

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 476**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A23C 9/13** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2006 PCT/JP2006/310123**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2006 WO06126476**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2006 E 06756429 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 1884566**

54 Título: **Sustancia fermentada con bacterias ácido lácticas y producto alimenticio lácteo fermentado que la contiene**

30 Prioridad:

**27.05.2005 JP 2005155582**

**27.05.2005 JP 2005155583**

**12.08.2005 JP 2005234747**

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

**06.04.2018**

73 Titular/es:

**KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (100.0%)  
1-19, HIGASHISHINBASHI 1-CHOME MINATO-KU  
TOKYO 105-8660, JP**

72 Inventor/es:

**OGASAWARA, NOBUHIRO;  
ISHII, MAYUMIC;  
YOSHIKAWA, MASAKIC;  
KUDO, TATSUYUKIC;  
AKAHOSHI, RYOISHIC;  
MATSUI, AKIHISAC;  
MIZUSAWA, SUSUMUC;  
KIMIZUKA, HARUYUKIC y  
SUZUKI, TAKAOC**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 662 476 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

Sustancia fermentada con bacterias ácido lácticas y producto alimenticio lácteo fermentado que la contiene

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a productos de fermentación de bacterias ácido lácticas, y más específicamente a productos de fermentación de bacterias ácido lácticas, que contienen bacterias ácido lácticas viables a alta concentración, y también a productos de leche fermentados que contienen tales productos de fermentación de bacterias ácido lácticas.

**Antecedentes de la técnica**

El cultivo de bacterias ácido lácticas se lleva a cabo de varias maneras; la más utilizada es mediante el uso de leche animal en la producción de preparaciones de bacterias ácido lácticas, y también en la producción de leche fermentada, bebidas de bacterias ácido lácticas, queso, etc. Sin embargo, generalmente, las bacterias ácido lácticas tienen diferentes auxotrofías dependiendo de la especie, y en general no crecen lo suficiente en un medio que consista solo en leche animal. Por lo tanto, incluso con una cepa que tenga una capacidad de proliferación relativamente buena entre bacterias ácido lácticas, el cultivo debe continuarse durante varios días para obtener un producto de fermentación tal como leche fermentada o bebida de bacterias ácido lácticas, de suficiente acidez en su producción.

Sin embargo, tal cultivo de bacterias ácido lácticas de larga duración produce una reducción en el recuento de células viables y, por lo tanto, no se considera necesariamente un método de cultivo preferido para la producción de bebidas de bacterias ácido lácticas, leche fermentada o similares, todos los cuales dan importancia al recuento de células viables con la expectativa de obtener diversos efectos fisiológicos.

Por otro lado, en la producción de diversas bebidas o alimentos, cada uno de los cuales otorga importancia al sabor de un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas, las cepas a usar no pueden seleccionarse únicamente desde el punto de vista de su capacidad de proliferación. Las bacterias ácido lácticas de escasa capacidad de proliferación se pueden usar en algún caso para la disponibilidad de productos de fermentación con buen sabor.

En el cultivo de las bacterias ácido lácticas, por lo tanto, es una práctica común añadir varias sustancias promotoras del crecimiento de antemano a un medio con el fin de mejorar la eficacia del cultivo. Los ejemplos de sustancias promotoras del crecimiento, que generalmente se consideran efectivas, incluyen extracto de *Chlorella*, sales de hierro, vitaminas, proteólitos que incluyen aminoácidos o péptidos y extracto de levadura.

Además, como otras técnicas destinadas a promover el crecimiento de bacterias ácido lácticas, se ha descrito recientemente un método que utiliza un extracto acuoso de posos de sake y/o un extracto acuoso de posos de sake que se ha tratado con una proteasa (Documento de Patente 1), un método que utiliza un extracto de hojas de una planta de *Coffea arabica* (Documento de Patente 2), un método que utiliza partes de pulpa de papaya incluyendo sus pieles (Documento de Patente 3), un método que utiliza un extracto de cuerpos de algas de microalgas marinas (Documento de Patente 4), un método que utiliza uno o más vegetales o similares seleccionados del grupo que consiste en brócoli, coliflor, col rizada, zurrón de pastor, rábano, mostaza torre, ranúnculo de hojas de apio, mostaza de apio blanco, berros amargos japoneses, rúcula amarilla, berros, mostaza de hoja, mostaza marrón, wasabi (pasta de rábano picante verde), herbácea perenne, nabo largo japonés, encurtido de nabo japonés, nabo, colza, repollo, espinacas, komatuna (*Brassica campestris* var. *peruviridis*), apio, perejil, lechuga y manzana (Documento de Patente 5), un método que utiliza uno o más tipos de verduras o similares seleccionados del grupo que consiste en calabaza esponja, pepino, melón dulce, calabaza, ñame, taro, 'KONJAK', rábano japonés, zanahoria, tomate, pimiento verde, oca, cebolla galesa, col china, brotes de soja y mandarina (Documento de Patente 6), un método que utiliza un extracto de té (Documentos de Patente 7 y 8), un que utiliza una sal de calcio (Documento de Patente 9) y un método que utiliza un extracto de jengibre, té o cebolla verde (Documento de Patente 10), etc.

Sin embargo, para mantener la utilidad o la eficacia de las bacterias ácido lácticas, es necesario no solo promover el crecimiento de las bacterias, sino también reducir la muerte de las bacterias y mejorar la viabilidad de las bacterias en el producto de fermentación por parte de bacterias ácido lácticas. Generalmente, una reducción en la viabilidad de las bacterias ácido lácticas se vuelve pronunciada cuando se prepara un alimento de leche fermentada baja en grasa que contiene producto de fermentación de bacterias ácido lácticas de leche desnatada en polvo o similar, o cuando la fermentación del ácido láctico ha procedido demasiado. La reducción en la viabilidad de las bacterias ácido lácticas, por lo tanto, se vuelve más grave cuando se prepara un alimento de leche fermentada bajo en calorías o un alimento de leche fermentada de bajo pH. La *Chlorella* o similar se conoce como un material utilizable para evitar la reducción de la viabilidad de las bacterias ácido lácticas y para mantener el recuento celular de bacterias ácido lácticas en un alimento de leche fermentada.

En la producción de una bebida o alimento tal como un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas o un alimento de leche fermentada que contiene las mismas, sin embargo, una sustancia convencionalmente conocida

añadida para promover el crecimiento de bacterias ácido lácticas o una sustancia convencionalmente conocida añadida para mejorar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas puede afectar al propio sabor del producto en muchos casos y también puede provocar un aumento en el costo del producto, cuando se utiliza en una cantidad tal que produce suficientes efectos. Además, incluso si es posible mantener un estado donde está contenida una gran cantidad de bacterias ácido lácticas viables, las bacterias ácido lácticas no se pueden mantener activas, lo que hace que sea difícil en algunos casos esperar suficientes efectos fisiológicos.

- [Documento de patente 1] JP-A-05-015366
- [Documento de patente 2] JP-A-06-125771
- [Documento de patente 3] JP-A-07-023777
- [Documento de patente 4] JP-A -07-051057
- [Documento de patente 5] JP-A-11-266860
- [Documento de patente 6] JP-A-02-242667
- [Documento de patente 7] JP-B- 2667421
- [Documento de patente 8] JP-B-3223326
- [Documento de patente 9] JP-B-2673333
- [Documento de patente 10] JP-A-2001-190272

## Divulgación de la invención

### Problemas a resolver por la invención

Un objeto de la presente invención es, por lo tanto, encontrar una sustancia nueva, cuya mera adición y mezcla a un medio haga posible no solo aumentar fácilmente el recuento celular de bacterias ácido lácticas viables sino también mantener el recuento de células viables incluso después de la preparación de un producto final sin desarrollar problemas de aroma y sabor, y usar la sustancia para la provisión de un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas, conteniendo dicho producto de fermentación una cantidad de bacterias ácido lácticas viables, o una bebida o alimento que utiliza el producto de fermentación.

### Medios para resolver los problemas

Para lograr el objeto descrito anteriormente, los presentes inventores han llevado a cabo una extensa investigación. Como resultado, se ha descubierto que sin perjudicar el aroma y el sabor de un producto de fermentación que se obtiene mediante bacterias ácido lácticas, las actividades proliferativas de las bacterias ácido lácticas se pueden mejorar fácilmente añadiendo un nuevo extracto de una planta específica a un medio y cultivar las bacterias ácido lácticas en el mismo. Además, los presentes inventores también han encontrado que el cultivo de bacterias ácido lácticas en un medio que contiene el extracto mencionado anteriormente y un ácido graso específico, hace posible obtener un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas que contiene bacterias ácido lácticas viables a alta concentración sin una reducción en sus actividades. Además, los presentes inventores también han encontrado que diversas bebidas o alimentos, tales como alimentos lácteos fermentados, preparados mediante los métodos mencionados anteriormente están libres de cualquier problema de aroma y sabor, lo que conduce a la finalización de la presente invención.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona así un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas, que se ha obtenido cultivando bacterias ácido lácticas en un medio que comprende un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*), como se define en la reivindicación 1.

En otro aspecto de la presente invención, también se proporciona un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas, que se ha obtenido cultivando bacterias ácido lácticas en un medio que comprende un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*), y ácido oleico o un derivado del mismo, como se define adicionalmente en la reivindicación 3.

En un aspecto adicional de la presente invención, también se proporciona un alimento lácteo fermentado que comprende el producto de fermentación descrito anteriormente.

En otro aspecto adicional de la presente invención, también se proporciona un método para producir un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas, que comprende cultivar bacterias ácido lácticas en un medio que comprende un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*), como se define adicionalmente en la reivindicación 7.

En otro aspecto más de la presente invención, también se proporciona un método para producir un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas, que comprende cultivar bacterias ácido lácticas en un medio que comprende un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*), y ácido oleico o un derivado del mismo, como se define adicionalmente en la reivindicación 8.

**Efecto de la invención**

- 5 El extracto, que es útil en el producto de fermentación de bacterias ácido lácticas de la presente invención y se ha derivado de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*), tiene excelentes efectos estimulantes del crecimiento o efectos de mejora de la viabilidad para las bacterias ácido lácticas y, además, prácticamente no tiene ningún efecto sobre el aroma y el sabor. Un alimento de leche fermentada, que se ha obtenido añadiendo y mezclando el extracto y contiene el producto de fermentación de bacterias ácido lácticas, es por lo tanto excelente para la promoción de la salud y tiene una gran utilidad como bebida o alimento que no sufre mucho deterioro en el aroma y el sabor
- 10 En particular, el uso combinado del extracto descrito anteriormente con ácido oleico o un derivado del mismo puede reducir la muerte de bacterias incluso en alimentos lácteos fermentados bajos en grasa o alimentos lácteos fermentados de bajo pH, garantizando así el recuento de células viables en el producto y su viabilidad.

**Mejor modo de llevar a cabo la invención**

- 15 El producto de fermentación de bacterias ácido lácticas de la presente invención se obtiene fermentando bacterias ácido lácticas en condiciones de cultivo convencionalmente conocidas, excepto por el uso de un medio que contiene un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) (en lo sucesivo, puede ser simplemente denominado “un extracto”). Además, se puede utilizar un medio que contiene un extracto de al menos un material alimenticio seleccionado del grupo que consiste en salvado de arroz, hojas de caqui, perilla, *Houttuynia cordata* Thunb, *Eucommia ulmoides* Oliv., cúrcuma, clavo de olor y canela.

- 25 Entre los materiales alimenticios que pueden utilizarse como materia prima para el extracto mencionado anteriormente, el salvado de arroz es una mezcla de pericarpios, capas de aleurona y gérmenes de granos (arroz integral) disponibles a partir de *Oryza sativa* sin la paja de arroz. Se sabe que este salvado de arroz tiene efectos tales como mejora de la inmunidad, prevención del hígado graso y similares.

- 30 Las hojas de caqui incluyen hojas de la planta de *Diospyros Kaki* Thunb, *Diospyros loto* L., o *Diospyros loto* L. var. *glabra* Makino. En la presente invención, *Diospyros Kaki* Thunb es particularmente preferida entre las plantas del género *Diospyros* porque se sabe que las hojas tienen efectos tales como la supresión de los estornudos, la congestión nasal, la secreción nasal y similares.

- 35 Perilla incluye *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *acuta* Kudo, *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *acuta* Kudo forma *viridis* Makino, *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *crispa* (Thunb) Decne. En la presente invención, *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *acuta* Kudo es particularmente preferida. Para obtener un extracto de perilla, se pueden usar hojas, ramas y semillas, siendo particularmente preferidas las hojas. Se sabe que la perilla tiene efectos tales como efectos antialérgicos, efectos hipoglucémicos y de rejuvenecimiento de la piel.

- 40 *Houttuynia cordata* Thunb. es una planta que pertenece a *Houttuynia cordata*. Para obtener un extracto de *Houttuynia cordata* Thunb., se pueden usar partes herbales aéreas y partes de ramas, siendo particularmente preferidas las partes herbales. Se sabe que *Houttuynia cordata* Thunb. tiene efectos supresores de la inflamación mucosal.

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

- 50 La cúrcuma es el rizoma de *Cúrcuma longa* L. o *Curcuma aromatica* Salisb. En la presente invención, *Cúrcuma longa* L. es particularmente preferida entre las plantas que pertenecen a Curcuma. Se sabe que *Cúrcuma longa* L. tiene efectos tales como efectos de mejora de la función hepática, efectos de prevención de la resaca, efectos antiseoretos gástricos y efectos de mejora de la disfunción gastrointestinal.

- 55 El clavo de olor es el brote de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry o *Eugenia caryophyllata* Thunb. Se sabe que el clavo de olor tiene efectos conservantes, actividades de contracción uterina, efectos de reducción del dolor dental y similares.

- 60 La canela es la corteza de *Cinnamomum zeylanicum* Nees o *Cinnamomum cassia* Blume. *Cinnamomum zeylanicum* Nees es particularmente preferida entre estas plantas de Cinnamomum. Se sabe que la canela tiene efectos tales como actividades antibacterianas, efectos de calentamiento del cuerpo, efectos antipiréticos, efectos de activación del sistema digestivo, efectos de alivio de varios síntomas del resfriado, alivio de la indigestión, alivio de la diarrea y náuseas.

- 65 *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) es una planta perteneciente al género Rubus. Para obtener un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*), se pueden usar sus hojas y tallos usados, siendo el uso de sus hojas particularmente preferido. *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) está suscitando atención en los últimos años por

sus actividades antiinflamatorias y efectos antialérgicos.

Para obtener un extracto de uno o más de los materiales alimenticios descritos anteriormente, solo es necesario extraer con un disolvente el material o materiales alimenticios ya sea como están o después de aplicar  
5 opcionalmente procesos tales como lavado, pelado, secado y/o trituración. Dichos extractos se pueden usar solos o en combinación. También se puede usar un extracto mixto, que se obtiene mezclando una pluralidad de materiales alimenticios y extrayéndolos.

Los disolventes utilizables en la extracción incluyen agua y disolventes orgánicos tales como alcoholes inferiores que  
10 tienen de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, etanol, acetato de etilo, glicerol y propilenglicol. Dos o más de estos disolventes se pueden usar juntos como un disolvente mixto. Entre estos disolventes, se prefieren particularmente agua y disolventes acuosos tales como agua - alcoholes inferiores.

En la invención, se utiliza la extracción con ácido de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) ya que puede extraer de  
15 manera eficiente del material o materiales alimenticios componentes que mejoran las actividades proliferativas de las bacterias ácido lácticas y también puede producir excelentes efectos promotores del crecimiento incluso cuando el extracto se añade en una pequeña cantidad. La extracción con ácido se realiza en condiciones ácidas de pH 4,0 o inferior, especialmente pH 3,0 a 4,0. No se impone ninguna limitación particular sobre el ingrediente ácido adaptado para regular el pH del disolvente en esta extracción con ácido, y se puede usar cualquier componente en la medida  
20 en que sea ácido. Entre tales componentes ácidos, se prefieren ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido láctico y ácido acético.

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

El extracto obtenido como se describe anteriormente puede usarse como una solución obtenida inmediatamente  
después de la extracción, o como un extracto concentrado obtenido por purificación y concentración del extracto  
30 obtenido por medio de ultrafiltración, centrifugación, o como un extracto en polvo obtenido por secado adicional del extracto concentrado mediante secado por pulverización o liofilización.

Al añadir el extracto mencionado anteriormente a un medio donde las bacterias ácido lácticas pueden crecer, su  
cantidad puede determinarse preferiblemente después de una verificación experimental ya que los efectos de  
35 promoción del crecimiento resultantes pueden diferir dependiendo de las cepas a cultivar, la composición del medio y la aplicación del producto cultivado. En general, sin embargo, el extracto puede añadirse en una cantidad preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 10 % en peso (en lo sucesivo, simplemente referido como “ %”), más preferiblemente de aproximadamente 0,01 % a 5 % calculado en términos de extracto que tiene 10 grados Brix (contenido de azúcar).

Estos extractos se pueden añadir en una cantidad mayor que 10 % o más. Sin embargo, los efectos de promoción  
40 del crecimiento pueden no ser tan proporcionales a la cantidad añadida. Por el contrario, una cantidad excesivamente grande del extracto puede afectar al aroma y el sabor de la bebida o alimento que contiene el medio resultante. Por lo tanto, no se prefiere añadir el extracto en una cantidad excesivamente grande. Por otro lado, una cantidad de un extracto tal menor que 0,01 %, puede no producir los efectos de promoción del crecimiento  
45 suficientemente y, por lo tanto, no es preferible.

En la presente invención, es posible obtener efectos sinérgicos promotores del crecimiento y efectos de mejora de la  
viabilidad para bacterias ácido lácticas añadiendo ácido oleico o un derivado del mismo (en lo sucesivo, denominado  
50 simplemente “ácido teoleico”) al medio que contiene el extracto. El ácido oleico a añadir junto con el extracto al medio es ácido oleico libre, una sal metálica de ácido oleico o un éster de ácido oleico seleccionado del grupo que consiste en oleato de glicerilo, éster de oleato de poliglicerilo y oleato de sacarosa. También es posible usar materiales alimenticios que contienen una gran cantidad de ácido oleico. Sin embargo, debe observarse que entre los que contienen el ácido oleico en sus estructuras, aquellos que tienen una forma tal como lisolecitina o similares pueden no ser capaces de conseguir los efectos del mantenimiento del recuento de células bacterianas y las  
55 actividades en el producto de fermentación de bacterias ácido lácticas de la invención.

Los ejemplos específicos preferidos del ácido oleico incluyen oleato de sodio y oleato de potasio y oleato de glicerilo,  
éster de ácido de oleato de poliglicerilo y oleato de sacarosa. Entre los ésteres de oleato anteriormente descritos, se  
60 prefiere oleato de glicerilo u oleato de poliglicerilo por sus altos efectos de aumentar el recuento de células y mejorar la viabilidad una vez completado el cultivo. Desde el punto de vista de las propiedades físicas tales como la solubilidad en los medios, se prefiere el oleato de sacarosa. Estos ácidos oleicos se pueden usar solos o en combinación.

El ácido oleico se puede añadir preferiblemente a un medio en una cantidad tal que su concentración final en el  
65 producto llega a 5 a 50 ppm, preferiblemente de 5 a 25 ppm en términos de ácido oleico. Una cantidad del ácido oleico menor que 5 ppm puede no ser capaz de exhibir suficientemente los efectos sinérgicos de activar el

crecimiento y suprimir la muerte de bacterias en el producto cuando se usa en combinación con el extracto. Una cantidad del ácido oleico mayor que 50 ppm, por otro lado, puede ser un problema en cuanto al costo y puede inhibir la capacidad de proliferación de bacterias y, por lo tanto, no es preferible.

5 En la presente invención, el momento de la adición del extracto y el ácido oleico a un medio puede ser preferiblemente, pero no se limita a, antes de la fermentación por bacterias ácido lácticas. También se pueden añadir durante la fermentación por bacterias ácido lácticas, o después de la finalización de la fermentación por bacterias ácido lácticas. Se pueden añadir en varias porciones. Es particularmente preferido añadir el extracto y los ácidos oleicos antes de la fermentación por bacterias ácido lácticas, debido a que el recuento de células y la viabilidad de las bacterias una vez completado el cultivo pueden mantenerse a niveles elevados.

10 Los medios a los que se añadirán el extracto y el ácido oleico incluirán medios de leche animal compuestos de leche fresca, como leche de vaca, leche de cabra, leche de caballo y leche de oveja o productos lácteos como leche desnatada en polvo, leche entera en polvo y nata fresca, y varios medios sintéticos. Estos medios pueden ser aquellos que contienen componentes que se usan en medios ordinarios para bacterias ácido lácticas. Dichos componentes incluyen, por ejemplo, vitaminas tales como vitamina A, vitamina B, vitamina C y vitamina E, diversos péptidos y aminoácidos, y sales tales como sales de calcio y sales de magnesio.

15 En la presente invención, no se impone ninguna limitación particular sobre las bacterias ácido lácticas a usar para cultivo en la medida en que es un microorganismo comúnmente usado en la producción de alimentos. Ilustrativos son bacterias del género *Lactobacillus* tales como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus cremoris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus yoghurti*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* y *Lactobacillus johnsonii*, bacterias del género *Streptococcus* tales como *Streptococcus thermophilus*, bacterias del género *Lactococcus* tales como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus plantarum* y *Lactococcus raffinolactis*, bacterias del género *Enterococcus* tales como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Entre estas bacterias ácido lácticas, se prefiere usar una o más especies seleccionadas del grupo que consiste en las bacterias del género *Lactobacillus*, las bacterias del género *Streptococcus* y las bacteria del género *Lactococcus*. Debe observarse que el término "bacterias ácido lácticas" como se usa en la presente memoria significa bacterias anaerobias facultativas, y no incluye las bacterias del género *Bifidobacterium*, que son bacterias anaerobias.

20 Las bacterias ácido lácticas mencionadas anteriormente también incluyen aquellas que no crecen suficientemente con medios compuestos de leches de animales, y el extracto para uso en la presente invención produce efectos particularmente notables en el cultivo de tales bacterias. Específicamente, se pueden obtener excelentes efectos promotores de crecimiento cuando el extracto se añade a los medios después de cultivar bacterias ácido lácticas tales como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus cremoris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

25 No se imponen limitaciones particulares sobre las condiciones de cultivo para bacterias ácido lácticas con el fin de obtener el producto de fermentación de bacterias ácido lácticas de la presente invención. Por ejemplo, sin embargo, el cultivo puede realizarse a aproximadamente 30 a 40 °C durante 1 a 7 días. Como condiciones adicionales para dicho cultivo, se puede seleccionar un método adecuado para bacterias ácido lácticas a cultivar a partir de un método de reposo, agitación, mezcla aireación o similar.

30 El producto de fermentación de bacterias ácido lácticas obtenido como se describió anteriormente contiene bacterias viables de ácido láctico a alta concentración sin una reducción en su capacidad de proliferación. Este producto se puede mezclar con otros materiales auxiliares, cuya adición a los alimentos generalmente está aprobada, para producir alimentos lácteos fermentados.

35 La expresión "alimentos lácteos fermentados" incluye leches fermentadas, productos lácteos, bebidas tales como bebidas de bacterias ácido lácticas, yogurt firme, yogur cremoso, yogur natural y otros, kéfir, queso, etc., que se definen en la Ordenanza Ministerial sobre Normas de composición, etc. para leche y productos lácteos. Los alimentos lácteos fermentados de la presente invención, por lo tanto, incluyen diversas bebidas y alimentos que hacen uso de diversas bacterias ácido lácticas, por ejemplo, leches fermentadas, bebidas de bacterias ácido lácticas, kéfir, queso y similares, que pueden ser de tipo simple, de tipo aromatizado, de tipo fruta, de tipo edulcorado, de tipo cremoso, de tipo bebida, de tipo sólido (firme) o de tipo congelado.

40 Estos alimentos lácteos fermentados se obtienen añadiendo, al producto de fermentación de bacterias ácido lácticas descrito anteriormente, un edulcorante como jarabe de almidón y otros diversos materiales alimenticios, por ejemplo, componentes opcionales tales como diversos carbohidratos, espesantes, emulsionantes y diversas vitaminas, según sea necesario. Los ejemplos específicos de estos materiales alimenticios incluyen carbohidratos tales como sacarosa, glucosa, fructosa, paratinosa, trehalosa, lactosa, xilosa y maltosa; glicoalcoholes tales como sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, palatinato, jarabe de almidón reducido y jarabe de maltosa reducido; edulcorantes de alta intensidad de dulzor tales como aspartamo, taumatina, sucralosa, acesulfamo K y estevia; diversos espesantes

(estabilizantes) tales como agar, gelatina, carragenano, goma guar, goma xantano, pectina, goma de algarrobo, goma gellan, carboximetilcelulosa, polisacáridos de soja y alginato de propilenglicol; emulsionantes tales como ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de glicerina, ésteres de ácidos grasos de poliglicerina, ésteres de ácidos grasos de sorbitán y lecitina; grasas lácteas como la nata; mantequilla y crema agria; condimentos a base de agrios tales como ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, ácido málico, ácido tartárico y ácido glucónico; diversas vitaminas como la vitamina A, vitaminas del grupo B, vitamina C y vitamina E; minerales como calcio, magnesio, zinc, hierro y manganeso; y saborizantes como yogur, bayas, naranja, membrillo chino, perilla, cítricos, manzana, menta, uva, albaricoque, pera, crema pastelera, melocotón, melón, plátano, tropical, hierba, té negro y café.

El alimento de leche fermentada obtenido como se describió anteriormente tiene una gran utilidad como bebida o alimento, el cual tiene buen aroma y sabor, es excelente en la promoción de la salud y no experimenta muchos deterioros en el aroma y sabor. Además, el producto de fermentación de bacterias ácido lácticas de la presente invención es excelente en cuanto a efectos promotores del crecimiento y efectos de mejora de la viabilidad para bacterias ácido lácticas debido al extracto añadido al cultivo, y por lo tanto, tiene y mantiene una cantidad suficiente de bacterias ácido lácticas. Cuando se incorpora ácido oleico o similar en el medio además del extracto, se reconocen los efectos sinérgicos con respecto a los efectos promotores del crecimiento y los efectos de mejora de la viabilidad de las bacterias ácido lácticas.

Aunque el mecanismo de acción del extracto sobre los efectos promotores del crecimiento y los efectos de mejora de la viabilidad para las bacterias ácido lácticas en la presente invención aún no se ha elucidado, se presume que el extracto contiene abundantes minerales, y estos minerales contribuyen a la promoción del crecimiento y a la mejora de la viabilidad de las bacterias ácido lácticas. También se supone que, cuando el extracto se combina con ácidos oleicos o similares, los efectos sinérgicos de los minerales y del ácido oleico o similares consiguen la mejora del crecimiento y la viabilidad de las bacterias ácido lácticas.

### Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación en mayor detalle basándose en los Ejemplos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la presente invención no se limita en modo alguno a los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 1

<Preparación del extracto 1>

La cúrcuma (el rizoma de *Cúrcuma longa* L.), la parte herbal aérea de *Houttuynia cordata* Thunb., las hojas de *Eucommia ulmoides* Oliv., las hojas de caqui (hojas de *Diospyros kaki* Thunb.), las hojas de *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *acuta* Kudo, el clavo de olor (el brote de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et Perry) y la canela (la corteza de *Cinnamomum zeylanium* Nees) se sometieron por separado a procesos tales como pelado y trituración, y luego se extrajeron durante 60 minutos con agua caliente a 90 °C (en una cantidad 10 veces el peso de la materia prima correspondiente) para preparar extractos de cúrcuma, *Houttuynia cordata* Thunb., *Eucommia ulmoides* Oliv., hojas de caqui, perilla, clavo de olor y canela, respectivamente. Los extractos se concentraron por separado a 10 grados Brix en un evaporador.

#### Ejemplo 2

<Comparación en la capacidad de proliferación de las bacterias ácido lácticas>

Como medio basal, se proporcionó leche desnatada en polvo al 12 %. Los extractos de cúrcuma, *Houttuynia cordata* Thunb., *Eucommia ulmoides* Oliv., hojas de caqui, perilla, clavo de olor y canela, que se habían preparado y ajustado a 10 grados Brix en el Ejemplo 1, se añadieron al 1 % a alícuotas del medio basal, respectivamente, seguido de esterilización para preparar medios esterilizados. En cada uno de esos medios, se inoculó un iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029 al 1 %, y la cepa de bacterias se cultivó después a 37 °C durante 48 horas. Como medio comparativo empleado se preparó uno añadiendo "MEAST" (marca registrada de cervecera, autolisado de cerveza, producto de Asahi Food and Healthcare Co., Ltd.) al 0,15 % al medio basal y luego esterilizando el medio. La cantidad de "MEAST" así añadida es el límite superior de un rango donde sus efectos adversos sobre el aroma y el sabor del cultivo son aceptables.

Las capacidades de proliferación de las bacterias ácido lácticas en los respectivos cultivos se compararon basándose en las acideces de los cultivos (valores de titulación de sosa cáustica 0,1 N cuando se tomaban porciones (9 g) de los respectivos cultivos y un ácido orgánico en las porciones cultivadas respectivas con sosa cáustica 0,1 N hasta que se alcanzó un pH 8,5, unidad: ml) como indicios. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Medio basal	MEAST	Extracto de cúrcuma	Extracto de <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	Extracto de <i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	Extracto de hoja de caqui	Extracto de perilla	Extracto de clavo de olor	Extracto de canela
Acidez								
8,2	10,1	11,1	10,9	11,0	11,3	10,7	10,9	10,7

Como se desprende de la Tabla 1, se ha confirmado que la acidez aumenta más en un medio con un extracto de cúrcuma, *Houttuynia cordata* Thunb., *Eucommia ulmoides* Oliv., hojas de caqui, perilla, clavo de olor o canela añadidas en el mismo, que en un medio sin la adición de ningún extracto o medio con "MEAST" añadido en el mismo. Esto indica que el crecimiento de las bacterias ácido lácticas puede promoverse mediante estos extractos.

### Ejemplo 3

<Verificación de los efectos del extracto obtenido mediante extracción con ácido sobre la capacidad de proliferación de las bacterias ácido lácticas>

Se trataron hojas de caqui en condiciones similares a las de la preparación del extracto en el Ejemplo 1 excepto por el uso de agua y soluciones acuosas, cuyos pH se habían ajustado a 3,0, 4,0 y 5,0, respectivamente, con ácido cítrico en lugar de agua caliente. A alícuotas de un medio con leche desnatada en polvo al 15 % (con un contenido de 3 % de glucosa), conteniendo dichas alícuotas los extractos así obtenidos añadidos al mismo al 1 %, respectivamente, se inoculó iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029 al 1 %. La cepa de bacterias se cultivó después a 35 °C durante 5 días. Las acideces de los cultivos resultantes se midieron de una manera similar a la del Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

[Tabla 2]

Cepa de prueba	Agua caliente	pH 3,0	pH. 4,0	pH 5,0
<i>Lactobacillus casei</i> YIT9029	23,1	24,4	24,5	23,5

Como se muestra en la Tabla 2, se ha confirmado que la capacidad de proliferación de las bacterias ácido lácticas tiende a volverse notable con un extracto obtenido ajustando el pH de un disolvente de extracción a 5,0 o menos.

### Ejemplo 4

<Preparación del extracto 2>

La cúrcuma (el rizoma de *Cúrcuma longa* L.), la parte herbal aérea de *Houttuynia cordata* Thunb., las hojas de *Eucommia ulmoides* Oliv., las hojas de caqui (hojas de *Diospyros kaki* Thunb.), las hojas de *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *acuta* Kudo, el clavo de olor (el brote de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et Perry) y la canela (la corteza de *Cinnamomum zeylanium* Nees) se sometieron por separado a procesos tales como pelado y trituración, y luego se extrajeron en condiciones similares a las del Ejemplo 1 excepto por el uso de agua y una solución acuosa, cuyo pH se ajustó a pH 4,0 con ácido cítrico, (en una cantidad 10 veces el peso de la materia prima correspondiente) para preparar extractos de cúrcuma, *Houttuynia cordata* Thunb., *Eucommia ulmoides* Oliv., hojas de caqui, perilla, clavo de olor y canela, respectivamente. Los extractos se concentraron por separado a 10 grados Brix en un evaporador.

### Ejemplo 5

<Verificación de los efectos del extracto sobre la capacidad de proliferación de las bacterias ácido lácticas>

Como medio basal, se proporcionó leche desnatada en polvo al 16 %. Los extractos de cúrcuma, *Houttuynia cordata* Thunb., *Eucommia ulmoides* Oliv., hojas de caqui, perilla, clavo de olor y canela, al 1 %, que se habían ajustado a 10 grados Brix en el Ejemplo 4, se añadieron al 1 % a alícuotas del medio basal, para preparar los medios, respectivamente. En cada uno de esos medios, los iniciadores de diversas cepas de bacterias ácido lácticas se inocularon al 0,1 %, y esas cepas de bacterias se cultivaron a 37 °C durante 48 horas.

En el cultivo anterior se utilizaron *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus cremoris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Las acideces de los cultivos resultantes se midieron de una manera similar a la del Ejemplo 2 para comparar las capacidades de proliferación de las diversas bacterias ácido lácticas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

[Tabla 3]

Cepa de prueba	Medio basal	Extracto de cúrcuma	Extracto de <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	Extracto de <i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	Extracto de hoja de caqui	Extracto de perilla	Extracto de clavo de olor	Extracto de canela	Acidez	
<i>Lactobacillus casei</i> YIT9029	8,1	13,5	13,1	13,0	14,0	12,2	14,1	13,2		
<i>Lactobacillus acidophilus</i> YIT0070	9,0	11,4	10,7	11,1	11,7	11,4	10,0	10,4		
<i>Lactobacillus cremoris</i> YIT2002	1,4	6,7	6,1	6,4	7,1	5,8	6,2	6,1		
<i>Lactobacillus helveticus</i> YIT0100	17,2	17,8	17,2	17,5	17,7	17,4	17,5	17,6		
<i>Lactobacillus gasserii</i> YIT0192	2,8	9,1	9,5	9,8	10,0	8,1	8,1	7,2		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YIT0098	14,9	16,1	15,8	16,4	16,2	15,4	16,7	16,1		
<i>Streptococcus thermophilus</i> YIT2001	7,6	8,9	8,5	8,9	8,7	7,9	8,4	8,1		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> YIT2013	6,2	7,2	6,8	6,9	7,0	6,2	6,4	6,5		

Como se desprende de la Tabla 3, los efectos de estos extractos sobre la capacidad de proliferación de diversas bacterias ácido lácticas se han confirmado con sustancialmente todas las cepas, aunque varían dependiendo de la especie de las cepas. Se han confirmado efectos notables particularmente con los extractos de cúrcuma, *Houttuynia cordata* Thunb., *Eucommia ulmoides* Oliv. y hojas de caqui. Además, se ha confirmado que los efectos proliferativos tienen una tendencia a dar excelentes efectos a las cepas que son pobres en proliferación en el medio basal. Esto sugiere que incluso cuando se usan bacterias ácido lácticas difíciles de cultivar en un medio animal, el uso de estos extractos permite obtener fácilmente un cultivo de un recuento de células grandes.

## 10 Ejemplo 6

<Preparación de bebidas de bacterias ácido lácticas>

Se proporcionó un medio con leche desnatada en polvo al 15 % (con un contenido del 3 % de glucosa) como medio basal. Los diversos extractos preparados en el Ejemplo 4 se añadieron al 0,1 % a alícuotas del medio basal para proporcionar medios de ensayo, respectivamente. Después de esterilizar esos medios con calor, se inoculó el iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029 al 0,5 % en los respectivos medios, y se cultivó la cepa de bacterias a 35 °C durante 5 días para obtener los respectivos cultivos. Cada cultivo se homogeneizó a 15 MPa, y a 20 partes en peso de ese cultivo, se añadieron 80 partes en peso de una solución de azúcar al 15 %, que se había esterilizado a 100 °C durante 5 minutos, y un saborizante de yogur (producto de Yakult Material Co., Ltd.) se añadió adicionalmente al 0,1 % para preparar un producto lácteo. Se realizó una prueba de sabor por cinco evaluadores bien experimentados en cada uno de los productos lácteos obtenidos como se describe anteriormente. No se confirmó ninguna diferencia entre ninguna de las bebidas de bacterias ácido lácticas y el producto de control que contenía el cultivo obtenido con el uso del medio basal.

Además, se evaluó que los diversos extractos no provocaban efectos relacionados con el aroma y/o el sabor del medio basal y que combinaban muy bien. Por lo tanto, también se ha confirmado que su uso en cultivos para bebidas o alimentos tales como bebidas de bacterias ácido lácticas no conduce a deterioros en sus aromas o sabores.

## 30 Ejemplo 7

<Efectos de la cantidad añadida de extracto de hoja de caqui sobre el aroma y el sabor y los efectos proliferativos>

35 (1) Preparación de extractos de hojas de caqui

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

40 (2) Determinación de una cantidad a añadir

A alícuotas de un medio con leche desnatada en polvo al 15 % (con un 3 % de contenido de glucosa) se añadieron los extractos de hoja de caqui preparados anteriormente en (1) a concentraciones en el intervalo de 0,01 a 10 %, respectivamente, seguido de esterilización a 100 °C durante 60 minutos para preparar medios para cultivar bacterias ácido lácticas. En estos medios se inoculó el iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029 al 1 %, y la cepa de bacterias se cultivó a 35 °C hasta que las acideces (valores de titulación de hidróxido de sodio 0,1 N requeridos para la neutralización de porciones de 9 g de las muestras respectivas) se convirtieron en 24. El recuento de bacterias ácido lácticas en cada uno de los cultivos se determinó mediante medio BCP. Cada cultivo se homogeneizó a 15 MPa, y a 20 partes en peso del cultivo homogeneizado, se añadieron 80 partes en peso de una solución de azúcar al 15 %, que se había esterilizado a 100 °C durante 5 minutos, y se añadió adicionalmente un aromatizante de yogur (producto de Yakult Material Co., Ltd.) al 0,1 % para preparar un producto lácteo. En estos productos lácteos, cinco evaluadores entrenados en evaluar características organolépticas realizaron una evaluación del aroma y del sabor en base a los siguientes estándares. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

55 <Estándares de evaluación>

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

[Tabla 4]

	Cantidad añadida de extracto de hoja de caqui (%)	Tiempo de cultivo (h)	Recuento celular de bacterias ácido lácticas viables (ufc/ml)	Evaluación del aroma y el sabor
No añadido	0	192	$1,9 \times 10^9$	A
Extracción con agua	0,01	147	$2,7 \times 10^9$	A
	0,1	130	$3,2 \times 10^9$	A
	1	121	$5,5 \times 10^9$	B
	5	116	$5,3 \times 10^9$	B
	10	116	$5,2 \times 10^9$	D
Extracción con ácido (pH 4,0)	0,01	128	$3,5 \times 10^9$	A
	0,1	120	$5,4 \times 10^9$	A
	1	117	$5,7 \times 10^9$	B
	5	117	$5,9 \times 10^9$	B
	10	115	$5,5 \times 10^9$	D

Se ha confirmado a partir de la Tabla 4 que la adición de un extracto de hojas de caqui al 0,1 % aproximadamente es eficaz para la promoción del cultivo por bacterias ácido lácticas y, además, puede aumentar el recuento celular de bacterias ácido lácticas viables. También se ha determinado que la adición de un extracto de hojas de caqui incluso hasta en un 10 % a un medio no puede producir ningún efecto excelente adicional en proporción a las cantidades añadidas, sino por el contrario, el aroma y el sabor derivados del extracto tienden a afectar al aroma y el sabor del producto. También se ha confirmado que los efectos promotores del crecimiento del extracto se exhiben más notablemente con uno obtenido por extracción con ácido que con uno obtenido por extracción con agua.

#### Ejemplo 8

<Preparación del extracto 3>

El salvado de arroz (una mezcla de pericarpios, capas de aleurona y gérmenes de granos (arroz integral) disponible a partir de *Oryza sativa* sin la paja del arroz), la cúrcuma (el rizoma de *Cúrcuma longa* L.), la parte herbal aérea de *Houttuynia cordata* Thunb., las hojas de *Eucommia ulmoides* Oliv., las hojas de caqui (hojas de *Diospyros kaki* Thunb.), las hojas de *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *acuta* Kudo, el clavo de olor (el brote de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et Perry) y la canela (la corteza de *Cinnamomum zeylanium* Nees) se sometieron por separado a procesos tales como pelado y trituración, y luego se extrajeron durante 60 minutos con agua caliente a 80 °C (en una cantidad 10 veces el peso de la materia prima correspondiente) para preparar extractos de cúrcuma, *Houttuynia cordata* Thunb., *Eucommia ulmoides* Oliv., hojas de caqui, perilla, clavo de olor y canela, respectivamente. Los extractos se concentraron por separado a 10 grados Brix en un evaporador.

#### Ejemplo 9

<Determinación del recuento celular de bacterias ácido lácticas tras la finalización del cultivo (1)>

A alícuotas de un medio con leche desnatada en polvo al 15 % (con un 3 % de contenido de glucosa) como medio basal, se añadieron los extractos al 1 % de salvado de arroz, hojas de caqui, perilla, *Houttuynia cordata* Thunb., *Eucommia ulmoides* Thunb., cúrcuma, clavo de olor y canela, que se prepararon y ajustaron a 10 grados Brix en el Ejemplo 8, respectivamente, seguido de la esterilización a 100 °C durante 60 minutos para preparar medios esterilizados. En esos medios esterilizados, se inoculó el iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029 al 1 %, y la cepa bacteriana se cultivó a 37 °C hasta que el pH del medio respectivo alcanzó 3,7. Los recuentos de células viables se determinaron de manera similar una vez completado el cultivo. Además, también se preparó un medio con oleato de sodio añadido en lugar del extracto descrito anteriormente para dar una concentración de 25 ppm en términos de ácido oleico y otro medio tanto con el extracto descrito anteriormente como con el oleato de sodio añadido. Los recuentos de células viables se determinaron de manera similar una vez completado el cultivo. Hay que señalar que la determinación de cada recuento de células viables se realizó contando las colonias formadas después de incubar la muestra correspondiente, que se había diluido adecuadamente en una solución fisiológica, a 37 °C durante 3 días en medio BCP. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

[Tabla 5]

	Aditivo	Recuento celular de bacterias ácido lácticas (ufc/ml)		Aditivo (s)	Recuento celular de bacterias ácido lácticas (ufc/ml)
Producto Comparativo 1	No añadido	$1,9 \times 10^9$	Producto Comparativo 2	Oleato de sodio	$2,1 \times 10^9$

	Aditivo	Recuento celular de bacterias ácido lácticas (ufc/ ml)		Aditivo (s)	Recuento celular de bacterias ácido lácticas (ufc/ml)
Producto de la invención 1	Extracto de salvado de arroz	$4,7 \times 10^9$	Producto de la invención 2	Extracto de salvado de arroz, oleato de sodio	$7,1 \times 10^9$
Producto de la invención 3	Extracto de hoja de caqui	$5,2 \times 10^9$	Producto de la invención 4	Extracto de hoja de caqui, oleato de sodio	$7,8 \times 10^9$
Producto de la invención 5	Extracto de perilla	$3,6 \times 10^9$	Producto de la invención 6	Extracto de perilla, oleato de sodio	$6,6 \times 10^9$
Producto de la invención 7	Extracto de <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	$4,2 \times 10^9$	Producto de la invención 8	Extracto de <i>Houttuynia cordata</i> Thunb, oleato de sodio	$7,0 \times 10^9$
Producto de la invención 9	Extracto de <i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	$4,3 \times 10^9$	Producto de la invención 10	Extracto de <i>Eucommia ulmoides</i> Oliv., oleato de sodio	$7,4 \times 10^9$
Producto de la invención 11	Extracto de cúrcuma	$4,2 \times 10^9$	Producto de la invención 12	Extracto de cúrcuma, oleato de sodio	$6,8 \times 10^9$
Producto de la invención 13	Extracto de clavo de olor	$4,5 \times 10^9$	Producto de la invención 14	Extracto de clavo de olor, oleato de sodio	$6,9 \times 10^9$
Producto de la invención 15	Extracto de canela	$4,4 \times 10^9$	Producto del ejemplo 16	Extracto de canela, oleato de sodio	$6,4 \times 10^9$

Se desprende de la Tabla 5 que el uso combinado de cualquiera de los extractos de salvado de arroz, hojas de caqui, perilla, *Houttuynia cordata* Thunb., *Eucommia ulmoides* Thunb., cúrcuma, clavo de olor y canela con oleato de sodio pueden aumentar sinérgicamente el recuento celular de bacterias ácido lácticas una vez completado el cultivo en comparación con el uso exclusivo del mismo extracto o el oleato de sodio.

### Ejemplo 10

<Determinación del recuento celular de bacterias ácido lácticas viables en productos lácteos (1)>

Los cultivos preparados en el Ejemplo 9 (Productos Comparativos 1 y 2 y los Productos de la invención 3 y 4) se homogeneizaron cada uno por separado a 15 MPa. A alícuotas (20 partes en peso) de esos cultivos homogeneizados, se añadieron 80 partes en peso de una solución de azúcar al 15 % que se había esterilizado a 100 °C durante 5 minutos, seguido de la adición adicional de un aromatizante de yogur al 0,1 % para preparar productos lácteos. Esos productos lácteos se llenaron en recipientes, y los recuentos de células viables se determinaron de una manera similar a la del Ejemplo 9 inmediatamente después de la producción de los productos lácteos y después de su almacenamiento a 10 °C durante 14 días. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

[Tabla 6]

	Aditivo(s)	Recuento celular de bacterias ácido lácticas (ufc/ml)	
		Inmediatamente después de la producción	Después del almacenamiento a 10 °C durante 14 días
Producto Comparativo 3	No añadido	$4,2 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
Producto Comparativo 4	Oleato de sodio 25 ppm	$9,0 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$
Producto de la invención 17	Extracto de hoja de caqui 1 % en peso	$1,0 \times 10^9$	$3,8 \times 10^8$
Producto de la invención 18	Extracto de hoja de caqui 1 % en peso Oleato de sodio 25 ppm	$1,8 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$

Se desprende de la Tabla 6 que un producto lácteo obtenido utilizando, como materia prima, un cultivo preparado usando un extracto de hojas de caqui y oleato de sodio en combinación es excelente en su efecto para suprimir los cambios en el recuento celular de bacterias ácido lácticas en el producto durante el almacenamiento en comparación con un producto lácteo disponible a partir del uso de un cultivo que no contiene ninguno de estos (no añadido) o que contiene solo uno de ellos.

### Ejemplo 11

<Determinación del recuento celular de bacterias ácido lácticas viables tras la finalización del cultivo (2)>

Se cultivó *Lactobacillus casei* YIT9029 en condiciones similares al Ejemplo 9 excepto que a alícuotas del medio basal preparado en el Ejemplo 9, se añadieron diversos emulsionantes a base de oleato, respectivamente, cada uno en combinación con 1 % del extracto de hojas de caqui preparado en el Ejemplo 8, de modo que la cantidad de emulsionantes ascendía a 25 ppm en términos del contenido de ácido oleico. Los recuentos de células viables de las bacterias en los cultivos resultantes se determinaron de acuerdo con el método del Ejemplo 9. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

[Tabla 7]

	Aditivo(s)	Recuento celular de bacterias ácido lácticas (ufc/ml)
Producto de la invención 19	Extracto de hoja de caqui	$2,3 \times 10^9$
Producto de la invención 20	Extracto de hoja de caqui, oleato de sodio	$7,1 \times 10^9$
Producto de la invención 21	Extracto de hoja de caqui, oleato de glicerilo	$7,3 \times 10^9$
Producto de la invención 22	Extracto de hoja de caqui, trioleato de pentaglicerilo	$3,9 \times 10^9$
Producto de la invención 23	Extracto de hoja de caqui, monooleato de hexaglicerilo	$6,9 \times 10^9$
Producto de la invención 24	Extracto de hoja de caqui, decaoleato de decaoglicerilo	$4,2 \times 10^9$
Producto de la invención 25	Extracto de hoja de caqui, oleato de sacarosa	$7,0 \times 10^9$
Producto de la invención 26	Extracto de hoja de caqui, oleato de glicerilo	$3,2 \times 10^9$

De la Tabla 7 se desprende que el uso del ácido oleico como derivado de uno cualquiera de los emulsionantes puede proporcionar al cultivo resultante un recuento celular más alto de bacterias ácido lácticas debido al uso del extracto de hojas de caqui en combinación.

El uso de oleato de glicerilo, monooleato de hexaglicerilo u oleato de sacarosa entre estos emulsionantes puede producir efectos notables.

### Ejemplo 12

<Determinación del recuento celular de bacterias ácido lácticas viables tras la finalización del cultivo (3)>

En condiciones similares a la preparación del extracto en el ejemplo 8 excepto por el uso de agua y soluciones acuosas, cuyos pH se habían ajustado a pH a 3,0, 4,0 y 5,0, respectivamente con ácido cítrico en lugar de agua caliente, se trataron el salvado de arroz, las hojas de caqui, *Eucommia ulmoides* Thunb., la cúrcuma y el clavo de olor para preparar sus extractos de 10 grados Brix. A alícuotas de un medio de leche desnatada en polvo al 15 % con los extractos así preparados añadidos al 0,1 %, respectivamente, se añadió oleato de sodio a 25 ppm en términos del contenido de ácido oleico, y además, se inoculó el iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029 al 1 %. La cepa de bacterias se cultivó a continuación a 37 °C hasta que el pH alcanzó 3,7. Los recuentos de células viables de bacterias ácido lácticas en los cultivos resultantes se determinaron de acuerdo con el método del Ejemplo 9. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

[Tabla 8]

	Aditivos	pH de la extracción	Recuento celular de bacterias ácido lácticas (ufc/ml)
Producto de la invención 27	Extracto de salvado de arroz, oleato de sodio	5,0	$7,1 \times 10^9$
Producto de la invención 28		4,0	$9,0 \times 10^9$
Producto de la invención 29		3,0	$9,4 \times 10^9$
Producto de la invención 30	Extracto de hoja de caqui, oleato de sodio	5,0	$8,5 \times 10^9$
Producto de la invención 31		4,0	$8,8 \times 10^9$
Producto de la invención 32		3,0	$9,6 \times 10^9$
Producto de la invención 33	Extracto de <i>Eucommia ulmoides</i> Oliv., oleato de sodio	5,0	$7,0 \times 10^9$
Producto de la invención 34		4,0	$8,4 \times 10^9$
Producto de la invención 35		3,0	$9,1 \times 10^9$
Producto de la invención 36	Extracto de cúrcuma, oleato de sodio	5,0	$7,4 \times 10^9$
Producto de la invención 37		4,0	$8,5 \times 10^9$
Producto de la invención 38		3,0	$8,4 \times 10^9$
Producto de la invención 39	Extracto de clavo de olor, oleato de sodio	5,0	$7,0 \times 10^9$
Producto de la invención 40		4,0	$8,5 \times 10^9$
Producto de la invención 41		3,0	$8,4 \times 10^9$

Se desprende de la Tabla 8 que un extracto obtenido por extracción con ácido tiende a proporcionar un recuento de células más alto una vez completado el cultivo a medida que el pH del disolvente utilizado en la extracción se vuelve más bajo. Este efecto se observa de forma pronunciada especialmente con diversos extractos obtenidos a pH 5,0 o inferior, más preferiblemente, a pH 4,0 o inferior.

### Ejemplo 13

<Determinación del recuento celular de bacterias ácido lácticas viables tras la finalización del cultivo (4)>

Usando una solución de ácido cítrico de pH 4,0, se preparó un extracto de hojas de caqui de 10 grados Brix en condiciones similares al Ejemplo 8. A la leche desnatada en polvo al 10 %, se añadió el extracto al 1 % y además, también se añadió oleato de sodio a 25 ppm en términos de ácido oleico. La mezcla resultante se esterilizó para preparar un medio esterilizado. En las alícuotas de ese medio esterilizado, se inocularon iniciadores de diversas bacterias ácido lácticas al 0,1 %, respectivamente y las cepas de bacterias se cultivaron a 37 °C durante 24 horas. Como bacterias ácido lácticas, se utilizaron *Lactobacillus bulgaricus* YIT0098, *Lactobacillus acidophilus* YIT0071 y *Lactobacillus casei* YIT9029. Además, esas bacterias ácido lácticas se cultivaron de manera similar a la descrita anteriormente en un medio de leche desnatada en polvo al 10 % con fines de comparación. Los recuentos celulares de bacterias ácido lácticas en los cultivos resultantes se determinaron de una manera similar a la del Ejemplo 9. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

[Tabla 9]

	Aditivos	Recuento celular de bacterias ácido lácticas (ufc/ml)	
		Medio sin adición	Medio con adición
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> YIT0098	Extracto de hoja de caqui, oleato de sodio	$3,3 \times 10^8$	$6,8 \times 10^8$
<i>Lactobacillus acidophilus</i> YIT0071		$3,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$
<i>Lactobacillus casei</i> YIT9029		$7,7 \times 10^8$	$5,0 \times 10^9$

Se desprende de la Tabla 9 que el efecto de aumentar el recuento celular de bacterias ácido lácticas, que existe a partir del uso combinado de un extracto de hoja de caqui extraído con ácido y oleato de sodio, puede reconocerse para todas las bacterias ácido lácticas aunque el efecto se ha confirmado que difiere algo de acuerdo con la especie de bacteria ácido láctica.

5

**Ejemplo 14**

<Determinación del recuento celular de bacterias ácido lácticas viables tras la finalización del cultivo (5)>

10 Usando una solución de ácido cítrico de pH 4,0, se preparó un extracto de hojas de caqui de 10 grados Brix en condiciones similares a las del Ejemplo 8. El extracto y el oleato de glicerilo, como ácido oleico, se añadieron a alícuotas de un medio de leche desnatada en polvo al 15 % (con un 3 % de contenido de glucosa) de manera que sus cantidades añadidas alcancen las que se muestran a continuación en la Tabla 10, respectivamente. Los medios resultantes se esterilizaron a 100 °C durante 60 minutos, para preparar medios esterilizados. En los respectivos  
 15 medios esterilizados, se inoculó el iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029 al 1 %, y la cepa bacteriana se cultivó a 37 °C hasta que su pH alcanzó 3,7. Además, el cultivo se llevó a cabo de forma similar como control añadiendo al medio un extracto de levadura (producto de DIFCO), que generalmente se conoce como promotor de cultivo, al 0,2 %.  
 20 Los recuentos celulares de bacterias ácido lácticas en los cultivos resultantes se determinaron de una manera similar a la del Ejemplo 9. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

[Tabla 10]

Cantidad añadida de ácido oleico (ppm)	0	5	25	50
Cantidad añadida de extracto de hoja de caqui (%)				
0	2,3×10 <sup>9</sup>			
0,01		5,0×10 <sup>9</sup>	5,1×10 <sup>9</sup>	5,4×10 <sup>9</sup>
0,1		7,4×10 <sup>9</sup>	8,0×10 <sup>9</sup>	7,6×10 <sup>9</sup>
5,0		8,5×10 <sup>9</sup>	9,0×10 <sup>9</sup>	9,1×10 <sup>9</sup>
10,0		9,1×10 <sup>9</sup>	9,5×10 <sup>9</sup>	9,4×10 <sup>9</sup>
Extracto de levadura (0,2)	2,7×10 <sup>9</sup>			

Se ha confirmado a partir de la Tabla 10 que el efecto de aumentar el recuento de células viables se reconoce claramente añadiendo 0,1 % o más del extracto de hoja de caqui y 5 ppm o más de ácido oleico en combinación.  
 25 También se ha indicado que el recuento de células viables resultante es mayor que el obtenido con la adición de un extracto de levadura.

**Ejemplo 15**

30 <Determinación del recuento celular de bacterias ácido lácticas viables en productos lácteos (2)>

Usando los cultivos preparados en el Ejemplo 14, se produjeron productos lácteos de una manera similar a la del Ejemplo 10. En estos productos lácteos, cinco evaluadores entrenados en evaluar características organolépticas realizaron una evaluación del aroma y del sabor en base a los siguientes estándares. Los resultados se muestran en la Tabla 11.  
 35

<Estándares de evaluación>

- |                 |               |
|-----------------|---------------|
| (Clasificación) | (Descripción) |
| A:              | Muy bueno     |
| B:              | Bueno         |
| C:              | Normal        |
| D:              | Malo          |
| E:              | Muy malo      |

[Tabla 11]

Cantidad añadida de ácido oleico (ppm)	0	5	25	50
Cantidad añadida de extracto de hoja de caqui (%)				
0	B			
0,01		B	B	B
0,1		B	B	B
5,0		B	B	B
10,0		C	C	C
Extracto de levadura (0,2)	D			

De la Tabla 11 se desprende que cuando la adición del extracto de hojas de caqui al medio es del 10 %, es decir, al 2 % por producto lácteo, afecta al aroma y al sabor del producto lácteo, independientemente de la cantidad añadida de ácido oleico y por lo tanto, que esta cantidad añadida se puede considerar como el límite superior de adición aceptable. Debe observarse que incluso con la cantidad de adición del extracto de hoja de caqui, el producto tenía mejor aroma y sabor que el obtenido con la adición del extracto de levadura.

#### Ejemplo 16

<Preparación del extracto 4>

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

#### Ejemplo 17

<Verificación de los efectos para las bacterias ácido lácticas (1)>

Como medio basal, se proporcionó leche desnatada en polvo al 12 %. El extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*), que se había preparado y ajustado a 10 grados Brix en el Ejemplo 16, se añadió al 0,5 % al medio basal seguido de esterilización para preparar un medio esterilizado. En ese medio esterilizado, se inoculó el iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029 al 1 %, y la cepa de bacterias se cultivó a 37 °C durante 48 horas. Empleado como ejemplo comparativo, se preparó uno añadiendo "MEAST" (marca registrada de autolisado de levadura de cerveza, producto de Asahi Food and Healthcare Co., Ltd.) al 0,15 % al medio basal y luego esterilizando el medio. La cantidad de "MEAST" así añadida es el límite superior de un intervalo en el cual sus efectos adversos sobre el aroma y el sabor del cultivo son aceptables.

La capacidad de proliferación de las bacterias ácido lácticas donde se comparó el cultivo se basó en la acidez del cultivo (valor de titulación de sosa cáustica 0,1 N cuando se tomaba una porción (9 g) de cultivo y se alcanzaba una acidez de un ácido orgánico en la porción de cultivo; unidad: ml como índice). Los resultados se muestran en la Tabla 12.

[Tabla 12]

	Acidez
Medio basal	8,0
"MEAST"	10,0
Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> )	11,7

Como se desprende de la Tabla 12, se ha confirmado que la acidez aumenta en un medio con el extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) añadido en el mismo en comparación con un medio sin adición o con "MEAST" añadido al mismo. Esto indica que la capacidad de proliferación de las bacterias ácido lácticas puede ser promovida por un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*).

**Ejemplo 18**

<Verificación de los efectos para las bacterias ácido lácticas (2)>

En condiciones similares a las del método de preparación del extracto en el Ejemplo 16, excepto por el uso de soluciones acuosas (90 °C), cuyos pH se habían ajustado a pH 3,0, 4,0 y 5,0, respectivamente con ácido cítrico en lugar de agua caliente, las hojas de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) fueron tratadas para preparar extractos de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) de 10 grados Brix. A alícuotas de un medio de leche desnatada en polvo al 15 % (con un 3 % de contenido de glucosa), dichas partes alícuotas que contienen los extractos así obtenidos añadidos al 1 %, respectivamente, se inoculó el iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029 al 1 %. La cepa de bacterias se cultivó a 35 °C durante 5 días. Las acideces de los cultivos resultantes se midieron de una manera similar a la del Ejemplo 17. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

[Tabla 13]

Cepa de prueba	Agua caliente	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0
<i>Lactobacillus casei</i> YIT9029	23,2	24,6	24,8	23,8

Como se muestra en la Tabla 13, se ha confirmado que la capacidad de proliferación de las bacterias ácido lácticas tiende a ser notable con un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) obtenido ajustando el pH de un disolvente de extracción a 5,0 o menos.

**Ejemplo 19**

<Preparación del extracto 5>

Hojas de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) se sometieron a procesamientos tales como pelado, trituración y tostado, y luego se extrajeron en condiciones similares a las del Ejemplo 16 con una solución acuosa de ácido cítrico ajustada a pH 4,0 (en una cantidad 10 veces más que el peso de las hojas de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*)) para preparar un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*). El extracto así obtenido se concentró a 10 grados Brix en un evaporador.

**Ejemplo 20**

<Verificación de los efectos de las bacterias ácido lácticas (3)>

Se suministró leche desnatada en polvo al 16 % como medio basal, y al medio, el extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) se ajustó a 10 grados Brix en el Ejemplo 19 al 1 % para preparar un medio. En alícuotas de ese medio, se inocularon iniciadores de diversas bacterias ácido lácticas al 0,1 %, y las cepas de bacterias se cultivaron a 37 °C durante 48 horas.

En el cultivo anterior se utilizaron *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus cremoris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Las acideces de los cultivos resultantes se midieron de una manera similar a la del Ejemplo 17 para comparar la capacidad de proliferación de las diversas bacterias ácido lácticas. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

[Tabla 14]

Cepa de prueba	Medio basal	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> )
<i>Lactobacillus casei</i> YIT9029	8,7	14,5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> YTT0070	9,2	11,4
<i>Lactobacillus cremoris</i> YIT2002	1,2	6,5
<i>Lactobacillus helveticus</i> YTT0100	17,0	17,0
<i>Lactobacillus gasseri</i> YIT0192	2,2	11,0
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YIT0098	14,5	16,5
<i>Streptococcus thermophilus</i> YTT2001	7,0	8,2
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> YIT2013	6,4	6,8

Como se desprende de la Tabla 14, los efectos del extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) sobre la capacidad de proliferación de las diversas bacterias ácido lácticas se han confirmado con sustancialmente todas las cepas, aunque varían dependiendo de la especie de las cepas. Además, se ha confirmado que estos efectos proliferativos tienen tendencia a dar excelentes efectos a las cepas que no son muy buenas en la proliferación en el

medio basal. Esto sugiere que incluso cuando se usa una bacteria ácido láctica difícil de cultivar en un medio animal, el uso de un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) hace posible obtener fácilmente un producto de fermentación con un gran número de células bacterianas.

5 **Ejemplo 21**

<Investigación sobre la cantidad de extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) a añadir>

10 (1) Preparación del extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*)

Usando una solución acuosa de ácido cítrico cuyo pH se había ajustado a pH 4,0, en una cantidad igual a las hojas de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*), se preparó un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) en condiciones similares a las del Ejemplo 16. El extracto se concentró a continuación a 10 grados Brix en un evaporador.

15 (2) Determinación de una cantidad a añadir

20 A alícuotas de un medio de leche desnatada en polvo al 15 % (con un 3 % de contenido de glucosa), se añadió un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) de 10 grados Brix, que se preparó anteriormente en (1) en concentraciones en un intervalo de 0,01 a 10 %, respectivamente, seguido de la esterilización a 100 °C durante 60 minutos para preparar un medio para el cultivo de bacterias ácido lácticas. En estos medios se inoculó el iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029 al 1 % y la cepa bacteriana se cultivó a 35 °C hasta que las acideces (valores de titulación de hidróxido sódico 0,1 N requeridos para la neutralización de porciones de 9 g de muestras respectivas) se convirtieron en 24. El recuento celular de las bacterias ácido lácticas en cada uno de los cultivos se determinó mediante medio BCP. El cultivo se homogeneizó a 15 MPa, y a 20 partes en peso del cultivo homogeneizado, se añadieron 80 partes en peso de una solución de azúcar al 15 %, que se había esterilizado a 100 °C durante 5 minutos a 100 °C, y se añadió adicionalmente el saborizante de yogur (producto de Yakult Material Co., Ltd.) al 0,1 % para preparar un producto lácteo. En estos productos lácteos, cinco evaluadores entrenados en evaluar características organolépticas realizaron una evaluación del aroma y del sabor en base a los siguientes estándares. 30 Los resultados se muestran en la Tabla 15.

<Estándares de evaluación>

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

35 [Tabla 15]

	Cantidad añadida de extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ) (%)	Tiempo de cultivo (h)	Recuento celular de bacterias ácido lácticas viables (ufc/ml)	Evaluación del aroma y del sabor
No añadido	0	184	$1,2 \times 10^9$	A
Extracción en agua	0,01	144	$2,3 \times 10^9$	A
	0,1	123	$3,0 \times 10^9$	A
	1	120	$4,2 \times 10^9$	A
	5	118	$4,5 \times 10^9$	B
	10	116	$4,8 \times 10^9$	C
Extracción con ácido (pH 4,0)	0,01	132	$3,0 \times 10^9$	A
	0,1	121	$4,2 \times 10^9$	A
	1	118	$5,1 \times 10^9$	A
	5	115	$4,9 \times 10^9$	B
	10	115	$5,3 \times 10^9$	C

40 Se desprende de la Tabla 15 que la adición al 0,01 % más o menos de un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) puede producir efectos proliferativos para las bacterias ácido lácticas y, además, puede aumentar el recuento celular de bacterias ácido lácticas viables. También se ha determinado que la adición de un extracto *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) incluso de hasta más del 10 % no produce un efecto adicional en proporción a la cantidad así añadida, sino que, por el contrario, tiende a afectar al aroma y al sabor del producto. También se ha confirmado que los efectos del extracto se exhiben más notablemente con uno obtenido por extracción con ácido, que con uno obtenido por extracción en agua.

**Ejemplo 22**

<Verificación de los efectos de las bacterias ácido lácticas (4)>

- 5 A alícuotas de un medio de leche desnatada en polvo al 15 % (con un 3 % de contenido de glucosa) como medio basal, se añadieron los extractos de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*), que se prepararon y ajustaron a 10 grados Brix en el Ejemplo 16 y en el Ejemplo 19, respectivamente, al 1 %, respectivamente, seguido de la esterilización a 100 °C durante 60 minutos para preparar medios esterilizados. En estos medios se inculó el iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029 al 1 % y la cepa bacteriana, que se cultivó a 37 °C hasta que el pH de los
- 10 medios respectivos alcanzó 3,7. Los recuentos de células viables se determinaron una vez completado el cultivo. Además, se añadió un medio con oleato de sodio en lugar del extracto descrito anteriormente para dar una concentración de 25 ppm en términos de ácido oleico y se preparó también otro medio tanto del extracto descrito anteriormente como el oleato de sodio añadido. Los recuentos de células viables se determinaron de manera similar una vez completado el cultivo. Debe observarse que la determinación de cada recuento de células viables se realizó
- 15 contando las colonias formadas después de incubar la muestra correspondiente, la cual se ha diluido adecuadamente en una solución fisiológica, solución salina a 37 °C durante 3 días en medio BCP. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

[Tabla 16]

	Aditivo (s)	Recuento celular de bacterias ácido lácticas (ufc/ml)
Producto Comparativo 5	No añadido	$1,7 \times 10^9$
Producto de la invención 42	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ) (agua caliente)	$4,1 \times 10^9$
Producto de la invención 43	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ) (pH 4,0)	$5,4 \times 10^9$
Producto Comparativo 6	Oleato de sodio	$2,5 \times 10^9$
Producto de la invención 44	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ) (agua caliente), oleato de sodio	$5,5 \times 10^9$
Producto de la invención 45	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ) (pH 4,0), oleato de sodio	$6,5 \times 10^9$

- 20 Se desprende de la Tabla 16 que el uso combinado de cualquiera de los extractos de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) con oleato de sodio pueden aumentar sinérgicamente el recuento celular de bacterias ácido lácticas en comparación con el uso exclusivo del correspondiente extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*).

**Ejemplo 23**

<Verificación de los efectos para las bacterias ácido lácticas (5)>

- 30 Los productos de fermentación de bacterias ácido lácticas preparados en el Ejemplo 22 (Productos de la invención 42, 43, 44 y 45) se homogeneizaron por separado a 15 MPa, y se añadieron a 20 partes en peso de alícuotas de los productos homogeneizados, 80 partes en peso de alícuotas de una solución de azúcar al 15 %, que se había esterilizado a 100 °C durante 5 minutos, y se añadió además un aromatizante de yogur al 0,1 % para preparar productos lácteos. Esos productos lácteos se rellenaron en envases, respectivamente y los recuentos celulares de las bacterias ácido lácticas viables en los productos lácteos respectivos se determinaron de una manera similar a la
- 35 del Ejemplo 22 inmediatamente después de su preparación y después de su almacenamiento a 10 °C durante 14 días. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

[Tabla 17]

	Aditivo(s)	Recuento celular de bacterias ácido lácticas (ufc/ml)	
		Inmediatamente después de la preparación	Después del almacenamiento a 10 °C durante 14 días
Producto Comparativo 7	No añadido	$3,4 \times 10^8$	$9,7 \times 10^7$
Producto de la invención 46	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ) (agua caliente) 1 % en peso	$8,2 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$

	Aditivo(s)	Recuento celular de bacterias ácido lácticas (ufc/ml)	
		Inmediatamente después de la preparación	Después del almacenamiento a 10 °C durante 14 días
Producto de la invención 47	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ) (agua caliente) 1 % en peso, oleato de sodio 25 ppm	$1,3 \times 10^9$	$7,4 \times 10^8$
Producto de la invención 48	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ) (pH 4,0) 1 % en peso	$1,0 \times 10^9$	$5,4 \times 10^8$
Producto de la invención 49	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ) (pH 4,0) 1 % en peso, oleato de sodio 25 ppm	$1,4 \times 10^9$	$8,4 \times 10^8$

Se desprende de la Tabla 17 que un producto lácteo obtenido utilizando, como materia prima, un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas, que se ha preparado utilizando un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) solo, o un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) y oleato de sodio en combinación, es excelente en el efecto de suprimir cambios en el recuento celular de bacterias ácido lácticas en el producto durante el almacenamiento en comparación con un producto lácteo obtenido utilizando un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas preparado sin ninguno de ellos. Además, el uso de un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) en combinación con oleato de sodio puede producir sinérgicamente los efectos en comparación con el uso exclusivo del extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*).

#### Ejemplo 24

<Verificación de los efectos para las bacterias ácido lácticas (6)>

Usando una solución acuosa de ácido cítrico de pH 4,0, se preparó un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) de 10 grados Brix en condiciones similares a las del Ejemplo 16. A la leche desnatada en polvo al 10 %, se añadió este extracto al 1 % y además, también se añadió oleato de sodio a 25 ppm en términos de ácido oleico. La mezcla resultante se esterilizó para preparar un medio esterilizado. A alícuotas de ese medio, se inocularon iniciadores de diversas bacterias ácido lácticas al 0,1 %, respectivamente y las cepas de bacterias se cultivaron a 37 °C durante 24 horas. Como bacterias ácido lácticas, se utilizaron *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*. Como ejemplos comparativos, esas bacterias ácido lácticas también se cultivaron de una manera similar a la descrita anteriormente usando leche desnatada en polvo al 10 % como medio. Los recuentos celulares de bacterias ácido lácticas en los cultivos resultantes se determinaron de una manera similar a la del Ejemplo 22. Los resultados se muestran en la Tabla 18.

[Tabla 18]

Cepa de prueba	Recuento celular de bacterias ácido lácticas (ufc/ml)	
	Medio sin adición	Medio con adición
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> YIT0098	$3,0 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$
<i>Lactobacillus acidophilus</i> YIT0071	$3,5 \times 10^8$	$6,4 \times 10^8$
<i>Lactobacillus casei</i> YIT9029	$8,2 \times 10^8$	$2,4 \times 10^9$

Se desprende de la Tabla 18 que los efectos de un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) y ácido oleico pueden reconocerse para todas las bacterias ácido lácticas, aunque se ha confirmado que los efectos difieren algo según la especie de bacteria ácido láctica.

#### Ejemplo 25

<Verificación de los efectos para las bacterias ácido lácticas (7)>

A alícuotas de un medio de leche desnatada en polvo al 15 % (con un 3 % de contenido de glucosa) como medio basal, se añadieron varios emulsionantes a base de oleato, respectivamente, cada uno en combinación con el 1 % del extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) preparado y ajustado a 10 grados Brix en el Ejemplo 19, de manera que la cantidad de emulsionantes ascendió a 25 ppm en términos del contenido de ácido oleico. Las mezclas resultantes se esterilizaron después a 100 °C durante 60 minutos para preparar medios esterilizados, respectivamente. En estos medios se inoculó el iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029 al 1 %, y la cepa bacteriana

se cultivó a 37 °C hasta que el pH del medio respectivo alcanzó 3,7. Los recuentos de células viables se midieron de una manera similar a la del Ejemplo 21. Los resultados se muestran en la Tabla 19.

[Tabla 19]

	Material añadido	Recuento celular de bacterias ácido lácticas (ufc/ml)
Producto de la invención 50	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> )	$1,8 \times 10^9$
Producto de la invención 51	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ), oleato de sodio	$6,0 \times 10^9$
Producto de la invención 52	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ), oleato de monoglicerilo	$6,5 \times 10^9$
Producto de la invención 53	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ), trioleato de pentaglicerilo	$4,2 \times 10^9$
Producto de la invención 54	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ), monooleato de hexaglicerilo	$5,0 \times 10^9$
Producto de la invención 55	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ), decaoleato de decaglicerina	$4,2 \times 10^9$
Producto de la invención 56	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ), oleato de sacarosa	$6,4 \times 10^9$
Producto de la invención 57	Extracto de <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee ( <i>Rosaceae</i> ), oleato de glicerilo	$3,1 \times 10^9$

5 Se ha confirmado que, como se muestra en la Tabla 19, el uso del ácido oleico como derivado de uno cualquiera de los emulsionantes puede producir efectos proliferativos para las bacterias ácido lácticas debido al uso del extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) en combinación. El uso de oleato de sodio, oleato de monoglicerilo u oleato de sacarosa entre estos emulsionantes puede producir efectos notables.

10

### Ejemplo 26

Verificación de los efectos para las bacterias ácido lácticas (8)>

15 Usando una solución acuosa de ácido cítrico de pH 4,0, se preparó un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) ajustado a 10 grados Brix en condiciones similares a las del Ejemplo 16. El extracto y el oleato de glicerilo, como ácido oleico, se añadieron a alícuotas de medio de leche desnatada en polvo al 15 % (con un contenido de 3 % de glucosa), de tal manera que su cantidad añadida alcanzó la que se muestran a continuación en la Tabla 20, respectivamente. Los medios resultantes se esterilizaron a 100 °C durante 60 minutos para preparar  
20 medios esterilizados. En los respectivos medios esterilizados se inoculó el iniciador de *Lactobacillus casei* YIT9029 al 1 %, y la cepa bacteriana se cultivó a 37 °C hasta que su pH alcanzó 3,7. Además, el cultivo se llevó a cabo de forma similar como control añadiendo un extracto de levadura (producto de DIFCO), que generalmente se conoce como promotor de cultivo, al 0,2 %, al medio. Los recuentos celulares de bacterias ácido lácticas en los cultivos resultantes se determinaron de una manera similar a la del Ejemplo 22. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

25

[Tabla 20]

Cantidad añadida de ácido oleico (ppm) \ Cantidad añadida de extracto de <i>Rubus suavissimus</i>	0	1	25	50
S. Lee ( <i>Rosaceae</i> )(%)				
0	$1,8 \times 10^9$			
0,01	$2,8 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$4,2 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$
0,1	$4,0 \times 10^9$	$4,9 \times 10^9$	$5,9 \times 10^9$	$6,2 \times 10^9$
1,0	$4,9 \times 10^9$	$6,1 \times 10^9$	$8,1 \times 10^9$	$7,8 \times 10^9$
5,0	$5,2 \times 10^9$	$6,3 \times 10^9$	$8,2 \times 10^9$	$8,5 \times 10^9$
10,0	$5,0 \times 10^9$	$6,1 \times 10^9$	$8,4 \times 10^9$	$8,3 \times 10^9$
Extracto de levadura (0,2)	$2,3 \times 10^9$			

Como se muestra en la Tabla 20, los efectos proliferativos para las bacterias ácido lácticas se pueden reconocer mediante la adición de ácido oleico a 0,01 ppm o superior.

5

**Ejemplo 27**

<Verificación de los efectos para las bacterias ácido lácticas (9)>

10 Usando el producto de fermentación de ácido láctico preparado en el Ejemplo 26, se produjeron productos lácteos de una manera similar a la del Ejemplo 21. En estos productos lácteos, cinco evaluadores entrenados en evaluar características organolépticas realizaron una evaluación del aroma y del sabor en base a los siguientes estándares. Los resultados se muestran en la Tabla 21.

[Tabla 21]

Cantidad añadida de ácido oleico (ppm) \ Cantidad añadida de extracto de <i>Rubus suavissimus</i>	0	1	25	50
S. Lee ( <i>Rosaceae</i> )(%)				
0	A			
0,01	A	A	A	A
0,1	A	A	A	A
1,0	A	A	A	A
5,0	B	B	B	B
10,0	C	C	C	C
Extracto de levadura (0,2)	D			

15

Se desprende de la Tabla 21 que de manera similar a lo obtenido en la Tabla 15, la adición del extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) al 10 % al medio, es decir, al 2 % por producto afecta al aroma y al sabor del producto independientemente de la cantidad añadida de ácido oleico. Cabe señalar que incluso con la adición del extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) en esa cantidad, el producto tenía un mejor aroma y sabor que el obtenido con la adición del extracto de levadura.

20

**Aplicabilidad industrial**

5 El producto de fermentación de bacterias ácido lácticas de la presente invención tiene una gran cantidad de células viables de bacterias ácido lácticas. El producto de fermentación no experimenta muchos deterioro en el aroma y el sabor ya que la muerte de las bacterias ácido lácticas se puede reducir. Por consiguiente, este producto de fermentación de bacterias ácido lácticas se puede usar de forma adecuada como materia prima para diversos productos lácteos fermentados.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas, que se ha obtenido cultivando bacterias ácido lácticas en un medio de leche animal que comprende un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) como un material alimenticio, donde el extracto se ha obtenido por extracción con ácido en condiciones ácidas a un pH no superior a 4,0; y donde las bacterias del género *Bifidobacterium* se excluyen de dicha bacteria ácido láctica.
- 10 2. Un producto de fermentación de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cantidad de extracto está en un intervalo de 0,01 a 10 % en peso.
- 15 3. Un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas, que se ha obtenido cultivando bacterias ácido lácticas en un medio de leche animal que comprende un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) como un material alimenticio y ácido oleico o un derivado del mismo; donde el extracto se ha obtenido por extracción con ácido en condiciones ácidas a un pH no superior a pH 4,0;
- 20 donde el ácido oleico o derivado del mismo es ácido oleico, un éster de ácido oleico seleccionado del grupo que consiste en oleato de glicerilo, éster de oleato de poliglicerilo y oleato de sacarosa, o una sal metálica de ácido oleico.
- 25 4. Un producto de fermentación de acuerdo con la reivindicación 3, donde el ácido oleico o derivado del mismo está en un intervalo de 1 a 50 ppm.
- 30 5. Un producto de fermentación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, donde el extracto está en un intervalo de 0,01 a 10 % en peso.
- 35 6. Un alimento de leche fermentada que comprende un producto de fermentación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un método para producir un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas, que comprende cultivar bacterias ácido lácticas en un medio de leche animal que comprende un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) como un material alimenticio; donde el extracto se ha obtenido por extracción con ácido en condiciones ácidas a un pH no superior a pH 4,0; y donde las bacterias del género *Bifidobacterium* se excluyen de dicha bacteria ácido láctica.
8. Un método para producir un producto de fermentación de bacterias ácido lácticas, que comprende cultivar bacterias ácido lácticas en un medio de leche animal que comprende un extracto de *Rubus suavissimus* S. Lee (*Rosaceae*) como un material alimenticio y ácido oleico o derivado del mismo; donde el extracto se ha obtenido mediante extracción con ácido en condiciones ácidas a un pH no superior a pH 4,0; donde el ácido oleico o derivado del mismo es ácido oleico, un éster de ácido oleico seleccionado del grupo que consiste en oleato de glicerilo, éster de oleato de poliglicerilo y oleato de sacarosa, o una sal metálica de ácido oleico.