

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 162**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

A23C 9/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2010 PCT/IB2010/053237**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12007794**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2010 E 10742898 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2593539**

54 Título: **Uso de manganeso para mejorar el crecimiento de L. casei en cultivos mixtos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
29.05.2017

73 Titular/es:

COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17, Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR

72 Inventor/es:

MARCHAL, LAURENT y
COLIN, CYRIL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 614 162 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

Uso de manganeso para mejorar el crecimiento de *L. casei* en cultivos mixtos

La invención se refiere a un método para mejorar el crecimiento de bacterias del grupo *Lactobacillus casei* en cultivos mixtos.

5 El grupo *Lactobacillus casei* abarca varias especies de bacterias del ácido láctico de gran interés para la industria alimentaria. En particular, se ha informado que las cepas del grupo *Lactobacillus casei*, que pertenecen a la especie *L. casei* subespecie *casei*, *L. casei* subespecie *paracasei*, y *L. casei* subespecie *rhamnosus*, tienen propiedades que mejoran la salud, y se usan como probióticos en diferentes productos alimenticios, que incluyen en particular los productos lácteos.

10 A menos que se especifique de otra manera, las expresiones *Lactobacillus casei* (o *L. casei*) se usan más adelante en la presente memoria para designar cualquier subespecie del grupo *Lactobacillus casei*, y en particular cualquiera de las subespecies *casei*, *paracasei*, o *rhamnosus* mencionadas anteriormente.

Una desventaja del uso de bacterias del grupo *Lactobacillus casei* en la producción de productos lácteos fermentados es su crecimiento lento en la leche.

15 Cuando se usa en un cultivo puro, el tiempo de fermentación de *L. casei* es muy largo, lo cual es una limitación para su uso en la producción industrial.

En la fabricación de productos lácteos probióticos, las bacterias *Lactobacillus casei* están asociadas a menudo con otras especies de bacterias del ácido láctico, probióticas o no. En muchos casos están combinadas con bacterias del yogur (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* o subespecie *lactis*), que proporcionan propiedades organolépticas específicas (tales como textura y sabor) al producto fermentado. Las bacterias del yogur crecen más rápido en la leche que *Lactobacillus casei*, por lo que permiten acelerar el proceso global de fermentación. Sin embargo, la acidificación rápida del medio por estas bacterias del yogur limita el crecimiento de *L. casei* en el cultivo mixto, y por lo tanto su población en el producto final.

20 Los inventores han descubierto que cuando se añadió manganeso a un cocultivo de *Lactobacillus casei* con otras bacterias del ácido láctico, en particular bacterias del yogur, se incrementó el crecimiento de *L. casei*, a la vez que no se observó ningún efecto sobre las otras bacterias del ácido láctico.

Un objetivo de la invención, por lo tanto, es el uso de manganeso para mejorar selectivamente el crecimiento de las bacterias del grupo *Lactobacillus casei* en un cultivo mixto que contiene bacterias del ácido láctico que no pertenecen al grupo *Lactobacillus casei*.

30 De manera más específica, la invención proporciona un método para mejorar selectivamente el crecimiento de las bacterias del grupo *Lactobacillus casei* en un cultivo mixto que contiene bacterias del ácido láctico que no pertenecen al grupo *Lactobacillus casei*, en el que dicho método comprende:

- a) proporcionar un medio de fermentación que contiene manganeso;
- b) inocular dicho medio de fermentación con las bacterias;
- 35 c) fermentar el medio inoculado hasta que alcanza un pH objetivo deseado;
- d) detener la fermentación y recuperar el producto fermentado.

Las bacterias del grupo *Lactobacillus casei* se seleccionan preferiblemente de la especie *L. casei* subespecie *casei*, *L. casei* subespecie *paracasei*, *L. casei* subespecie *rhamnosus*. Las bacterias lácticas que no pertenecen al grupo *Lactobacillus casei* se seleccionan preferiblemente de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis* y *Streptococcus thermophilus*.

40 El medio de fermentación es preferiblemente un medio de fermentación láctico, es decir, un medio líquido basado en leche. Se podría considerar cualquier fuente de leche animal o vegetal. Sin embargo, se prefiere la leche de vaca. Por ejemplo, puede ser leche entera, parcialmente o completamente desnatada, opcionalmente reconstituida a partir de leche en polvo. También puede consistir en una fracción de la leche, por ejemplo suero, o mezclas de dos o más fracciones de la leche. Preferiblemente, dicho medio se usará sin una complementación que no sea de manganeso. Sin embargo, se puede complementar opcionalmente con ingredientes tales como azúcares, almidón, espesantes, etc., con tal de que estos ingredientes no interfieran con el crecimiento de una o más de las cepas cocultivadas, y con tal de que sean adecuados para el consumo humano o animal.

50 Dicho medio se esteriliza de manera clásica antes de la inoculación con las cepas de *Lactobacillus*. La esterilización se lleva a cabo mediante métodos conocidos por sí mismos, tales como el tratamiento térmico.

El pH del medio de fermentación antes de la inoculación de las bacterias es preferiblemente de 5,5 a 7,

preferiblemente de alrededor de 6,4.

Según una realización preferida de la invención, el medio de fermentación contiene al menos 0,1 mg/l, preferiblemente al menos 0,5 mg/l, y hasta 100 mg/l de manganeso. En general, contendrá de alrededor de 5 a alrededor de 60 mg/l de manganeso. El manganeso se añade en forma de una sal de manganeso de grado alimentario en una cantidad adecuada para obtener las concentraciones finales anteriormente mencionadas de anión manganeso en el medio de fermentación. Los ejemplos de sales de manganeso de grado alimentario que se pueden usar en el método de la invención incluyen cloruro de manganeso, óxido de manganeso, sulfato de manganeso, citrato de manganeso, glicerofosfato de manganeso, gluconato de manganeso, y similares. En el caso de un medio de fermentación láctico, la cantidad de manganeso añadida será de al menos 0,05 mg, preferiblemente de al menos 0,45 mg, para tener en cuenta la cantidad de manganeso presente de manera natural en la leche (que es de alrededor de 0,05 + /- 0,02 mg/l).

La sal de manganeso se puede añadir al medio de fermentación antes de la inoculación de las bacterias, o simultáneamente con dicha inoculación. De manera ventajosa, también se puede añadir al inóculo de *L. casei* durante su preparación, por ejemplo se puede añadir tras la concentración de las bacterias propagadas, y antes de la congelación del concentrado. En este caso la cantidad de manganeso en el inóculo será en general de 0,5 mg/ml a 4,5 mg/ml.

En general, las bacterias del grupo *Lactobacillus casei* se inoculan en el medio en una cantidad de al menos 10^4 UFC/ml, preferiblemente de 5×10^4 a 1×10^{10} UFC/ml, más preferiblemente de 10^6 a 10^8 UFC/ml, e incluso más preferiblemente de alrededor de $2 \cdot 10^7$ UFC/ml.

Las bacterias del ácido láctico que no pertenecen al grupo *Lactobacillus casei* se inoculan en el medio en una cantidad de 10^3 UFC/ml a 10^9 UFC/ml, preferiblemente de 10^5 a 10^8 UFC/ml, más preferiblemente de 10^6 a 10^7 UFC/ml, y todavía más preferiblemente de alrededor de $5 \cdot 10^6$ UFC/ml.

De manera más específica, en el caso del cocultivo de *L. casei* con bacterias del yogur, se inoculan *Streptococcus thermophilus* en el medio en una cantidad de 10^5 UFC/ml a 10^8 UFC/ml, preferiblemente de 10^6 a 10^7 UFC/ml, más preferiblemente de alrededor de $5 \cdot 10^6$ UFC/ml, y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* o *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis* se inoculan en el medio en una cantidad de 10^4 UFC/ml a 10^8 UFC/ml, preferiblemente de 10^5 a 10^7 UFC/ml, más preferiblemente de alrededor de 10^6 UFC/ml.

Tras la inoculación del medio láctico, se lleva a cabo la fermentación en las condiciones habituales adecuadas para el crecimiento de las bacterias inoculadas.

La temperatura de fermentación será en general de 15 °C a 45 °C, preferiblemente de 25 °C a 43 °C, lo más preferiblemente de alrededor de 36 °C.

La fermentación se detiene cuando el medio de fermentación alcanza el pH objetivo deseado y/o cuando la población de *Lactobacillus casei* alcanza el valor objetivo deseado.

En general, el pH objetivo será de 3,7 a 4,9, preferiblemente de 4 a 4,8, lo más preferiblemente de alrededor de 4,6.

El valor objetivo para la población final de *Lactobacillus casei* es en general de al menos 1,1 veces, preferiblemente de al menos 1,3 veces y normalmente hasta 1,5 veces respecto de la población final obtenida cuando se cultivan las mismas bacterias *Lactobacillus casei* en las mismas condiciones sin Mn.

En general, la fermentación se detiene cuando la población de *L. casei* es de al menos 10^7 UFC/ml, preferiblemente de al menos 10^7 a 10^{10} UFC/ml.

La invención también se refiere a un producto lácteo fermentado obtenible mediante el proceso de la invención. Este producto contiene normalmente, además de las bacterias usadas para la fermentación, el medio láctico fermentado que contiene la sal de manganeso añadida. Este producto lácteo fermentado se puede usar como tal, en particular como un producto alimentario o un suplemento nutricional.

También se puede añadir a un producto alimentario, en particular un producto lácteo tal como un yogur, o a una composición nutricional, farmacéutica o cosmética. La composición alimentaria, así como las composiciones nutricionales, farmacéuticas o cosméticas que comprenden dicho producto lácteo fermentado también son parte de la invención.

La presente invención se ilustra además mediante la descripción adicional siguiente, que se refiere a ejemplos no limitantes de la puesta en práctica del proceso de la invención.

EJEMPLO 1: MEJORA SELECTIVA MEDIANTE MANGANESO DEL CRECIMIENTO DE *L. CASEI* SUBESPECIE *PARACASEI* COCULTIVADO CON BACTERIAS DEL YOGUR.

Se preparó un medio de fermentación láctico mezclando leche desnatada en polvo (30 g) con agua destilada (920 g), sacarosa (50 g), con (medio A) o sin (medio B) la adición de sulfato de manganeso monohidrato a una concentración

final de 61,44 mg/l, que correspondió a 20 mg/l de catión manganeso. Después de una rehidratación de 1 h, la mezcla se esterilizó en autoclave durante 15 min a 115 °C.

- 5 El medio A y el medio B se inoculan con *Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* DN-114 121 ($3,80 \times 10^7$ UFC/ml), y un fermento del yogur (DN 542 142) que consistió en: *Streptococcus thermophilus* DN-001 640 (10^6 UFC/ml), *Streptococcus thermophilus* DN-001 336 ($2 \cdot 10^6$ UFC/ml), *Streptococcus thermophilus* DN-001 236 ($7 \cdot 10^5$ UFC/ml) y *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 290 (10^5 UFC/ml).

La fermentación se llevó a cabo a 36 °C, y se monitorizó midiendo la disminución del pH en el medio de cultivo. La fermentación se detuvo transfiriendo la preparación a 4 °C cuando se alcanzó un pH objetivo de 4,6.

- 10 El pH objetivo se alcanzó tras 6,1 horas de fermentación en el caso del medio A, y 6,6 horas de fermentación en el caso del medio B.

La población de *Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* se estudió en J+3 mediante análisis de recuento de células. El análisis de recuento de células se llevó a cabo mediante diluciones en serie del medio fermentado con solución de triptona-sal, y colocación en placas Petri con un medio de agar adecuado: MRS Agar que contenía 1,5 g/l de BactoOXGALL (DIFCO) para *Lactobacillus casei*.

- 15 Las placas Petri se incubaron a 37 °C durante 96 h en condiciones anaerobias (5% de CO₂).

La población de *Lactobacillus casei* en el producto fermentado obtenido a partir del medio A fue de $1,2 \times 10^8$ UFC/ml.

La población de *Lactobacillus casei* en el producto fermentado obtenido a partir del medio B fue de $8,8 \times 10^7$ UFC/ml.

- 20 Las poblaciones de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* no se estudiaron mediante recuentos de células, sino mediante el estudio de la cinética de acidificación. Se sabe bien que *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* crecen más rápido en la leche que *L. casei*, y sus producciones de ácido láctico se correlacionan directamente con su crecimiento. Además, en la presente invención, la monitorización de la acidificación corresponde a la monitorización del crecimiento de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.

- 25 Las experimentaciones se llevaron a cabo de nuevo con *Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* DN-114 121, en el mismo medio de fermentación láctico de antes, con o sin sulfato de manganeso monohidrato a una concentración final de 61,44 mg/L, que correspondió a 20 mg/l de catión manganeso.

Se ensayaron dos fermentos del yogur en combinación con *Lactobacillus casei*: DN 542 142, descrito anteriormente, y DN 543 043, que consistió en una cepa de *Streptococcus thermophilus* (DN-001 171) y una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* (DN-100 182).

- 30 *Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* DN-114 121 se inoculó a $3,8 \cdot 10^7$ UFC/ml.

DN 542 142 se inoculó a 10^6 UFC/ml para *Streptococcus thermophilus* DN-001 640; $2 \cdot 10^6$ UFC/ml para *Streptococcus thermophilus* DN-001 336; $7 \cdot 10^5$ UFC/ml para *Streptococcus thermophilus* DN-001 236, y 10^5 UFC/ml para *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 290.

- 35 DN 543 043 se inoculó a $2 \cdot 10^6$ UFC/ml para *Streptococcus thermophilus* DN-001 171; y $7 \cdot 10^4$ UFC/ml para *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182.

La fermentación se llevó a cabo a 36 °C, y se monitorizó midiendo la disminución del pH en el medio de cultivo. La fermentación se detuvo transfiriendo la preparación a 4 °C cuando se alcanzó un pH objetivo de alrededor de 4,6 (en el caso del cocultivo con el fermento del yogur DN 542 142), o de alrededor de 4,45 (en el caso del cocultivo con el fermento del yogur DN 543 043).

- 40 La población de *Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* se estudió tras 1 día (J+1) y 3 días (J+3) de incubación a 10 °C.

Los resultados se ilustran mediante las Figuras 1 y 2 y las Tablas I y II siguientes.

Tabla I

Ensayos	Final del cultivo		
	pH (36 °C)	Tiempo (horas)	pH J+1 (10 °C)
543 043 + 114 121 - Mn 20 mg/L	4,65	08h12	4,70
543 043 + 114 121	4,61	08h22	4,67
542 142 + 114 121 - Mn 20 mg/L	4,43	06h58	4,44
542 142 + 114 121	4,47	07h08	4,46

Tabla II

Ensayos	Recuento ufc/ml a +10 °C		proporción recuento Mn/recuento J+1	proporción recuento Mn/recuento J+3
	J+1	Recuento. J+3		
543 043 + 114 121 - Mn 20 mg/L	2,70E+08	3,00E+08	1,9	2,1
543 043 + 114 121	1,46E+08	1,41E+08		
542 142 + 114 121 - Mn 20 mg/L	1,15E+08	1,61E+08	1,9	1,7
542 142 + 114 121	6,15E+07	9,60E+07		

- 5 Estos resultados demuestran que la adición de 20 mg/l de manganeso no tiene efecto sobre la cinética de acidificación de los cocultivos. El tiempo para alcanzar el pH objetivo es el mismo con o sin manganeso. Por otra parte, la adición de 20 mg/l de manganeso incrementa selectivamente la población de *Lactobacillus casei*.

10 En ciertos casos, la población de *L. casei* fue mayor en J+3 que en J+1. Esto se puede explicar por el hecho de que el enfriamiento del cultivo a 4 °C para detener la fermentación induce cierto estrés, lo que da como resultado una capacidad reducida de crecimiento cuando se coloca en placas Petri. Tras unos cuantos días, las bacterias se recuperan del estrés y recuperan su capacidad de reiniciar el crecimiento.

EJEMPLO 2: EFECTO DEL MANGANESO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *L. CASEI* SUBESPECIE *PARACASEI* O *L. CASEI* SUBESPECIE *RHAMNOSUS* COCULTIVADOS CON DIFERENTES FERMENTOS DEL YOGUR.

15 Se llevaron a cabo las mismas experimentaciones que en el Ejemplo 1 con cocultivos de *Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* DN-114 121 o *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* DN-116 010 con el fermento del yogur DN 543 043 descrito anteriormente, o el fermento del yogur DN 522 044, que consistió en una cepa de *Streptococcus thermophilus* (DN-001 143), *Streptococcus thermophilus* (DN-001 257) y una cepa de *Lactobacillus lactis* (DN-111 224).

20 Las experimentaciones se llevaron a cabo en el mismo medio de fermentación láctico del Ejemplo 1, con o sin sulfato de manganeso monohidrato a concentraciones finales de 1,54 mg/L, 61,44 mg/L, 184,33 mg/L, que correspondieron a 0,5 mg/l, 20 mg/l, y 60 mg/l del catión manganeso.

Lactobacillus casei subespecie *paracasei* DN-114 121 se inoculó a $3,8 \cdot 10^7$ UFC/ml.

Lactobacillus casei subespecie *rhamnosus* DN-116 010 se inoculó a $5,8 \cdot 10^7$ UFC/ml.

25 DN 543 043 se inoculó a $2 \cdot 10^6$ UFC/ml para *Streptococcus thermophilus* DN-001 171; y $7 \cdot 10^4$ UFC/ml para *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182.

DN 522 044 se inoculó a $2 \cdot 10^6$ UFC/ml para *Streptococcus thermophilus* DN-001 143; 10^6 UFC/ml para *Streptococcus thermophilus* DN-001 257, $4 \cdot 10^6$ UFC/ml para *Streptococcus thermophilus* DN-001 623 y $2,5 \cdot 10^5$ UFC/ml para *Lactobacillus lactis* DN-111 224.

30 La fermentación se llevó a cabo a 36 °C, y se monitorizó midiendo la disminución del pH en el medio de cultivo. La fermentación se detuvo transfiriendo la preparación a 4 °C cuando se alcanzó un pH objetivo de alrededor de 4,6.

La población de *Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* se estudió tras 1 día (J+1) de incubación a 10 °C.

Los resultados se ilustran en las Figuras 3, 4 y 5 y las Tablas III y IV siguientes.

Tabla III

Ensayos	Final del cultivo	
	pH	Tiempo (horas)
1 - 543 043 + 114 121 0 mg/L Mn	4,60	09h17
2 - 543 043 + 114 121 60 mg/L Mn	4,59	09h14
3 - 543 043 + 114 121 20 mg/L Mn	4,58	09h02
4 - 543 043 + 114 121 0,5 mg/L Mn	4,60	09h18
5 - 543 043 + 116 010 0 mg/L Mn	4,59	09h50
6 - 543 043 + 116 010 20 mg/L Mn	4,60	09h06
7 - 543 043 + 116 010 60 mg/L Mn	4,60	09h04
8 - 522 044 + 114 121 0 mg/L Mn	4,60	09h22
9 - 522 044 + 114 121 20 mg/L Mn	4,60	09h20

Tabla IV

Ensayos	Recuento ufc/ml a +10 °C	paracasei o rhamnosus
	Recuento J+1 paracasei o rhamnosus	recuento. num. Mn/recuento. J+1
1 - 543 043 + 114 121 0 mg/L Mn	1,35E+08	/
2 - 543 043 + 114 121 60 mg/L Mn	3,25E+08	2,4
3 - 543 043 + 114 121 20 mg/L Mn	3,13E+08	2,3
4 - 543 043 + 114 121 0,5 mg/L Mn	2,99E+08	2,2
5 - 543 043 + 116 010 0 mg/L Mn	2,52E+08	/
6 - 543 043 + 116 010 20 mg/L Mn	3,20E+08	1,3
7 - 543 043 + 116 010 60 mg/L Mn	3,30E+08	1,3
8 - 522 044 + 114 121 0 mg/L Mn	1,42E+08	/
9 - 522 044 + 114 121 20 mg/L Mn	3,25E+08	2,3

- 5 Estos resultados confirman que la adición de manganeso no tiene efecto sobre la cinética de acidificación de los cocultivos. El tiempo para alcanzar el pH objetivo es el mismo con o sin manganeso. Por otra parte, incrementa selectivamente la población de las bacterias del grupo *L. casei* (*Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* o *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus*).

REIVINDICACIONES

1. El uso de manganeso para mejorar selectivamente el crecimiento de las bacterias del grupo *Lactobacillus casei* en un cultivo mixto que contiene bacterias del ácido láctico que no pertenecen al grupo *Lactobacillus casei*.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1, en el que las bacterias del grupo *Lactobacillus casei* se seleccionan de la especie *L. casei* subespecie *casei*, *L. casei* subespecie *paracasei*, *L. casei* subespecie *rhannosus*.
3. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las bacterias lácticas que no pertenecen al grupo *Lactobacillus casei* se seleccionan de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis* y *Streptococcus thermophilus*.
- 10 4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las bacterias se cultivan en un medio de fermentación láctico.
5. Un método para mejorar selectivamente el crecimiento de las bacterias del grupo *Lactobacillus casei* en un cultivo mixto que contiene bacterias del ácido láctico que no pertenecen al grupo *Lactobacillus casei*, en el que dicho método comprende:
 - a) proporcionar un medio de fermentación que contiene manganeso;
 - 15 b) inocular dicho medio de fermentación con las bacterias;
 - c) fermentar el medio inoculado hasta que alcanza un pH objetivo deseado;
 - d) detener la fermentación y recuperar el producto fermentado.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el medio de fermentación contiene al menos 0,1 mg/l de manganeso.
- 20 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que el medio de fermentación es un medio de fermentación láctico, al que se añade al menos 0,05 mg/l de manganeso.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que las bacterias del grupo *Lactobacillus casei* se seleccionan de la especie *L. casei* subespecie *casei*, *L. casei* subespecie *paracasei*, *L. casei* subespecie *rhannosus*.
- 25 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que las bacterias del ácido láctico que no pertenecen al grupo *Lactobacillus casei* se seleccionan de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis* y *Streptococcus thermophilus*.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que las bacterias del grupo *Lactobacillus casei* se inoculan en el medio en una cantidad de al menos 10^4 UFC/ml, y las bacterias del ácido láctico que no pertenecen al grupo *Lactobacillus casei* se inoculan en el medio en una cantidad de 10^3 UFC/ml a 10^9 UFC/ml.
- 30 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que la fermentación se lleva a cabo a una temperatura de 15 °C a 45 °C.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en el que la fermentación se detiene cuando se alcanza un pH objetivo de 3,7 a 4,9.
- 35 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en el que la población final de bacterias del grupo *Lactobacillus casei* en el producto fermentado es de al menos 1,1 veces, preferiblemente de al menos 1,3 veces, la población final obtenida cuando se cultivan las mismas bacterias *Lactobacillus casei* en las mismas condiciones sin Mn.

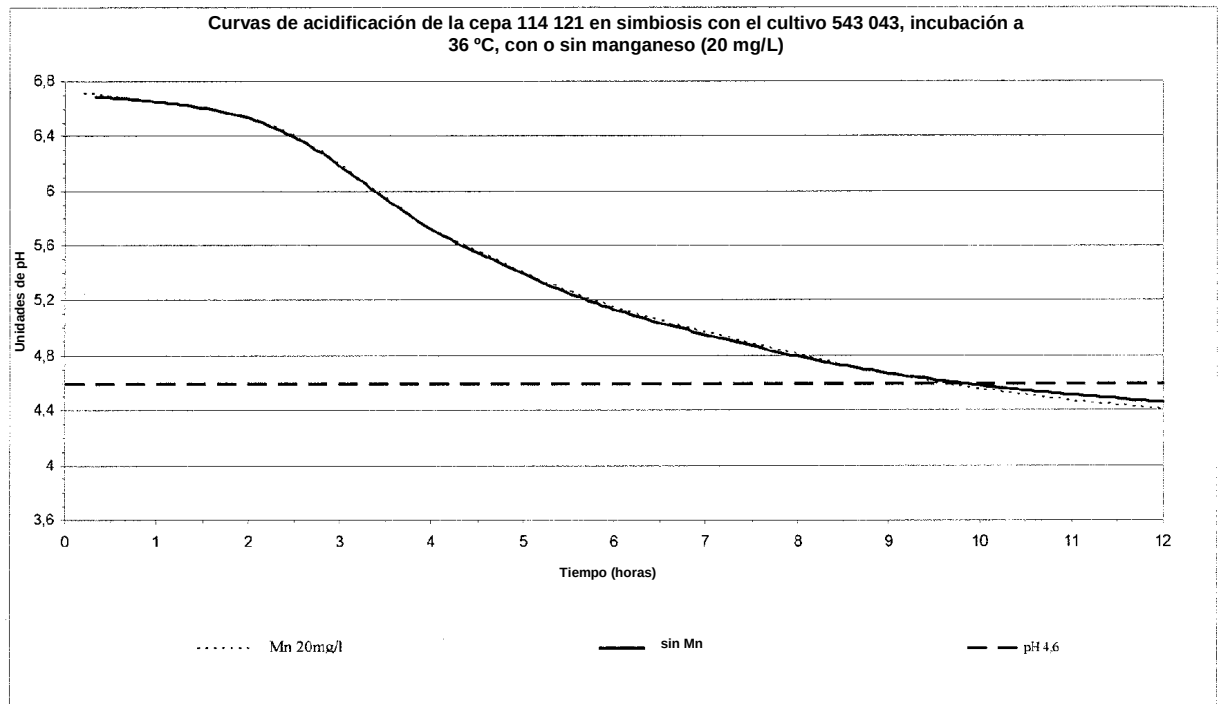


Figura 1

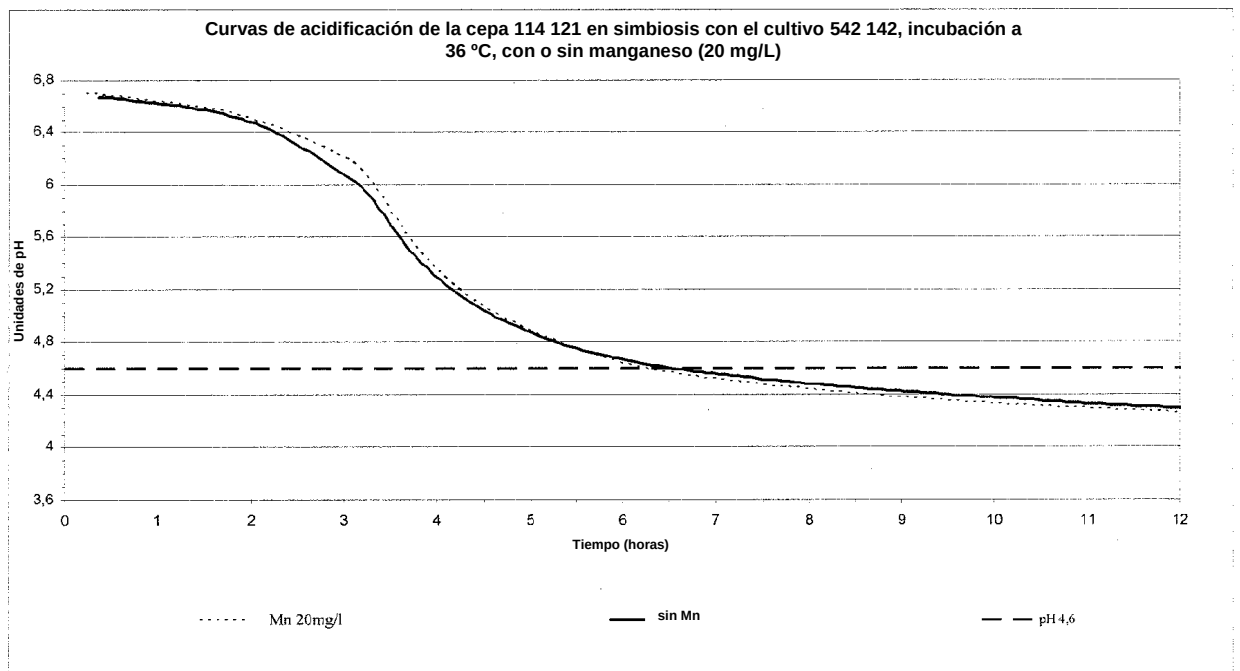


Figura 2

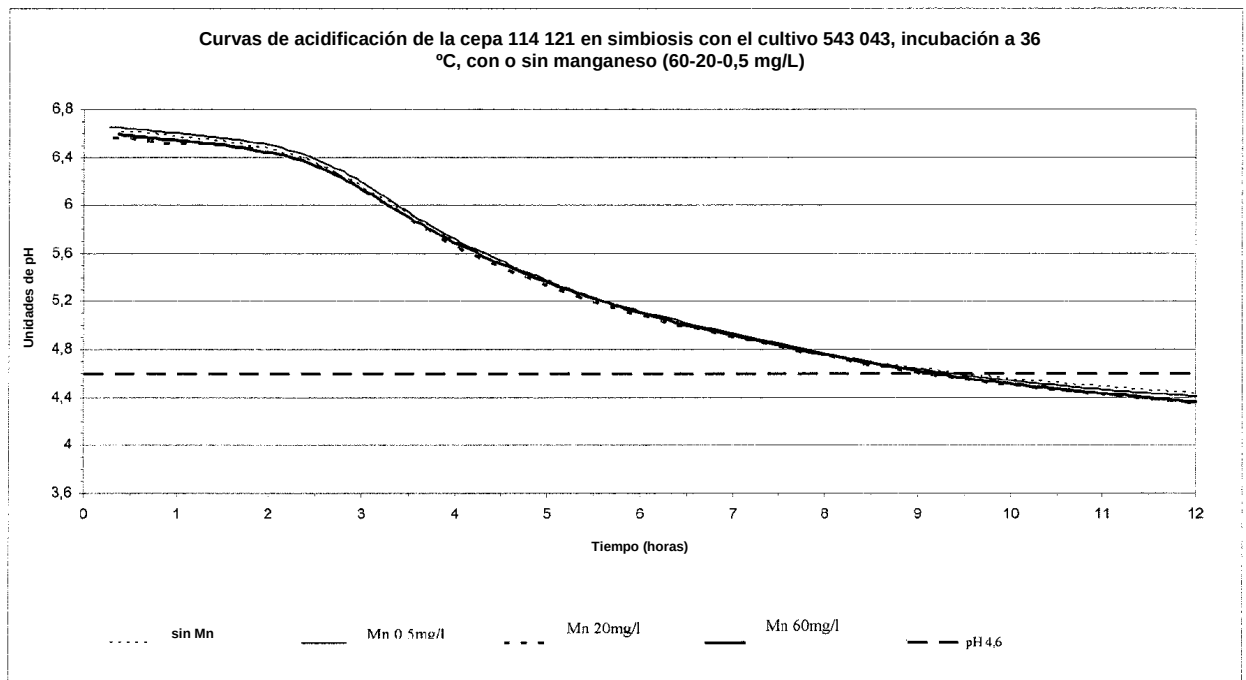


Figura 3

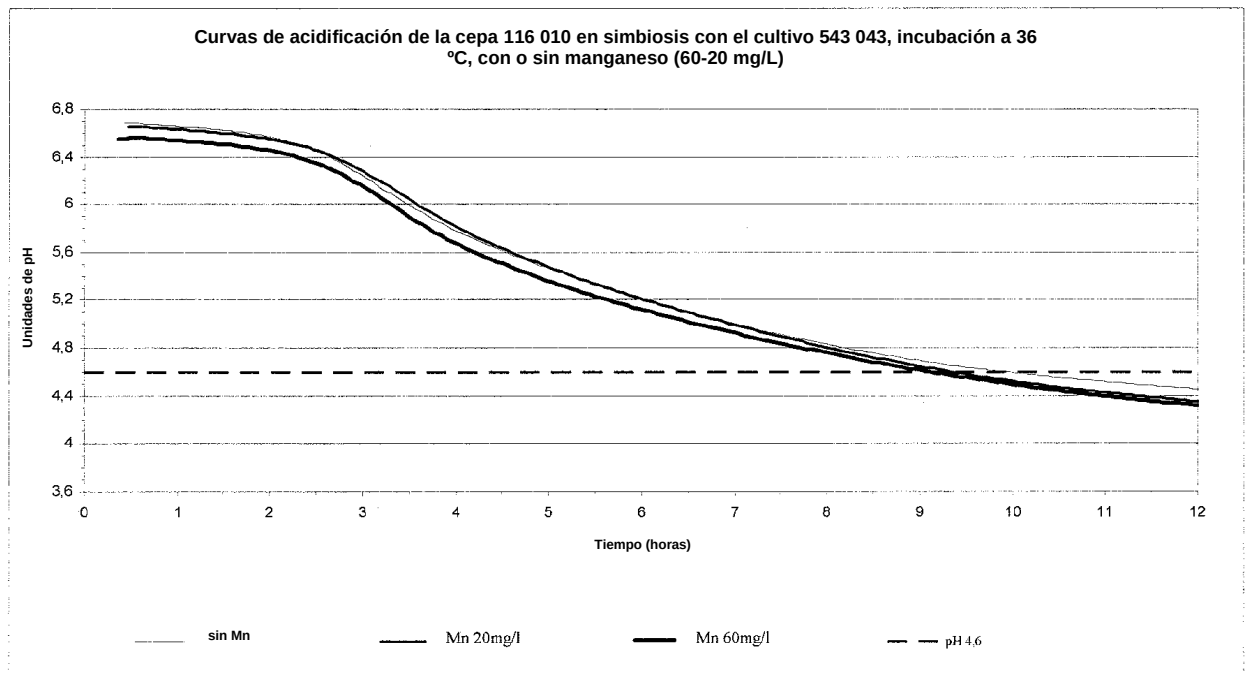


Figura 4

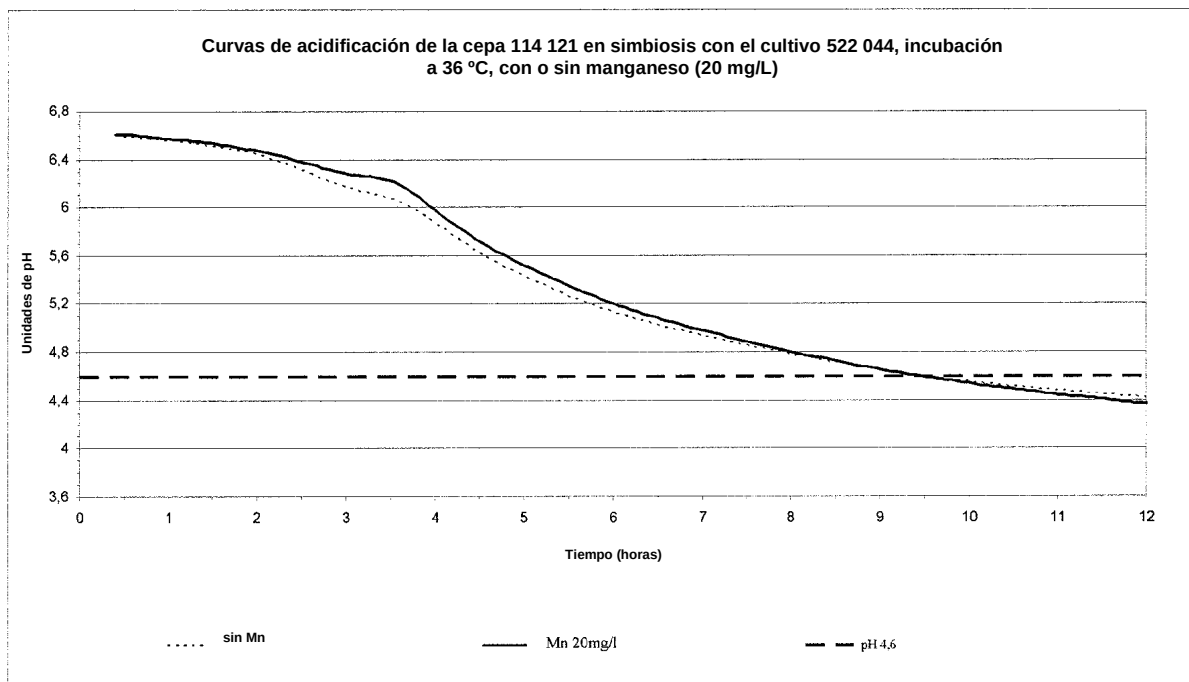


Figura 5