirota (FIG. 2), *Lactobacillus casei* DN114001 (FIG. 3), *Lactobacillus casei*-01® (FIG. 4), *Lactobacillus rhamnosus* (FIG. 5), *Lactobacillus rhamnosus* GG (FIG. 6), *Pediococcus pentosaceus* (FIG. 7), *Lactobacillus farciminis* (FIG. 8), y *Lactobacillus acidophilus* (FIG. 9) que se habían identificado en el Ejemplo 2, en cada uno de los medios y se cultivaron a 37 °C durante 0, 5, 10, 24 y 48 horas. Después, se midió un recuento de células vivas de las mismas, de manera que se obtuvo una curva de crecimiento de cada una de las cepas.

Como resultado de la comparación de las curvas de crecimiento de las cepas de bacterias acidolácticas que utilizan tagatosa eficazmente, la capacidad de utilizar glucosa, tagatosa, y lactulosa era similar entre ellas, pero la capacidad de utilizar fructooligosacáridos y lactitol era baja.

Ejemplo 4: Preparación de una composición simbiótica de leche fermentada concentrada que contiene tagatosa y *Lactobacillus rhamnosus* (bacteria acidoláctica)

Con el fin de preparar una composición simbiótica de leche fermentada concentrada (leche fermentada en cuajada, leche fermentada para beber, o similares) que contenía tagatosa como prebiótico y una cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG como probiótico, se llevó a cabo el siguiente método, preparando de esta manera una leche fermentada concentrada que tenía una constitución que se muestra en la Tabla 2 siguiente.

Primero, leche cruda y leche desnatada en polvo (mezcladas) se mezclaron con una relación de mezcla, se homogeneizaron a una presión de 150 bares, y se pasaron a través de un intercambiador de calor para esterilizarlas de esta manera. Después, se bajó la temperatura a 40 °C, y la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* GG obtenida en el Ejemplo 2 y de *Streptococcus thermophilus* se inocularon en la misma. A continuación, después de la fermentación durante 6 horas, cuando el pH alcanzó 4,6, se enfrió la cuajada mientras se aplastaba. En este momento, en el caso de la leche fermentada concentrada tipo bebida, se llevó a cabo la homogeneización de nuevo a una presión de 150 bares, preparando de esta manera una solución de cultivo.

Entretanto, por separado, se mezclaron, tagatosa, azúcar blanco (el azúcar blanco se puede sustituir por fructosa o glucosa), concentrado de zumo de fresa o pulpa de fresa, pectina, saborizante de fresa, y agua purificada, se esterilizaron, y enfriaron, preparando de esta manera un jarabe o mermelada.

La solución de cultivo preparada y el jarabe o mermelada se mezclaron a una relación predeterminada, y después se refrigeraron a 10 °C o menos.

[Tabla 2]

Material en bruto	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Leche cruda	77,0	77,0	77,0	77,0	77,0

Material en bruto	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Leche desnatada en polvo (mezclada)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Tagatosa	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
Azúcar blanco	7,2	5,4	3,6	1,8	0,0
Concentrado de zumo de futas o pulpa de fruta	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Pectina	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Saborizante	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
<i>L. rhamnosus</i> GG	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Agua purificada	4,66	4,46	4,26	4,06	3,86

Ejemplo 5: Preparación de una composición simbiótica de leche fermentada que contiene tagatosa y *Lactobacillus casei* (bacteria acidoláctica)

- 5 Con el fin de preparar una composición simbiótica de leche fermentada (leche fermentada líquida, o similar) que contenga tagatosa como prebiótico y una cepa de *Lactobacillus casei*-01® como probiótico, se llevó a cabo el siguiente método, preparando de esta manera un concentrado de leche concentrada que tenía una constitución que se muestra en la siguiente Tabla 5.
- 10 Primero, después de mezclarse la leche desnatada en polvo (mezclada), glucosa hidrocristalina, y agua purificada entre ellas, esterilizarse a 105 °C durante 90 minutos y enfriarse a 40 °C, se inoculó el *Lactobacillus casei*-01® obtenido en el Ejemplo 2 en la misma. A continuación, el resultado se fermentó durante 5 días, y cuando el pH alcanzaba 3,6, se bajó la temperatura, preparando de esta manera una solución de cultivo. Una constitución de la solución de cultivo se muestra en la siguiente Tabla 3.
- 15 Entretanto, por separado, se mezclaron tagatosa, azúcar blanco (el azúcar blanco se puede sustituir por fructosa), y agua purificada, se esterilizó y se enfrió, preparando de esta manera un jarabe. Una constitución del jarabe se muestra en la siguiente Tabla 4.
- 20 Después de mezclar la solución de cultivo y el jarabe preparados con una relación 1:1, se añadió una pequeña cantidad de saborizante de yogur mientras se mezclaba de nuevo la mezcla con agua purificada a una relación de 1:1. Después, el resultado se refrigeró a 10 °C o menos.
- 25 Una constitución de la composición de leche fermentada preparada finalmente se muestra en la siguiente Tabla 5.

[Tabla 3]

Material en bruto	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Leche desnatada en polvo (mezclada)	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0
Glucosa hidrocristalina	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
<i>L. casei</i> -01®	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Agua purificada	83,8	83,8	83,8	83,8	83,8

ES 2 647 626 T3

[Tabla 4]

Material en bruto	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Tagatosa	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0
Azúcar blanco	14,4	10,8	7,2	3,6	0,0
Agua purificada	81,6	81,2	80,8	80,4	80,0

[Tabla 5]

Material en bruto	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Leche desnatada en polvo (mezclada)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Glucosa hidrocristalina monohidrato	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>L. casei</i> -01®	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
Tagatosa	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Azúcar blanco	3,6	2,7	1,8	0,9	0,0
Saborizante	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Agua purificada	91,345	91,245	91,145	91,045	90,945

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición alimentaria que comprende tagatosa y *Lactobacillus casei*, donde el *Lactobacillus casei* es uno o más que se seleccionan de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus casei*-01®.
2. La composición alimentaria de la reivindicación 1, donde basándose en 100 partes por peso de la composición, contiene más de 0 a 20 partes por peso de tagatosa; y más de 0 a 1 parte por peso de *Lactobacillus casei*.
- 10 3. La composición alimentaria de la reivindicación 1, donde es una composición de leche fermentada que contiene:
basándose en 100 partes por peso de la composición completa,
más de 0 a 20 partes por peso de tagatosa;
más de 0 a 1 parte por peso de *Lactobacillus casei*;
15 más de 0 a 10 partes por peso de leche desnatada en polvo; y
50 a 99 partes por peso de agua purificada.
- 20 4. Una composición alimentaria que comprende tagatosa y *Lactobacillus rhamnosus* GG, donde basándose en 100 partes por peso de la composición, contiene más de 0 a 20 partes por peso de tagatosa; y más de 0 a 1 parte por peso de *Lactobacillus rhamnosus* GG.
- 25 5. La composición alimentaria de la reivindicación 4, donde es una composición de leche fermentada concentrada que contiene:
basándose en 100 partes por peso de la composición completa,
más de 0 a 20 partes por peso de tagatosa;
más de 0 a 1 parte por peso de *Lactobacillus rhamnosus*;
50 a 99 partes por peso de leche cruda;
más de 0 a 1 parte por peso de pectina; y
30 más de 0 a 50 partes por peso de agua purificada.

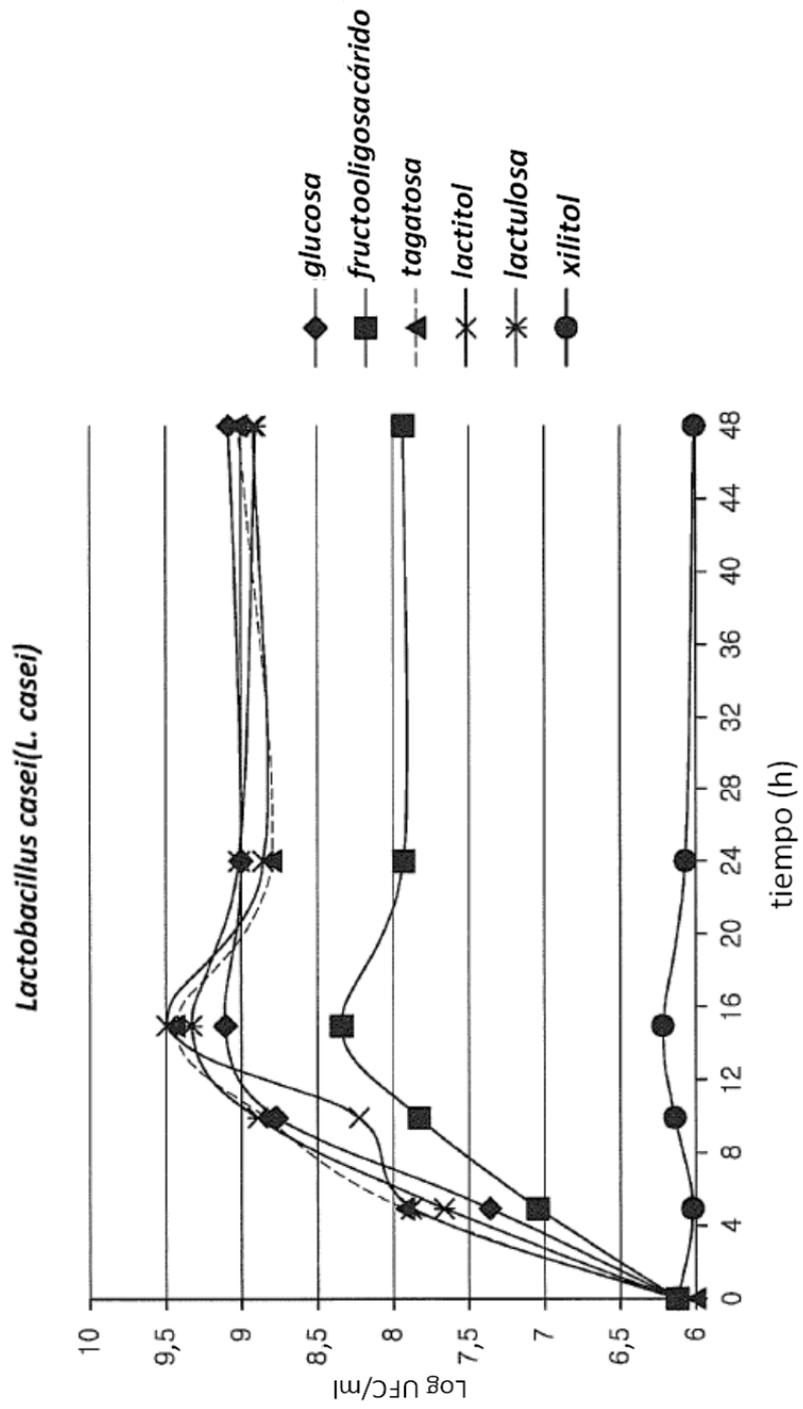


FIG.1

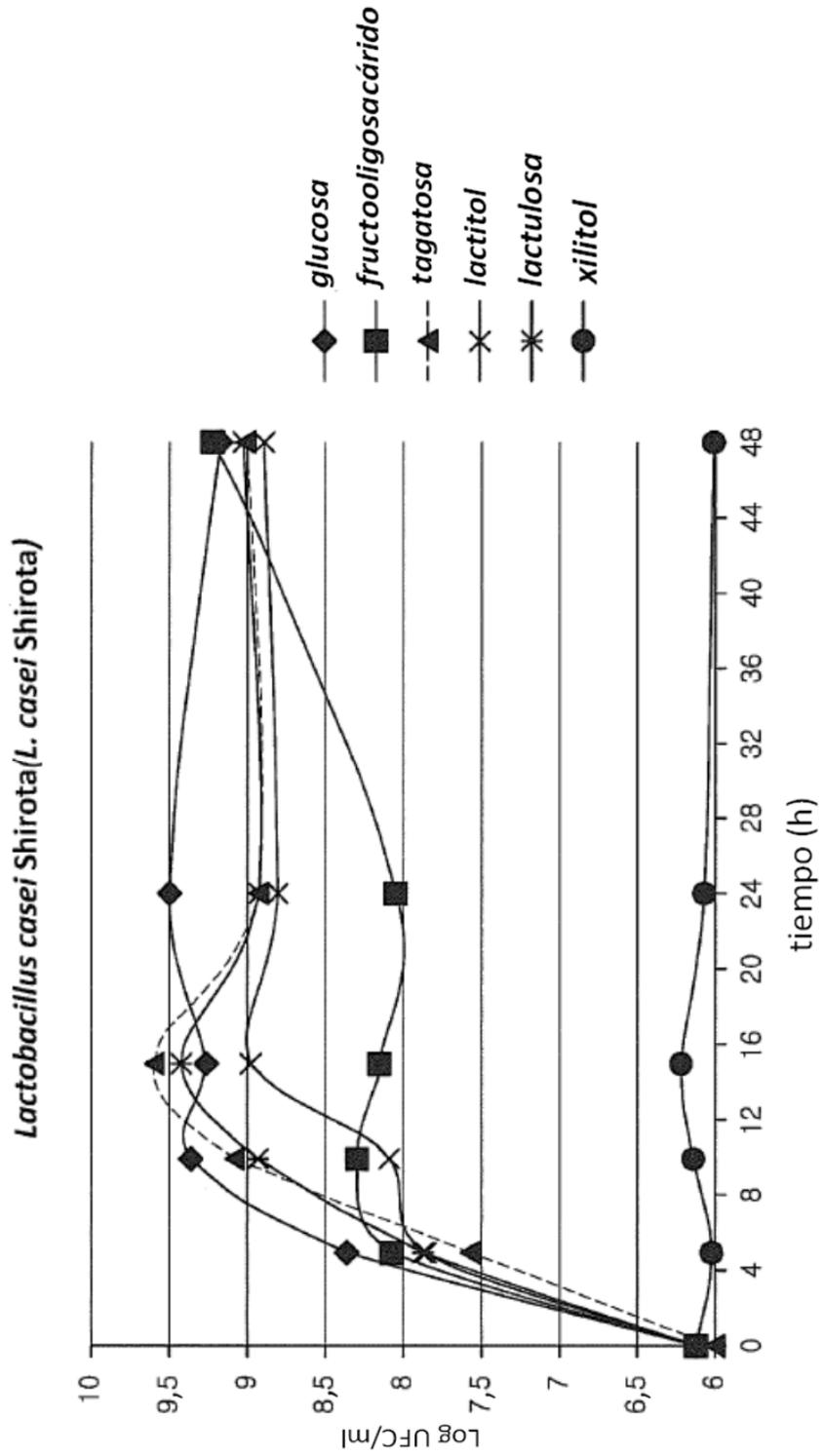


FIG.2

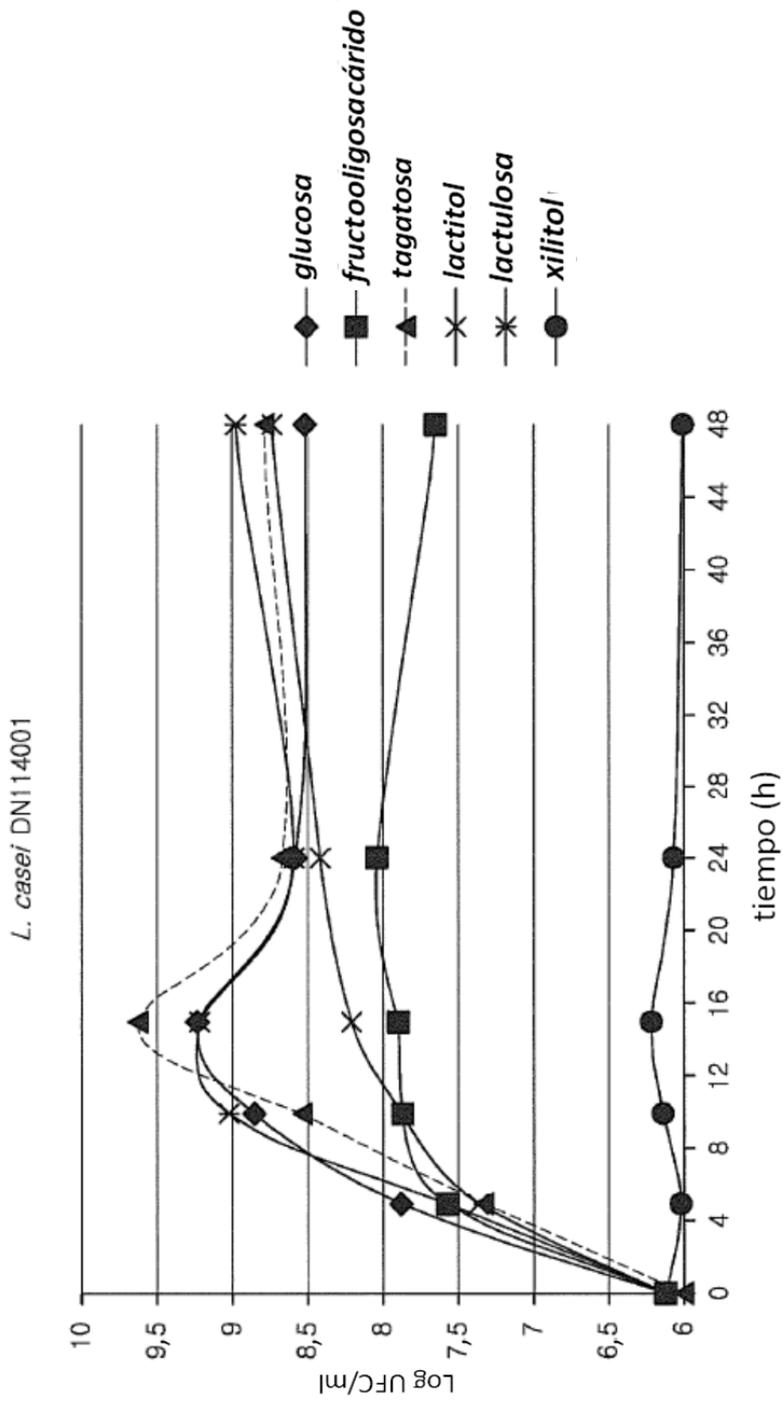


FIG.3

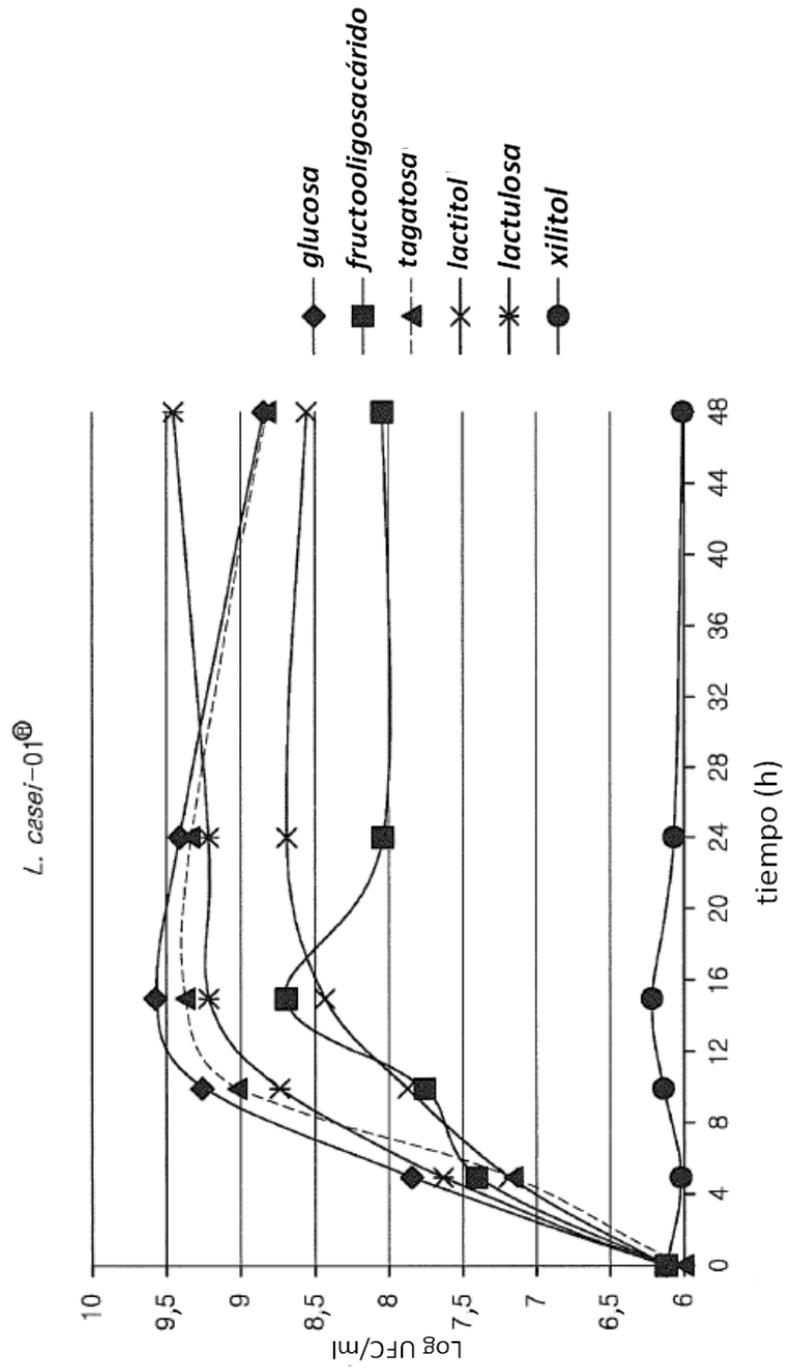


FIG.4

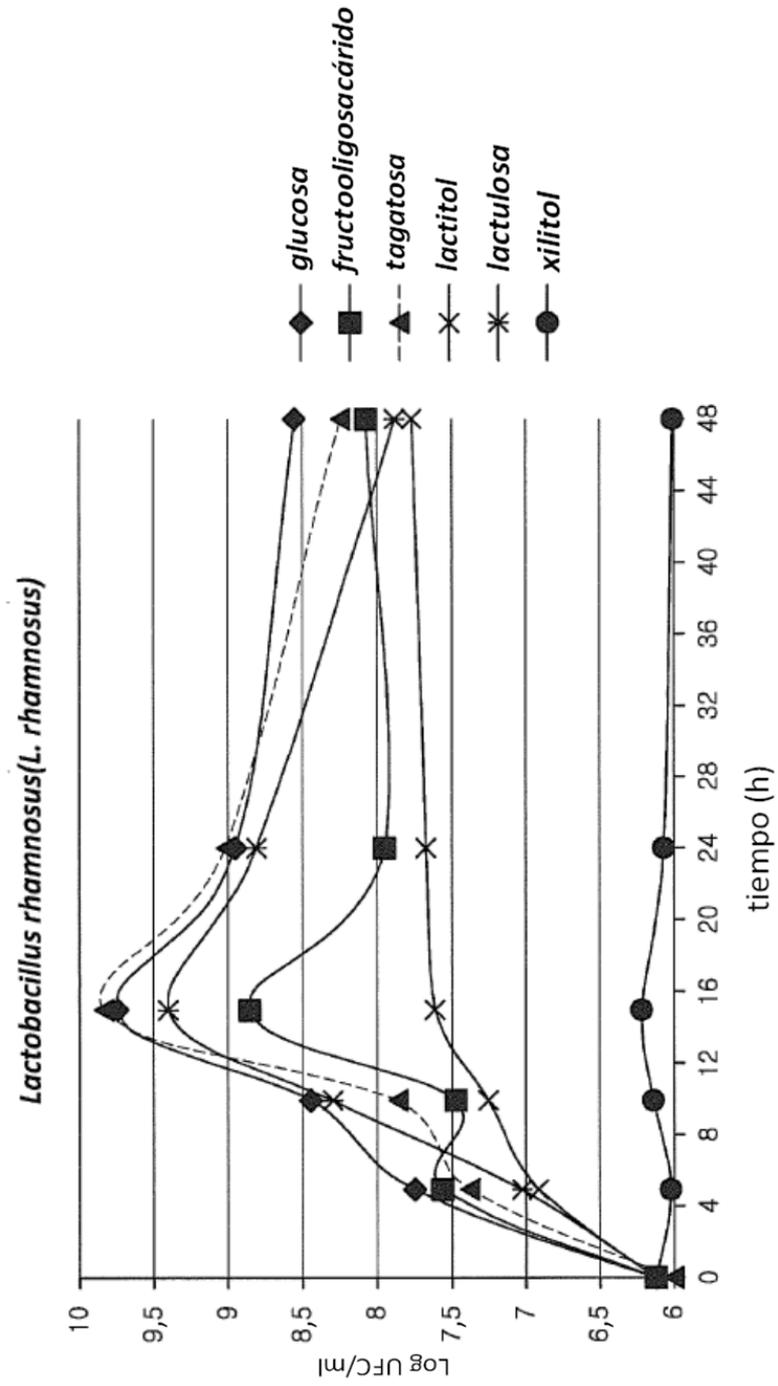


FIG.5

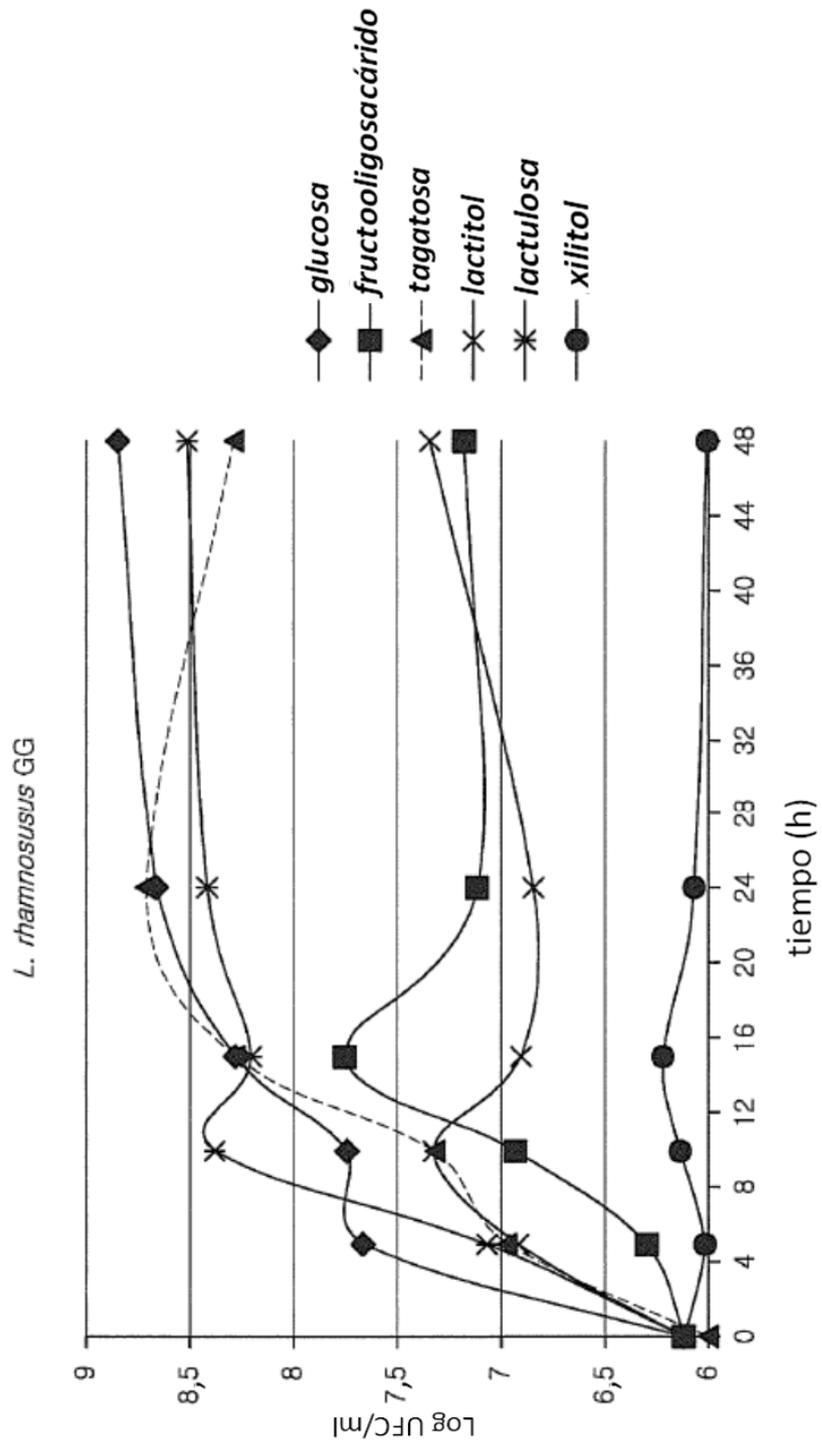


FIG.6

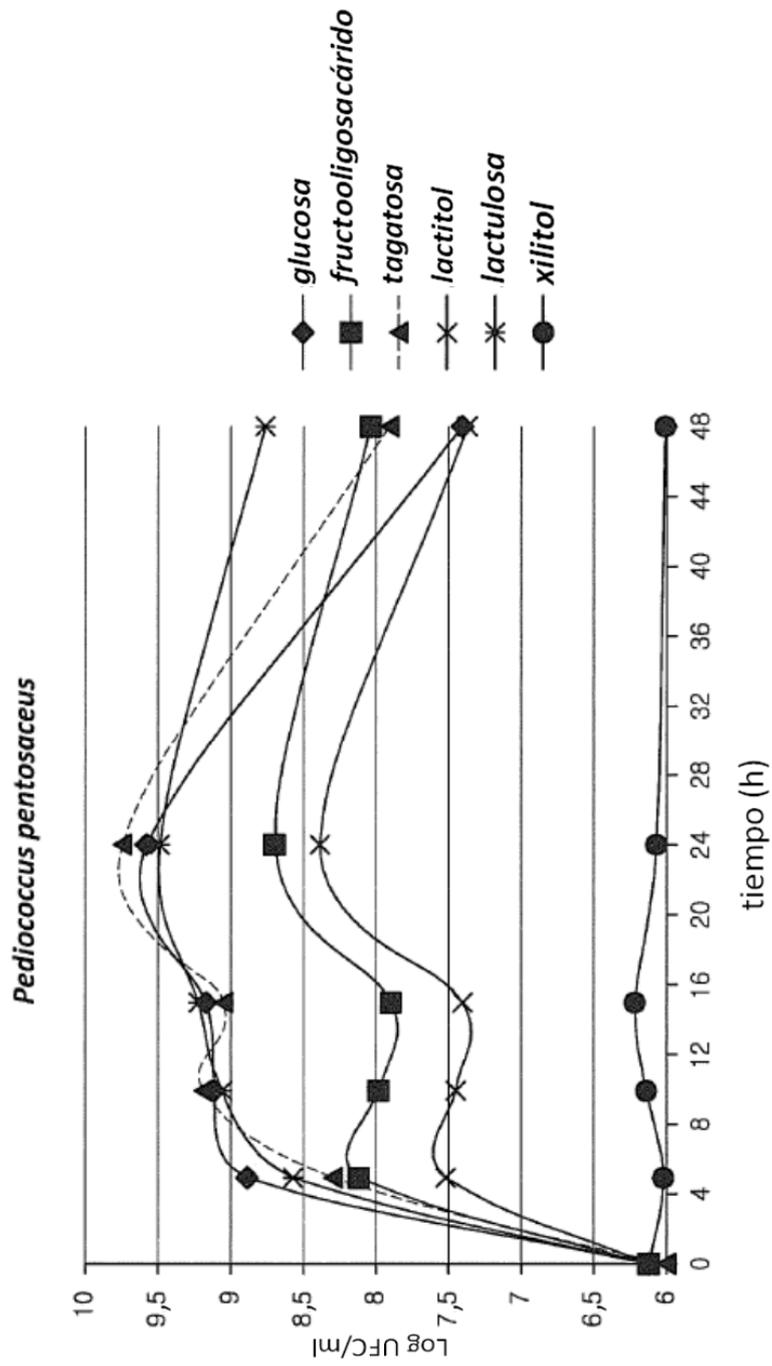


FIG.7

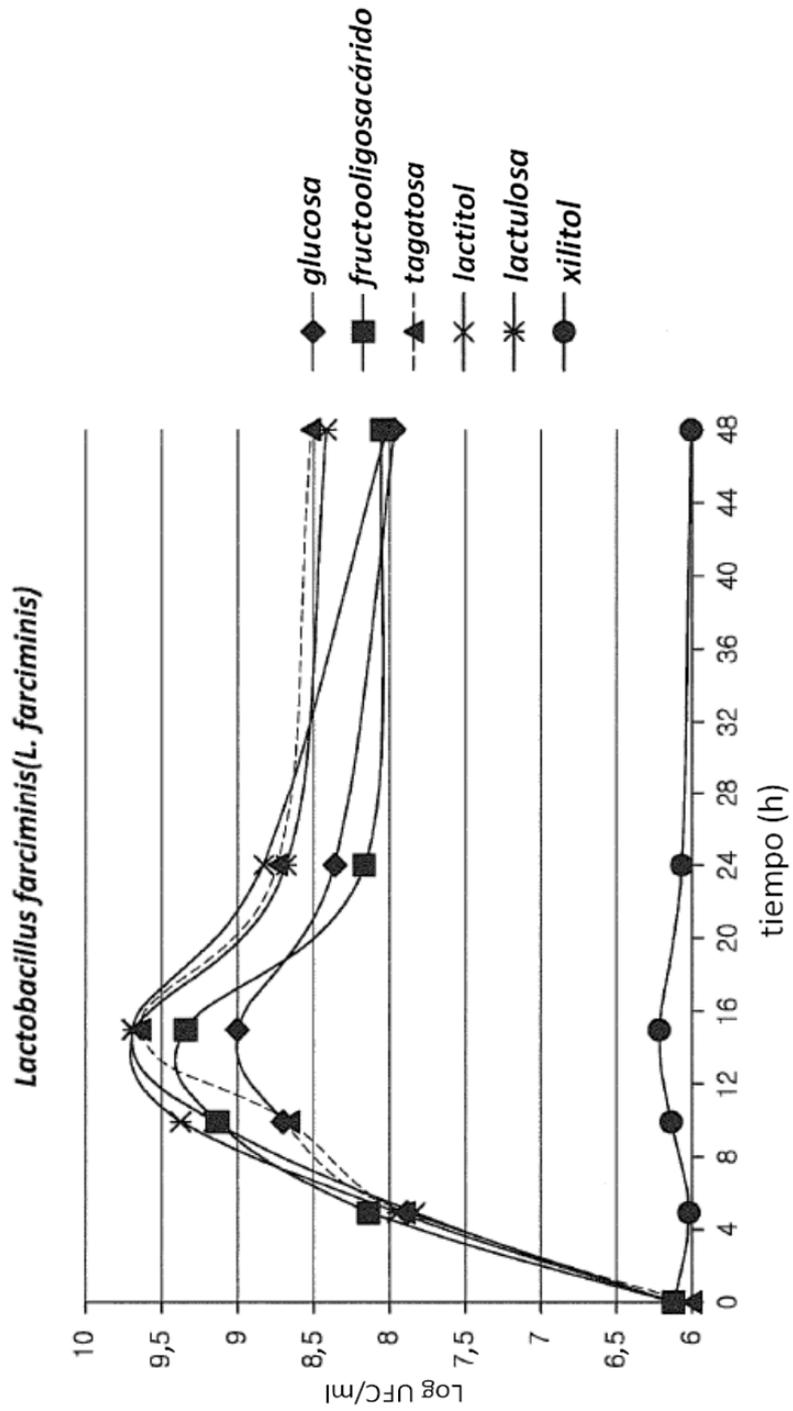


FIG.8

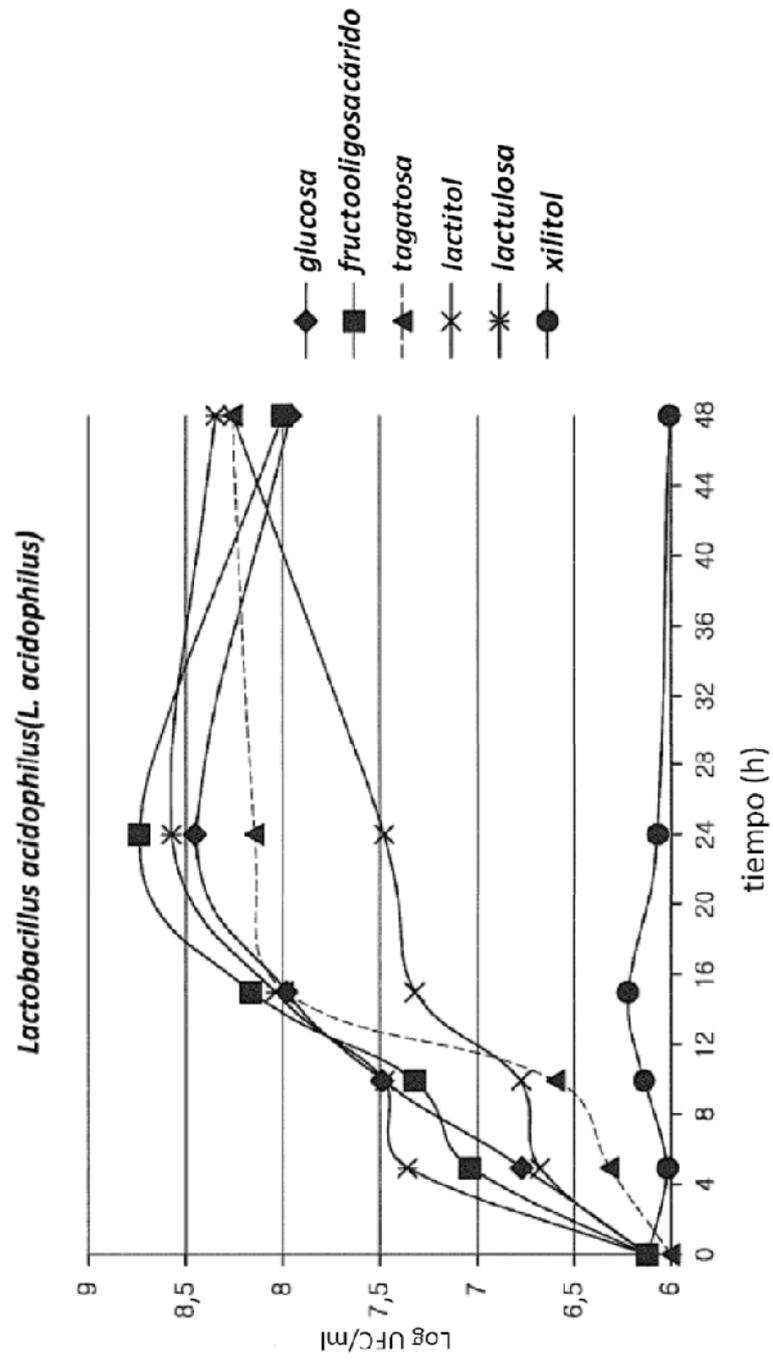


FIG.9