



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 748**

51 Int. Cl.:  
**A23C 9/123** (2006.01)  
**A23L 1/03** (2006.01)  
**A23L 1/00** (2006.01)  
**A23C 11/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04816442 .0**  
96 Fecha de presentación : **20.12.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1711065**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Producto alimenticio líquido que comprende gránulos de bacterias lácticas.**

30 Prioridad: **23.12.2003 FR 03 15243**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.06.2011**

73 Titular/es: **Compagnie Gervais Danone**  
**17, boulevard Haussmann**  
**75009 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Teissier, Philippe**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 361 748 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

5 Producto alimenticio líquido que comprende gránulos de bacterias lácticas

La presente invención se relaciona con un producto alimenticio líquido y acuoso que comprende partículas de bacterias lácticas deshidratadas y recubiertas de materia grasa vegetal.

10 Los probióticos son microorganismos vivos que mejoran el equilibrio microbiano intestinal. Actualmente, pueden utilizarse diferentes microorganismos tales como, por ejemplo, levaduras, bacterias y en particular pueden utilizarse bifidobacterias, lactobacilos, leuconostococos, pediococos y lactococos como probióticos, en particular en el campo agroalimentario. En la alimentación humana, estos microorganismos o probióticos se incorporan principalmente en productos lácteos fermentados tales como los yogures.

15 Los microorganismos que son incorporados en los productos alimenticios sufren un cierto número de agresiones en el transcurso de su fabricación, su almacenamiento y su utilización, lo que conduce a una disminución de su eficacia que está asociada muy a menudo con una tasa de mortalidad importante.

20 De esta forma, los productos alimenticios disponibles en el mercado parecen no estar en capacidad de aportar a sus consumidores una cantidad suficiente de probióticos para permitir la obtención de un efecto saludable consecuente, en razón particularmente de su baja resistencia al almacenamiento o a las diferentes tensiones durante su empleo en productos o durante su consumo (estrés gástrico, estrés intestinal).

25 Ya se han propuesto diversas soluciones que apuntan a proteger estos microorganismos para asegurar a la vez su conservación en el producto final y su eficacia durante la ingestión del producto para el consumidor, entre ellas su mezcla o su encapsulación con materias grasas.

30 De esta forma, la solicitud de patente europea EP 1 010 372 describe un alimento cocido que comprende a la vez un probiótico y un prebiótico, es decir un ingrediente no vivo no digerible que aumenta la actividad de ciertas bacterias entre ellas las bacterias probióticas en el colon. Este alimento se compone de una parte grasa no cocida desprovista de agua y que contiene bacterias vivas liofilizadas y de una partícula cocida constituida por prebióticos del tipo perteneciente a las fibras no digeribles. La parte grasa que recubre las bacterias liofilizadas está constituida de aceite de palma, de aceite de nuez de coco, de mantecas vegetales del tipo cacao o cacahuete, de margarinas, de aceites vegetales hidrogenados o parcialmente hidrogenados. Por lo tanto, el alimento así obtenido es de tipo bizcocho y puede conservarse al menos por seis meses a temperatura ambiente.

35 La solicitud internacional WO 99/09839 describe una composición del tipo pasta que comprende una materia grasa anhidra o un sustituto de materia grasa y un probiótico con una concentración que va de  $1 \cdot 10^7$  a  $5 \cdot 10^{11}$  UFC (Unidades Formadoras de Colonias)/g de probiótico. La composición presenta una actividad en agua (aw) inferior a 0,7 y puede ser utilizada para la fabricación de productos alimenticios secos de tipo bizcocho. Esta composición permite conservar durante varios meses a temperatura ambiente, un número importante y constante de probióticos así como sus propiedades en el producto final.

45 Por otro lado, la solicitud internacional WO 01/68808 describe partículas de microorganismos vivos deshidratados y recubiertos por una capa homogénea de una sustancia hidrófoba escogida entre materias grasas así como su procedimiento de fabricación (granulación) y su aplicación en la fabricación de productos farmacéuticos, dietéticos o alimenticios. La granulación de las bacterias vivas permite aumentar su resistencia frente al estrés físico-químico que sufren en el transcurso de su granulación y posteriormente de su ingestión. Se describe brevemente la utilización de estas partículas en el campo agroalimentario y los productos alimenticios que se citan en los ejemplos son cereales, productos de confitería o leche en polvo.

50 Finalmente, la solicitud internacional WO 96/08261 describe una composición probiótica que comprende uno o varios microorganismos probióticos que pueden ser utilizados bajo forma liofilizada y un soporte que comprende almidón resistente modificado o no modificado o sus mezclas, empleándose el dicho soporte como transportador y

como medio de mantenimiento y de crecimiento de los dichos microorganismos en el intestino grueso y en otras zonas del tracto gastrointestinal. Los microorganismos liofilizados son mezclados con una materia grasa de bajo punto de fusión calentada previamente y luego se agrega el almidón resistente a la dispersión obtenida. Tal composición probiótica puede ser ingerida directamente o incorporada en alimentos y bebidas, en particular, yogures, zumos, etc.

Además de escoger la o las sustancias que pueden ser utilizadas a título de materiales protectores, los procedimientos de recubrimiento deben igualmente superar un cierto número de dificultades entre ellas particularmente el imperativo de conciliar procedimientos de fabricación agresivos con la utilización de entidades biológicas frágiles.

Además, los microorganismos una vez recubiertos deben ser resistentes a las condiciones de almacenamiento, de utilización o de empleo en los productos finales, que se prolongan más tarde en el huésped a nivel del colon. Por ejemplo, los probióticos que poseen una actividad intestinal deben estar protegidos por cierto a todo lo largo de su almacenamiento pero igualmente durante su tránsito gastrointestinal (resistencia a la acidez gástrica por ejemplo) con el fin de optimizar su capacidad durante su utilización. Además, durante su aplicación en el producto y a todo lo largo de su almacenamiento, debe preservarse la integridad de los gránulos con el fin de asegurar el mantenimiento del nivel de supervivencia de las bacterias en los gránulos.

Así, los diferentes procedimientos de protección y particularmente de encapsulación descritos en el documento de la técnica anterior, citados anteriormente, se adaptan particularmente bien a la incorporación de probióticos en productos alimenticios secos o que presentan una muy baja actividad de agua.

Por otro lado, la patente estadounidense US 6,447,823 describe un yogur líquido que contiene bacterias lácticas encapsuladas con la ayuda de una mezcla de aceite endurecido y de almidón, y que comprende eventualmente una segunda capa constituida de gelatina y pectina. Siendo así relativamente importante el tamaño de cápsulas obtenido (1 a 3 mm), la fabricación de este tipo de yogur necesita el empleo de un procedimiento específico para añadir cápsulas en el producto. En efecto, es necesario colocar las cápsulas en el fondo de la botella de acondicionamiento previamente al relleno progresivo del dicho frasco con el yogur líquido que debe tener una densidad muy próxima a la de las cápsulas, de manera que estas últimas se repartan uniformemente en el producto. La producción de un tal producto impone por lo tanto una tensión importante de fabricación debido al tamaño de las partículas lo que hace imposible la realización de una mezcla dinámica de las cápsulas.

Así, parece difícil la dispersión de gránulos de tamaño demasiado grande y éstos demuestran ser inestables en un ambiente acuoso, teniendo en cuenta su carácter lipofílico. Así, los productos alimenticios muy acuosos no constituyen un medio ideal para asegurar la estabilidad de granos lipofílicos que contienen fermentos.

Por otro lado, cuando se desea incorporar partículas de bacterias recubiertas de materias grasas vegetales en un producto alimenticio muy líquido, es imperativo que el tamaño de los gránulos no sea demasiado importante con el fin de que no resulten perceptibles en la boca (sensación de granos de arena bajo el paladar) para poder suministrar un producto aceptable desde el punto de vista organoléptico. Finalmente, teniendo en cuenta la baja cantidad de bacterias contenidas en cada cápsula, la cantidad de cápsulas que se van a dispersar en el líquido para fabricar un producto alimenticio con efecto probiótico sería demasiado grande y conduciría a la obtención de un producto inaceptable desde el punto de vista organoléptico.

Es por ello que, con el fin de remediar el conjunto de estos problemas mayores, los inventores han puesto a punto lo que constituye el objeto de la invención.

Se han dedicado particularmente al objetivo de proveer un producto alimenticio líquido y muy acuoso y que contenga bacterias lácticas recubiertas con la ayuda de al menos una materia grasa vegetal, en la cual la supervivencia de estos probióticos se aumenta significativamente en el producto final en comparación con los productos actualmente disponibles en el mercado.

La presente invención tiene por lo tanto como objeto un producto alimenticio líquido que contiene partículas de bacterias lácticas deshidratadas recubiertas con al menos una materia grasa vegetal sólida a temperatura ambiente,

caracterizada por el hecho de que las dichas bacterias recubiertas se presentan bajo la fórmula de gránulos de tamaño mediano comprendido entre 95 y 300  $\mu\text{m}$  que contienen bacterias lácticas en una cantidad superior o igual a  $1.10^{10}$  UFC por gramo de gránulos, que los dichos gránulos están exentos de almidón, y que el dicho producto alimenticio presenta un pH inferior o igual a 4,5 y un contenido ponderado en agua de al menos 83%.

5 En efecto, los inventores han puesto en evidencia que a pesar de la importante acidez del producto alimenticio conforme a la invención, el recubrimiento de las bacterias probióticas presenta la ventaja de mantener un nivel elevado de supervivencia de los microorganismos incorporados en los productos y durante su consumo en el huésped protegiéndolos a la vez de la humedad y del oxígeno en el producto y aumentando su resistencia a los  
10 jugos gástricos e intestinales en el huésped, asegurando su permanencia posterior a nivel del colon. Además, no es necesario incorporar almidón como soporte nutricional para las bacterias probióticas o como soporte adicional que permita mejorar la dispersión de la materia grasa, contrariamente a lo que se describe en la técnica anterior, particularmente en la solicitud internacional WO 96/08261.

15 Finalmente, en comparación con el producto alimenticio descrito en la patente estadounidense No. 6,447,823, no es obligatoriamente necesario adaptar la textura del producto alimenticio en función de los gránulos de probióticos que se van a incorporar y es posible realizar una mezcla dinámica de los gránulos con el producto, pues el tamaño de los gránulos permite una fácil dispersión de éstos en el líquido con el fin de acondicionar directamente el producto final.

20 Por otro lado, los inventores han advertido que la aplicación de gránulos cuyo tamaño sea superior a 300  $\mu\text{m}$  implicaría problemas de dispersión en el producto alimenticio, pero también de percepción de los gránulos durante el consumo del producto final, lo que sería inaceptable desde un punto de vista organoléptico. Por otra parte, la utilización de partículas que contienen un número importante de bacterias lácticas deshidratadas que tienen un diámetro inferior a 95  $\mu\text{m}$  sería difícilmente realizable desde un punto de vista técnico.

25 Según una forma de realización ventajosa de la presente invención, el tamaño medio de los gránulos de partículas de bacterias lácticas es inferior a 200  $\mu\text{m}$  aproximadamente, y de manera más ventajosa incluso, este tamaño está comprendido entre 150 y 200  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

30 Entre los productos alimenticios líquidos conforme a la presente invención, se puede citar particularmente la leche fermentada, bebidas tales como los zumos de frutas, mezclas de leche y de zumos de frutas tales como por ejemplo los productos vendidos bajo la marca Danao® y los zumos vegetales tales como por ejemplo el zumo de soja y los zumos de avena.

35 Las bacterias lácticas utilizadas en el producto alimenticio según la presente invención se escogen preferiblemente entre lactobacilos y bifidobacterias, dentro de las cuales se prefieren en particular *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium breve*.

40 Según un modo de realización ventajoso de la presente invención, las bacterias lácticas preferidas se escogen entre las siguientes cepas: *Lactobacillus plantarum*, depositada el 16 de marzo de 1995 bajo el número DSM 9843 en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania; *Lactobacillus casei*, depositada el 28 de septiembre de 1994 bajo el número 1-1518, *Bifidobacterium animalis*, depositada el 20 de mayo de 2000 bajo el número 1-2494, y *Bifidobacterium breve*, depositada el 31 de mayo de 1995 bajo el número 1-2219,  
45 habiendo sido depositadas estas tres últimas cepas en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos) dirigida por el instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, en París.

Tal como se ha expuesto anteriormente, una de las características del producto conforme a la invención es que las bacterias lácticas utilizadas son deshidratadas previamente a su granulación. Las técnicas de deshidratación que pueden ser utilizadas para este efecto para poner en práctica la invención son totalmente convencionales y bien  
50 conocidas en la técnica anterior. Entre tales técnicas, se puede citar particularmente la deshidratación sobre lecho de aire fluidizado (LAF) y la liofilización.

Según un modo de realización particularmente preferido de la invención, las bacterias lácticas son deshidratadas por liofilización previamente a su granulación. En este caso, las bacterias se tratan preferiblemente con la ayuda de un  
55 agente lipoprotector, previamente a su liofilización. En este caso, tales agentes lipoprotectores se escogen

particularmente entre la maltodextrina, la sacarosa, el ascorbato de sodio y el polvo de leche.

Según una forma de realización particularmente preferida de la invención, las bacterias son deshidratadas directamente después de su crecimiento en un medio de cultivo apropiado.

5 El tamaño medio de las partículas de bacterias deshidratadas (antes de su granulación) está comprendido preferiblemente entre 80 y 150  $\mu\text{m}$  aproximadamente. En este aspecto, el tamaño de las partículas de bacterias deshidratadas puede ajustarse eventualmente, por ejemplo por trituración según técnicas convencionales bien conocidas del experto en el arte.

10 Las partículas de bacterias deshidratadas pueden utilizarse dentro del marco de la invención, presentando por otra parte, preferiblemente, una actividad en agua inferior a 0,25 e incluso comprendida preferiblemente entre 0,03 y 0,2.

15 El procedimiento de granulación utilizado para el recubrimiento de las partículas de bacterias lácticas deshidratadas con materia grasa vegetal debe a la vez permitir la preparación de gránulos protectores eficaces de las bacterias que se van a recubrir sin que se implique una degradación de las dichas bacterias durante la fabricación de los gránulos .

20 Estos dos objetivos se alcanzan en particular mediante el empleo del procedimiento de producción tal como se describe en la solicitud internacional WO 01/68808. En efecto, los inventores han descubierto, de manera sorprendente, que este procedimiento de granulación puede ser utilizado para la fabricación de gránulos de bacterias lácticas deshidratadas, gránulos que pueden utilizarse a continuación con el fin de preparar el producto alimenticio conforme a la presente invención.

25 Entre los materiales grasos vegetales que pueden ser utilizados para envolver las partículas de bacterias deshidratadas según la presente invención, se pueden citar particularmente los cuerpos hidrogenados o no hidrogenados, fraccionados o no fraccionados, esterificados o no esterificados tales como el aceite de palma esteárico de temperatura de fusión (TF) igual a 35°C, aceites de palma de TF 45°C y 58°C, manteca de cacao, manteca de cacahuete, aceite de palmiste, copra hidrogenada de TF igual a 32°C, ceras alimenticias que son mezclas complejas de ésteres de ácidos grasos y de alcoholes grasos con cadenas largas tales como la cera de carnauba (TF igual a 80-85°C), la cera microcristalina de origen petrolífero, ácidos grasos tales como los ácidos esteárico y palmítico y sus mezclas.

30

Según una forma de realización preferida de la presente invención, y entre los materiales grasos vegetales listados más arriba, se prefieren en particular aquéllos que poseen un punto de fusión superior a 40°C aproximadamente.

35 Por otro lado, cuando las dichas materias grasas vegetales se utilizan en mezclas, entonces la dicha mezcla comprende preferiblemente más de 50% en peso de ácidos grasos saturados con respecto al peso total de las materias grasas que entran en la composición de la dicha mezcla.

40 La concentración en bacterias lácticas deshidratadas en el interior de los gránulos es preferiblemente superior o igual a  $1 \cdot 10^{10}$  UFC por gramo de gránulos, y un máximo de  $5 \cdot 10^{11}$  UFC por gramo de gránulos.

La actividad en agua de los gránulos de partículas de bacterias lácticas deshidratadas utilizadas en el marco de la presente invención es preferiblemente inferior a 0,4 e incluso más preferiblemente está comprendido entre 0,1 y 0,2.

45 Según una forma de realización preferida de la invención, la o las materias grasas representan de 40 a 75% en peso aproximadamente e incluso más, preferiblemente 60% en peso aproximadamente, con respecto al peso total de los gránulos. Por consiguiente, y a título de ejemplo se puede particularmente considerar que un gránulo puede estar constituido de 60% en peso aproximadamente de materias grasas vegetales y de 40% en peso aproximadamente de partículas de bacterias lácticas deshidratadas.

50

En el interior del producto alimenticio líquido conforme a la presente invención, la concentración en bacterias lácticas recubiertas está preferiblemente comprendida entre  $5 \cdot 10^6$  y  $5 \cdot 10^9$  UFC por gramo de producto final, e incluso más preferiblemente esta concentración es superior o igual a  $1 \cdot 10^7$  UFC por gramo de producto final.

55

Según un modo de realización particularmente preferido de la presente invención, el producto alimenticio líquido contiene al menos 90% de agua. Entre tales productos, y con la diferencia de los productos que se califican como yogur puesto que contienen menos de 90% de agua, se pueden citar particularmente los productos fermentados semitexturizados y las bebidas.

5

La cantidad de gránulos de partículas de bacterias lácticas deshidratadas dentro del producto alimenticio líquido conforme a la invención es preferiblemente inferior a 2% en peso aproximadamente con respecto al peso total del producto alimenticio final, e incluso más preferiblemente está comprendida entre 0,01 y 1% en peso aproximadamente.

10

El consumo de un producto alimenticio líquido conforme a la presente invención permite obtener un efecto probiótico en la medida en que la cantidad de bacterias lácticas ingeridas y que se encuentran finalmente presentes en el huésped es al menos igual a  $3 \cdot 10^6$  UFC por gramo de producto alimenticio ingerido.

15

Además de las disposiciones que preceden, la invención comprende incluso otras disposiciones que surgirán de la descripción que sigue, que se refiere a dos ejemplos de preparación de un producto alimenticio lácteo fermentado, con un ejemplo de preparación de un producto alimenticio del tipo zumo de frutas, con un ejemplo de preparación de un producto alimenticio del tipo zumo vegetal, y con un estudio comparativo del efecto del pH sobre la evolución de una leche estándar que presenta un pH superior a 4,5 y de una leche fermentada que presenta un pH inferior a 4,5 que contiene los dos gránulos de bacterias lácticas, así como la Figura 1 anexa en la cual se puede observar la evolución de la cantidad de bacterias *L. casei* en función del tiempo en dos leches que presentan pH diferentes (medio 1: leche fermentada de pH inferior a 4,5 y medio 2: leche estándar de pH superior a 4,5).

20

(medio 1: leche fermentada de pH inferior a 4,5 y medio 2: leche estándar de pH superior a 4,5).

25

### **Ejemplo 1: Preparación de un producto lácteo fermentado conforme a la invención**

#### **1) Preparación de partículas de bacterias lácticas deshidratadas**

La cepa de *L. casei* 1-1518 se cultivó durante 15 horas a una temperatura de 37°C en un medio de cultivo de tipo Man Rogosa Sharpe (MRS) previamente a su liofilización durante 66 horas. Las características del liofilizado son las siguientes:

- 30
- Humedad: 2% (medida con la ayuda de un desecador de tipo Sartorius® comercializado por la sociedad Sartorius);
  - Aw: 0,1 medida con Novasina® comercializada por la sociedad Novasina;
  - Granulometría: 80 micrones
  - Población:  $1,7 \cdot 10^{11}$  UFC/g de partículas liofilizadas.

35

#### **2) Preparación de los gránulos de bacterias lácticas deshidratadas**

Las partículas de bacterias lácticas liofilizadas así obtenidas más arriba en la etapa 1 se recubren a continuación en lecho fluidizado con una mezcla 50/50 de ácido esteárico y palmítico (% p/p) según el procedimiento descrito en el ejemplo 2 de la solicitud internacional WO 01/68808.

40

La tasa de recubrimiento (% de materia grasa con respecto al peso total de los gránulos) fue de 60%.

Las características finales de los gránulos así producidos fueron las siguientes:

- 45
- Humedad: 2%
  - Granulometría: 200 micrones
  - Población:  $1 \cdot 10^{11}$  UFC/g de gránulos

La población de bacterias lácticas en el interior de los gránulos fue estable durante al menos 3 meses a temperatura ambiente al abrigo de la luz y de la humedad.

#### **3) Preparación de producto lácteo fermentado**

Los gránulos obtenidos arriba indicados en la etapa 2) se introdujeron en leche previamente fermentada por una mezcla de *Lactobacillus bulgaricus* (5% en número) y de *Streptococcus thermophilus* (95% en número), a razón de 0,1% en peso de gránulos por gramo de leche. El producto lácteo fermentado así obtenido se reparte a continuación en recipientes de 200 ml.

5 El producto lácteo fermentado tiene un contenido en proteínas de 2,5% en peso lo que permite dejar el líquido a pH 4,2. La población en *L. bulgaricus* y en *S. thermophilus* es de aproximadamente  $1.10^9$  UFC/ml de producto. La concentración en *L. casei* bajo la forma recubierta era de  $10^8$  CFU/g de producto lácteo fermentado.

10 La cantidad de bacterias *L. casei* por ml de producto lácteo en función del tiempo se determinó según un método de numeración sobre medio de cultivo Oxgall adaptado. Este estudio muestra que la etapa de granulación de las partículas de bacterias lácticas no tuvo consecuencias negativas en la supervivencia de las bacterias lácticas en el producto final y esto durante al menos 35 días.

15 De la misma forma, las cantidades de *L. bulgaricus* y de *S. thermophilus* presentes en el producto lácteo fermentado en función del tiempo se han determinado igualmente de manera paralela. Los resultados obtenidos (no representados) demuestran que la presencia de bacterias *L. casei* recubiertas, bajo la forma de gránulos de materia grasa en el producto final, no tiene impacto negativo en las otras poblaciones de fermentos presentes bajo la forma no recubierta en este producto.

20 Los resultados de las pruebas organolépticas realizadas con un panel de 10 degustadores muestran por otra parte que este producto se juzga como muy próximo (astringencia, gusto azucarado, percepción de las partículas, textura, mal gusto y acidez) a un producto lácteo fermentado comparativo que no hace parte de la invención y que contiene la misma cantidad de bacterias de *L. bulgaricus* y de *S. thermophilus* así como la misma cantidad de *L. casei* bajo la forma no recubierta. Por otra parte, es importante anotar que el producto lácteo fermentado conforme a la invención no ha desarrollado ningún mal gusto hasta el fin de la DLC (fecha límite de consumo) del producto lo que prueba que las materias grasas utilizadas para la preparación de los gránulos no han sufrido ninguna oxidación (sin enranciamiento).

### 30 **Ejemplo 2: Preparación de un producto alimenticio conforme a la invención: leche fermentada**

Se introdujeron gránulos al 1% en peso de *L. casei* fabricados según el ejemplo 1 descrito anteriormente, en leche fabricada previamente fermentada durante 10 horas a 37°C mediante las cepas *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* y *L. casei* (bajo forma no recubierta).

35 La leche fermentada se repartió a continuación en recipientes de 200 ml.

La población en *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* y *L. casei* (bajo forma no recubierta) es superior a  $1.10^7$  UFC/ml de producto.

40 La cantidad medida de *L. casei* bajo la forma de gránulos fue de  $10^9$  CFU/g de producto final.

45 A continuación se realizó un estudio de la evolución de la cantidad de bacterias *L. casei* por ml de producto final en función del tiempo. Los resultados obtenidos (no representados) muestran que la etapa de granulación no disminuye la supervivencia de las bacterias lácticas en el producto final durante al menos durante 35 días.

Además, un estudio similar realizado en las poblaciones de bacterias *L. bulgaricus*, *S. Thermophilus*, *L. casei* (bajo forma no recubierta) demuestra que la presencia de bacterias *L. casei* recubiertas no tiene impacto negativo en las demás poblaciones de fermentos presentes en el producto final.

50 Como en el ejemplo 1, los resultados de las pruebas organolépticas realizadas con un panel de 10 degustadores muestran por otra parte que el producto conforme a la invención se considera como muy próximo (los mismos criterios que en el ejemplo 1 anteriormente anotado) al producto comparativo de referencia, es decir en todo aspecto idéntico al producto conforme a la invención, con la diferencia de que sólo contiene bacterias bajo forma no recubierta. Finalmente, e igual que en el ejemplo 1 descrito anteriormente, el producto conforme a la invención no

desarrolla ningún mal gusto hasta el fin de la DLC.

**Ejemplo 3: Preparación de un producto alimenticio conforme a la invención: zumo de frutas**

5 Se introducen gránulos de *L. casei* fabricados según el ejemplo 1 descrito anteriormente, a razón de 0,1% en peso por litro de zumo de naranja a pH 3,5 (zumo de naranja puro) para obtener un zumo de naranja que contiene  $10^8$  CFU de *L. casei* recubierto, por gramo de zumo de fruta.

10 El estudio de la evolución de la cantidad de *L. casei* por ml de producto final en función del tiempo muestra que la granulación de las bacterias lácticas no disminuye su supervivencia en el producto final durante al menos 30 días.

15 Los resultados de las pruebas organolépticas realizadas por un panel de 10 degustadores muestran por otra parte que el zumo de fruta conforme a la invención es muy similar (presencia de gusto falso, gusto azucarado, textura y acidez) a un zumo de fruta estándar comparativo que incluye la misma cantidad de bacterias lácticas bajo forma no recubierta. Finalmente, el zumo de fruta conforme a la invención no desarrolla ningún mal gusto hasta el final de la DLC, lo que indica que la materia grasa utilizadas para el recubrimiento de las bacterias no sufre ningún enranciamiento.

20 **Ejemplo 4: Preparación de un producto alimenticio conforme a la invención: mezcla de zumos de frutas y de vegetal.**

25 Se introduce 0,1% de gránulos de *L. casei* preparadas tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, en un producto líquido fermentado compuesto de 89,9% de zumo de naranja puro y de 10,1% de zumo de soja fermentado por *L. bulgaricus* y *S. Thermophilus*.

La concentración en partículas de bacterias lácticas recubiertas era de  $10^8$  CFU/g en el producto final.

30 El estudio de la evolución de la cantidad de bacterias por ml de producto final en función del tiempo ha mostrado (resultados no representados) que la etapa de granulación de bacterias no disminuye su supervivencia en el producto final durante al menos 30 días.

35 Los resultados de pruebas organolépticas realizadas con un panel de 10 degustadores han mostrado por otra parte que el producto se consideró como muy cercano (presencia de mal gusto, textura, percepción de partículas, acidez y astringencia) a un zumo fermentado comparativo estándar que contiene la misma cantidad de bacterias *L. casei* bajo la forma no recubierta y que no desarrolla mal gusto hasta el final de la DLC.

Se obtuvieron resultados idénticos asociando zumo de avena fermentado o leche fermentada con zumo de frutas.

40 **Ejemplo 5: Estudio comparativo del efecto del pH: introducción de gránulos de bacterias en leche estándar y en una leche fermentada**

45 Se introdujeron gránulos de bacterias lácticas *L. casei* con  $1,10^{11}$  CFU/g de gránulos, tales como los preparados en el ejemplo 1 descrito anteriormente, en dos medios de pH diferente, a saber, una leche previamente fermentada por *L. bulgaricus*, *S. Thermophilus* (Medio 1) y una leche estándar no fermentada (Medio 2), a razón de 1% en peso.

El pH del medio 1 era de 4,5 y el del medio 2 era de 6,5.

Los medios 1 y 2 se repartieron a continuación en recipientes estériles de 200 ml.

50 La cantidad de bacteria láctica recubierta era de  $10^8$  CFU/g en cada recipiente.

55 El estudio de la evolución de la cantidad de bacterias por ml de producto final en función del tiempo se representa en la Figura 1 anexa en la cual la concentración en *L. casei* expresada en UFC/ml de leche para cada uno de los dos medios (medio 1: cuadros llenos, medio 2: cuadros vacíos) en función del tiempo en días muestra que el producto correspondiente al medio 2 evoluciona de manera diferente del correspondiente al medio 1. Se constata

particularmente una disminución muy importante y muy rápida de la cantidad de bacterias lácticas *L. casei* en el medio 2 mientras que esta cantidad permanece constante en el medio 1 conforme a la invención.

5 Por otra parte, al cabo de los 12 días de conservación a una temperatura de 12°C, el producto que corresponde al medio 2 comienza a fermentarse y a hincharse en razón del desarrollo de una flora heterogénea en la leche.

Por el contrario, no sobreviene ninguna fermentación en el producto correspondiente al medio 1 conforme a la invención, es decir, que presenta un pH inferior a 4,5.

10 Por otra parte, los resultados de las pruebas organolépticas realizadas con un panel de 10 degustadores muestra que el producto correspondiente al medio 1 es muy cercano (astringencia, gusto azucarado, percepción de las partículas, textura, mal gusto y acidez) a un producto comparativo estándar con base en leche fermentada y que contiene la misma cantidad de bacterias *L. casei* que el producto preparado con el medio 1 pero bajo la forma no recubierta, y que no desarrolla mal gusto hasta el final de la DLC del producto.

15 En cambio, el producto correspondiente al medio 2 se muestra como no consumible en razón del desarrollo de una flora de superficie al término de 21 días, lo que implicó un inflamamiento del recipiente. El examen visual revela un producto con marcada separación de fases y de aspecto redhibitorio.

20 Por consiguiente, el conjunto de estos resultados muestran no solamente que las condiciones de pH inferiores a 4,5 no perjudican la conservación de los gránulos de bacterias lácticas en un producto final pero que al contrario estas condiciones de pH son necesarias para la buena conservación del producto hasta el fin de su DLC.

## REIVINDICACIONES

1. Producto alimenticio líquido que contiene partículas de bacterias lácticas deshidratadas recubiertas de al menos una materia grasa vegetal sólida a temperatura ambiente, caracterizado por el hecho que las dichas bacterias recubiertas se presentan bajo la forma de gránulos de tamaño medio comprendido entre 95 y 300  $\mu\text{m}$  que contienen bacterias lácticas en una cantidad superior o igual a  $1.10^{10}$  UFC por gramo de gránulos, porque los dichos gránulos están exentos de almidón, y porque el dicho producto alimenticio presenta un pH inferior o igual a 4,5 y un contenido ponderado de agua de al menos 83%.  
5
2. Producto alimenticio según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el tamaño mediano de los gránulos de partículas de bacterias lácticas es inferior a 200  $\mu\text{m}$ .  
10
3. Producto alimenticio según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que el tamaño mediano de los gránulos de partículas de bacterias lácticas está comprendido entre 150 y 200  $\mu\text{m}$ .
4. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que se presenta bajo la forma de una leche fermentada o de una bebida.  
15
5. Producto alimenticio según la reivindicación 4, caracterizado por el hecho de que la bebida es un zumo de frutas, una mezcla de leche y de zumo de fruta o un zumo vegetal.  
20
6. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que las bacterias lácticas son escogidas entre los lactobacilos y las bifidobacterias.
7. Producto alimenticio según la reivindicación 6, caracterizado por el hecho de que las bacterias lácticas son escogidas entre *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus Plantarum*, *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium breve*.  
25
8. Producto alimenticio según la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que la bacteria láctica es un *Lactobacillus casei* I-1518.
9. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que las bacterias lácticas son deshidratadas por liofilización previamente a su granulación.  
30
10. Producto alimenticio según la reivindicación 9, caracterizado por el hecho de que las bacterias son tratadas con la ayuda de un agente lipoprotector previo a su liofilización.  
35
11. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que las partículas de bacterias deshidratadas presentan un tamaño medio comprendido entre 80 y 150  $\mu\text{m}$ .
12. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que las partículas de bacterias deshidratadas presentan una actividad en agua inferior a 0,25.  
40
13. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que las materias grasas vegetales utilizadas para recubrir las partículas de bacterias deshidratadas se escogen entre cuerpos hidrogenados y no hidrogenados, fraccionados o no fraccionados, esterificados o no esterificados, ceras alimenticias, ácidos grasos y sus mezclas.  
45
14. Producto alimenticio según la reivindicación 13, caracterizado por el hecho de que las materias grasas vegetales se escogen entre aceite de palma esteárico de temperatura de fusión (TF) = 35°C, aceites de palma de TF 45°C y 58°C, manteca de cacao, manteca de cacahuete, aceite de palmiste, copra hidrogenada de TF = 32°C, cera de carnauba de TF = 80-85°C, cera microcristalina de origen petrolífero, ácido esteárico, ácido palmítico, y sus mezclas.  
50
15. Producto alimenticio según la reivindicación 14, caracterizado por el hecho de que las materias grasas vegetales utilizadas para recubrir las partículas de bacterias deshidratadas se escogen entre aquellas que poseen un punto de fusión superior a 40°C.  
55

- 5 16. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que la concentración en bacterias lácticas deshidratadas en los gránulos es superior o igual a  $1 \cdot 10^{10}$  UFC por gramo de gránulos y con un máximo de  $5 \cdot 10^{11}$  UFC por gramo de gránulos.
- 10 17. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que los dichos gránulos poseen una actividad en agua inferior a 0,4.
- 10 18. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que la o las materias grasas representan de 40 a 75% en peso con respecto al peso total de los gránulos.
- 15 19. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que la concentración en bacterias lácticas recubiertas está comprendido entre  $5 \cdot 10^6$  y  $5 \cdot 10^9$  UFC por gramo de producto final.
- 20 20. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que contiene al menos 90% de agua.
- 20 21. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que la cantidad de gránulos de partículas de bacterias lácticas deshidratadas es inferior a 2% en peso con respecto al peso total del producto final.
- 25 22. Producto alimenticio según la reivindicación 21, caracterizado por el hecho de que la cantidad de gránulos de partículas de bacterias lácticas deshidratadas está comprendida entre 0,01 y 1% en peso con respecto al peso total del producto final.

