

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 589**

51 Int. Cl.:

A23C 9/12 (2006.01)

A23L 1/053 (2006.01)

A23L 3/3571 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2007 E 07848298 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2079316**

54 Título: **Utilización de goma arábiga para mejorar el crecimiento y la supervivencia de bifidobacterias**

30 Prioridad:

02.10.2006 FR 0608613

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

23.02.2015

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17, BOULEVARD HAUSSMANN
75009 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**TERRAGNO, LUC;
DEBRU, FRANÇOIS;
HERVE, STÉPHANE y
TEISSIER, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 529 589 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

Utilización de goma arábica para mejorar el crecimiento y la supervivencia de bifidobacterias

5 La invención se refiere a la utilización de goma de acacia (o goma arábica), sola o en asociación con un aminoácido que contiene azufre, para mejorar el crecimiento y la supervivencia de bifidobacterias que intervienen en la fabricación de productos alimentarios fermentados.

10 Las bifidobacterias forman parte de los microorganismos probióticos más ampliamente utilizados en la actualidad para la fabricación de diferentes productos alimentarios y, particularmente, productos lácteos fermentados.

15 Se definen como probióticos los "microorganismos vivos que, cuando son consumidos en cantidades adecuadas, tienen un efecto beneficioso sobre la salud del huésped" (Informe de la consulta mixta de expertos FAO/OMS sobre la evaluación de las propiedades sanitarias y nutricionales de los probióticos en los alimentos, 2001). Esta definición implica que, para ejercer su efecto beneficioso, el microorganismo en cuestión debe estar presente en cantidad suficiente en el producto preparado para su consumo. Generalmente se considera que esta cantidad debe ser, como mínimo, igual a 10^7 ufc/ml. El mantenimiento de la viabilidad de las bacterias probióticas durante la fabricación, el envasado y el almacenamiento de los productos alimentarios que las contienen constituye, por lo tanto, un elemento esencial de la calidad de estos productos.

20 Las especies de bifidobacterias más empleadas en el sector alimentario son *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. animalis* y *B. infantis*.

25 En el marco de la fabricación de productos alimentarios fermentados, las bifidobacterias pueden ser utilizadas solas; sin embargo, generalmente, por razones organolépticas y/o tecnológicas, son asociadas a otras bacterias lácticas. De forma particularmente frecuente están asociadas a fermentos de yogur (*L. bulgaricus* y *S. thermophilus*). También pueden ser añadidas a productos ya fermentados o, de forma más habitual, mezclarse con otras bacterias lácticas, durante la siembra del sustrato a fermentar.

30 En las condiciones empleadas durante la fabricación de productos alimentarios, el crecimiento de las bifidobacterias es frecuentemente lento; además, al terminar la fermentación, a menudo es difícil mantener una población de bifidobacterias suficiente, durante todo el periodo de conservación del producto, hasta su consumo. Estos problemas pueden acentuarse si las bifidobacterias están asociadas con otras bacterias lácticas. Debido a la escasa competitividad de las bifidobacterias en cultivo mixto, éstas tienen a menudo un crecimiento más lento en presencia de otros fermentos lácticos que cuando se cultivan solas; del mismo modo, su supervivencia durante la conservación del producto fermentado es generalmente peor, particularmente debido a que algunas otras bacterias lácticas siguen produciendo, entre otros, ácido láctico. Este fenómeno, conocido con el nombre de post-acidificación, afecta a la viabilidad de las bifidobacterias presentes en el mismo producto.

40 En este marco, parece deseable estimular el crecimiento y aumentar la viabilidad de las bifidobacterias, y preferentemente, hacerlo induciendo solamente pocos o ningún efecto (positivo o negativo) sobre el crecimiento y la viabilidad de las bacterias lácticas a las que están asociadas estas bifidobacterias.

45 Los inventores han descubierto que la utilización de goma arábica durante la fabricación de los productos fermentados permitía obtener estos resultados.

50 La goma arábica se produce por exudación de heridas en los troncos o en las ramas de ciertas especies de acacia. Es un polisacárido hidrosoluble de alto peso molecular, fuertemente ramificado. La goma arábica utilizada como aditivo alimentario (E414) proviene exclusivamente de *Acacia seyal* o de *Acacia senegal*.

55 Se ha propuesto utilizar la goma arábica para encapsular bacterias probióticas (diversas bifidobacterias y *Lactobacillus paracasei*), para preservarlas del calor y de la deshidratación durante el secado, y mejorar su viabilidad, así como su resistencia a los jugos gástricos y a la bilis (Lian y otros 2002; Lian y otros 2003; Hsiao y otros 2004; Desmond y otros 2002).

60 También ha habido informes de que la ingestión de goma arábica en el ser humano, a razón de 10 gramos al día, permitía aumentar la población de *Bifidobacterium* y de *Bacteroides* en las heces; más recientemente, un estudio similar ha descrito un aumento de la población total de bacterias lácticas, y principalmente de *Bifidobacterium* y de *Lactobacillus*, después de la ingestión de 10 a 15 gramos de goma arábica al día (Wyatt y otros 1986; Cherbut y otros 2003).

Los documentos US 5 952 021 A, FR 2 815 823 A y WO 99/04649 describen composiciones que comprenden, entre otras cosas, *Bifidobacteria* y goma arábica.

65 Los inventores han constatado que, cuando se añadía goma arábica *in vitro* a un cultivo que contenía bifidobacterias, solas o con otras bacterias lácticas, se estimulaba el crecimiento de las bifidobacterias durante la

5 fermentación, y aumentaba su periodo de vida durante la conservación del producto fermentado; en cambio, tenía poco o ningún efecto sobre el crecimiento y la viabilidad de las otras bacterias lácticas cuando éstas estaban presentes. Los inventores constataron, además, que si se añadía además cisteína, los efectos específicos de la goma arábiga sobre las bifidobacterias, particularmente sobre su supervivencia durante la conservación, aumentaban considerablemente.

10 La presente invención tiene por objeto un procedimiento para aumentar la viabilidad de las bifidobacterias durante la conservación de un producto alimentario fresco fermentado que contiene una o varias cepas de *Bifidobacterium* caracterizado porque comprende la adición de goma arábiga a dicho producto alimentario, previamente al fin de su envasado.

Según una realización preferente de un procedimiento de la presente invención, dicho producto alimentario contiene, además, una o varias cepas de bacterias lácticas diferentes de *Bifidobacterium*.

15 Según otra realización preferente de la presente invención, dicho procedimiento comprende, además, la adición, como mínimo, de un aminoácido que contiene azufre (cisteína o metionina), preferentemente cisteína, a dicho producto alimentario previamente al fin de su envasado.

20 Se define en el presente documento por "producto alimentario fermentado" un producto que resulta de la fermentación de un sustrato alimentario apropiado con un fermento que comprende bacterias lácticas, y en el que estas bacterias lácticas permanecen vivas. Este producto también puede contener bacterias lácticas vivas que no han participado en la fermentación, sino que han sido añadidas al final de ésta; también puede contener, llegado el caso, microorganismos utilizables en la fabricación alimentaria, diferentes de las bacterias lácticas, por ejemplo *Acetobacter* o levaduras. El término "fresco" indica que este producto no ha experimentado, después de la fermentación, ningún tratamiento tal como liofilización o secado. Los productos frescos se conservan generalmente por refrigeración.

25 Se define por "fin del envasado", el momento del cierre del recipiente en el que será conservado el producto fermentado hasta su consumo.

30 Los sustratos alimentarios apropiados para la implementación de la presente invención son todos ellos habitualmente utilizables para la obtención de productos alimentarios fermentados que contienen bifidobacterias.

35 Puede tratarse, por ejemplo, de un sustrato lácteo, que puede ser leche de vaca, de cabra, de oveja, de yegua o de cualquier otro mamífero cuya leche sea utilizable en alimentación humana; esta leche puede haber eventualmente sufrido diferentes tratamientos que permiten controlar particularmente su composición de proteínas y de materias grasas (desnatado, ultrafiltración, concentración o dilución, adición de fracciones lácteas, etc.); también puede tratarse de leche reconstituida a partir de leche en polvo o de fracciones lácteas o de leche enriquecida con proteínas lácteas y/o de hidrolizados de proteínas lácteas.

40 También puede tratarse de un sustrato vegetal, por ejemplo, de zumos de frutas o de verduras, de leche de soja, de sustrato a base de cereales tales como trigo, avena, maíz, etc.

45 También puede tratarse de una mezcla o de mezclas de dos o más de estos sustratos.

También puede tratarse de un sustrato, tal como una carga de tipo graso.

50 Llegado el caso dicho sustrato alimentario puede ser adicionado con diferentes agentes, tales como agentes texturizantes, saborizantes, aromatizantes, etc...

De manera clásica, antes de la siembra con las bacterias seleccionadas, dicho sustrato es tratado térmicamente, por ejemplo a 90-95°C durante de 5 a 10 minutos, para destruir los eventuales contaminantes bacterianos.

55 La cepa o cepas de bifidobacterias utilizadas para la implementación de la presente invención pueden seleccionarse entre las especies de bifidobacterias utilizadas habitualmente para la preparación de productos alimentarios, mencionadas anteriormente. Pueden asociarse cepas de bifidobacterias de diferentes especies. Las especies preferentes son particularmente *Bifidobacterium animalis* y, en particular, las subespecies *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium animalis lactis*. A modo de ejemplo, se citará la cepa de *Bifidobacterium animalis lactis* CNCM 1-2494.

60 Otras especies preferidas de bifidobacterias son *B. lactis* BB 12 (CHR Hansen), *B. longum* BB536 (Morinaga), *B. breve* CNCM 1-2219 (Danone), *B. breve* YIT 4014 (Yakult), *B. infantis* 35624 (Procter & Gamble).

65 Las otras cepas de bacterias lácticas también pueden seleccionarse entre las que se utilizan habitualmente para la preparación de productos alimentarios.

Su elección depende del tipo de producto fermentado que se desea obtener:

Como ejemplos no limitativos, se citarán:

- 5 - lactobacilos tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, etc.
 - fermentos de yogur, a saber *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbmeckii* subesp., *bulgaricus*, que pueden, llegado el caso, asociarse con otras especies de *Lactobacillus*;
 10 - fermentos de kéfir, que contiene generalmente *Lactobacillus kefir*, asociado con bacterias de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter*, y con levaduras de los géneros *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*;
 - bacterias mesófilas, utilizadas particularmente para la fabricación de quesos, tales como *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus diacetylactis* y *Leuconostoc*.

15 Puede utilizarse goma arábiga de *Acacia senegal* o de *Acacia seyal*, por ejemplo las comercializadas respectivamente por la empresa CNI con las denominaciones FIBREGUM®P y FIBREGUM®B o las comercializadas por la empresa Kerry Ingredients o por la empresa ALFRED L. WOLFF GmbH con la marca Quick Gum®.

20 El o los aminoácidos que contienen azufre se utilizarán preferentemente en forma libre, según las modalidades descritas en la solicitud PCT FR2006/001688, presentada el 11 de julio de 2006 a nombre de COMPAGNIE GERVAIS DANONE; también pueden utilizarse gránulos que contiene cisteína base, similares a los descritos en la solicitud FR 0606421 presentada el 13 de julio de 2006 a nombre de COMPAGNIE GERVAIS DANONE.

25 La cantidad de goma arábiga en el producto final (es decir el producto fermentado y envasado) será en general de aproximadamente 0,1 a 3%, preferentemente de aproximadamente 0,2 a 1% en peso. La cantidad aminoácidos que contienen azufre en el producto final puede variar entre aproximadamente 5 y 50 mg/l; generalmente será de aproximadamente 5 a 20 mg/l, preferentemente de aproximadamente 5 a 15 mg/l, y ventajosamente de aproximadamente 5 a 10 mg/l.

30 La cantidad de goma arábiga utilizada puede adaptarse ventajosamente en función del contenido de proteínas deseado del producto final, y de la adición o no de aminoácidos que contienen azufre.

35 En el caso de un producto cuyo contenido de proteínas sea superior o igual al 3,4%, la goma arábiga puede utilizarse sola, preferentemente para obtener una cantidad superior o igual al 0,5% en el producto final; si se desea obtener una cantidad de goma arábiga en el producto final inferior al 0,5%, es preferente añadir también el o los aminoácidos que contienen azufre.

40 En el caso de uno producto cuyo contenido de proteínas sea inferior al 3,4%, generalmente es preferente utilizar una combinación de goma de acacia y de aminoácidos que contienen azufre, particularmente para obtener un efecto óptimo sobre la supervivencia de las bifidobacterias.

45 Para obtener el efecto deseado sobre la viabilidad de las bifidobacterias, tanto la goma arábiga como el o los aminoácidos que contienen azufre pueden añadirse, juntos o por separado, y de una o varias veces, en cualquier momento de la fabricación del producto antes del fin de su envasado.

Según una realización preferente del procedimiento de la presente invención, éste comprende una etapa de fermentación de un sustrato alimentario por una o varias cepas de *Bifidobacterium*, en asociación o no con una o varias cepas de una o varias bacterias lácticas diferentes de *Bifidobacterium*.

50 En este caso, para estimular el crecimiento de los *Bifidobacterium*, la adición, como mínimo, de una parte de la cantidad total de goma arábiga y eventualmente, como mínimo, de un parte de la cantidad total del o los aminoácidos que contienen azufre, se realiza previamente a esta fermentación. Cuando la cantidad de goma arábiga prevista en el producto final es inferior al 0,5%, es preferible que la totalidad de la goma arábiga se añada previamente a la fermentación; cuando la cantidad de goma arábiga prevista en el producto final es del 0,5% al 1%, la cantidad de goma arábiga añadida previamente a la fermentación representa preferentemente del 50 al 100% de la cantidad total utilizada; cuando la cantidad de goma arábiga prevista en el producto final es superior al 1%, la cantidad de goma arábiga añadida previamente a la fermentación representa preferentemente del 20 al 100% de la cantidad total utilizada. Del mismo modo, cuando la cantidad de aminoácidos que contienen azufre prevista en el producto final es de 5 a aproximadamente 10 mg/l, la cantidad de aminoácidos que contienen azufre añadida previamente a la fermentación representa preferentemente del 80 al 100% de la cantidad total utilizada; cuando la cantidad de aminoácidos que contienen azufre prevista en el producto final es superior al 10 mg/l, la cantidad de aminoácidos que contienen azufre añadida previamente a la fermentación representa preferentemente del 20 al 100% de la cantidad total utilizada.

65 Según una modalidad particularmente ventajosa de esta forma de realización, como mínimo una parte de los aminoácidos que contienen azufre utilizados se añade durante la siembra con las bacterias, en forma de gránulos que contienen cisteína base tal como se describe en la solicitud FR 0606421, y que contienen, como mínimo, una de

las cepas de *Bifidobacterium* utilizadas.

Un procedimiento según la invención puede comprender varias etapas de fermentación, efectuadas por separado, que emplean diferentes asociaciones de bacterias lácticas, y/o sustratos alimentarios de diferente naturaleza. Estas etapas de fermentación se realizan generalmente en paralelo, y sus productos se mezclan a continuación. Es posible que una de estas fermentaciones independientes emplee un fermento que no comprenda bifidobacterias. En este caso, no es necesario efectuar la fermentación en presencia de goma arábiga o de la combinación goma arábiga/aminoácidos que contienen azufre; sin embargo, es posible añadir, juntas o por separado, tanto la goma arábiga como el o los aminoácidos que contienen azufre, antes, durante o después de la fermentación, para encontrarlos en la mezcla de los productos de fermentación.

En el marco del procedimiento de la invención, la cantidad de bifidobacterias utilizadas para la siembra del sustrato alimentario es de aproximadamente 10^6 a 2×10^7 UFC por ml de sustrato. Cuando las bifidobacterias se emplean para fermentar un sustrato conjuntamente con otras bacterias lácticas, éstas representan en general de aproximadamente el 20% al 75%, preferentemente de aproximadamente el 30% al 50%, y de manera particularmente preferente de aproximadamente el 35% a aproximadamente el 40%, de la población bacteriana presente en el inóculo utilizado.

La cantidad de bifidobacterias en el producto final, inmediatamente después de la fermentación y el envasado (es decir en las 4 horas que siguen al fin de la fermentación), es, como mínimo, de 1×10^8 , preferentemente del orden de 2×10^8 a 10^9 UFC por ml de producto.

Cuando se añaden bifidobacterias a un producto fermentado por otras bacterias lácticas, la cantidad añadida también se ajusta para obtener una población, como mínimo, de 1×10^8 , preferentemente del orden de 2×10^8 a 10^9 UFC por ml de producto.

El procedimiento según la invención es utilizable para la fabricación de una gran variedad de productos frescos fermentados, y puede implementarse sin modificación, o realizando solamente modificaciones menores, de las modalidades habituales de preparación de este tipo de productos.

Las figuras 1 a 5 esquematizan, a modo de ejemplos no limitativos, la implementación del procedimiento de la invención en el marco de la preparación de diversos productos lácteos fermentados.

La figura 1 esquematiza la preparación de un producto fermentado de tipo yogur batido;

La figura 2 esquematiza la preparación de un producto fermentado de tipo yogur bebible;

La figura 3 esquematiza la preparación de un producto fermentado que contiene fermentos de yogur y fermentos de kéfir;

La figura 4 esquematiza la preparación de un producto fermentado que contiene fermentos de yogur y fermentos utilizados en la fabricación de quesos;

La figura 5 esquematiza la preparación de un producto fermentado de tipo yogur consistente.

La presente invención tiene también por objeto productos alimentarios fermentados y, particularmente, productos lácteos fermentados y/o a base de sustrato vegetal, susceptibles de ser obtenidos mediante el procedimiento, según la invención.

La presente invención tiene también por objeto productos alimentarios fermentados que se presentan en forma de rellenos grasos que pueden entrar en la composición de barritas de cereales y de galletas rellenas.

Los productos alimentarios fermentados según la invención, contienen del 0,1 al 3%, preferentemente del 0,2 al 1% en peso de goma arábiga, y ventajosamente, contienen también de aproximadamente 5 a 50 mg/l de aminoácidos que contienen azufre, preferentemente de cisteína.

También contienen, inmediatamente después de la fermentación y el envasado, como mínimo 1×10^8 , preferentemente del orden de 2×10^8 a 10^9 UFC de bifidobacterias por ml de producto. Preferentemente, después de 28 días de conservación entre 4 y 10°C , como mínimo el 40% de las bifidobacterias presentes al final de la fermentación aún están vivas en dichos productos.

Los productos particularmente preferentes contienen del 0,2 al 1% en peso de goma arábiga, y de 5 a 10 mg/l de cisteína, después de 35 días de conservación entre 4 y 10°C , como mínimo el 30% de las bifidobacterias presentes al final de la fermentación aún están vivas en dichos productos. De manera particularmente preferente, se trata de productos lácteos fermentados, de tipo yogur bebible, que contiene del 2 al 3,5% de proteínas.

La presente invención se entenderá mejor con ayuda de la descripción adicional a continuación, que se refiere a ejemplos no limitativos que ilustran la implementación del procedimiento según la invención para estimular el crecimiento y aumentar la supervivencia de bifidobacterias cultivadas en presencia de fermentos de yogur.

5 EJEMPLO 1: EFECTO DE LA GOMA DE ACACIA SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA SUPERVIVENCIA DE LAS BIFIDOBACTERIAS EN UN PRODUCTO LÁCTEO

Protocolo experimental

10 La fórmula seleccionada para la experimentación es una leche con un contenido de proteínas del 4,4% y un contenido del 3,5% de materia grasa, obtenida por rehidratación de polvo de leche. Esta es una fórmula que normalmente da una población de bifidobacterias reducida.

15 Se pusieron a prueba dos dosis de goma de acacia (FIBREGUM®B): al 0,5% y 1% en peso en el producto terminado. La goma de acacia se incorpora durante la rehidratación. El tiempo de rehidratación es de una hora.

La leche adicionada con goma de acacia se trató térmicamente según el siguiente protocolo: precalentamiento a 55°C, pasteurización a 95°C durante 6 minutos, prerrefrigeración a 40°C, refrigeración a 4°C.

20 La leche se almacena a continuación a 4°C hasta su utilización (en las 24 horas siguientes).

Preparación para inoculación:

40 minutos antes de la inoculación, la leche se atempera a 38°C.

25 Para la siembra, se utiliza el siguiente inóculo:

30 *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* + *Bifidobacterium animalis* ssp *lactis* (CNCM: 1-2494), a razón de 5x10⁶ UFC/ml de *Streptococcus thermophilus*, de 5x10⁶ UFC/ml de *Lactobacillus bulgaricus* y de 1x10⁷ UFC/ml de *Bifidobacterium animalis*.

Después de la inoculación, la leche se pone de nuevo al baño maría a 38°C. La fermentación se supervisa en el CINAC® (YSEBAERT) hasta el pH de desuerado (4,8).

35 Desuerado, alisado, envasado:

40 A pH=4,8, la leche fermentada es alisada ("lissé") y se enfría a 20°C (es decir 6 litros/h) con un filtro de malla de 500 µm. A continuación se envasa en tarros de 125 ml, y a continuación se coloca en un túnel frío (4°C) durante una noche. En la mañana del día siguiente, los tarros se transfieren a 10°C y se realiza el seguimiento microbiológico hasta el D28 (día 28). Los recuentos se realizan por triplicado (3 mediciones por ensayo) según el método de la dicloxacilina descrito por Grand y otros, 2003.

Resultados

45 Los resultados se muestran en la tabla I, que indica las poblaciones de *Bifidobacterium animalis* a D1, D14 y D28, mediante la tabla II, que resume los porcentajes de supervivencia a D14 y D28, y mediante la figura 6 que representa la evolución en % de la supervivencia de las bifidobacterias en función del tiempo.

Tabla I

	pob D1 UFC/ml	pob D14 UFC/ml	pob D28 UFC/ml
Control	2,30E+08	1,15E+08	3,00E+07
Acacia al 1%	2,20E+08	1,50E+08	1,20E+08

50

Tabla II

	Fin de la fermentación	D+14	D+28
	D1	D14	D28
Control	100	50	13
Goma de acacia al 1%	100	68	45,5

55 Estos resultados muestran claramente una mejora de la supervivencia de la población bacteriana a D+28 en presencia del 1% de goma de acacia (siendo las poblaciones a D+1 del ensayo de control y del ensayo con Acacia estadísticamente no diferentes).

Al 0,5%, de goma de acacia el efecto es más reducido (resultados no ilustrados), pero sigue siendo significativo.

EJEMPLO 2: EFECTO DE LA ASOCIACIÓN DE GOMA DE ACACIA Y DE CISTEÍNA SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA SUPERVIVENCIA DE BIFIDOBACTERIAS EN UN PRODUCTO LÁCTEO**Protocolo experimental**

Un yogur bebible (2,8% de proteínas) se fabrica por rehidratación de polvo de leche, y se le añade el 0,8% (en peso) de goma de acacia, como se ha descrito en el ejemplo 1 anterior. Este tipo de producto ha sido seleccionado para los ensayos, en la medida en que es éste el que plantea más problemas en términos de mantenimiento de población de bifidobacterias durante el almacenamiento. La leche rehidratada adicionada con goma de acacia se trata térmicamente como se ha descrito en el ejemplo 1 anterior, y se homogeneiza (150-200 bares).

Después de la refrigeración a 38-40°C, se añaden *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a razón de 5x10¹⁰ UFC/ml de *Streptococcus thermophilus*, de 5x10⁶ UFC/ml de *Lactobacillus bulgaricus*. Se añade *Bifidobacterium animalis* ssp *lactis* 1-2494 en forma de fermento con siembra directa, tales como los descritos en la solicitud FR 0606421 suplementado o no con cisteína. El fermento suplementado utilizado corresponde a la adición de 1,92x10⁷ UFC/ml de *Bifidobacterium animalis* y 6,9 mg/l de cisteína.

Después de la inoculación, la fermentación se realiza a 38°C, y es supervisada en el CINAC® (YSEBAERT) hasta el pH de desuerado (4,3 < pH < 4,4).

El desuerado se realiza mediante trasiego y refrigeración entre 10-20°C, a continuación batido.

El producto se envasa a continuación en tarros y a continuación se coloca en el túnel frío (4°C).

A continuación se realizan recuentos de poblaciones después de 2 h de almacenamiento a 15°C y después a los 2, 8, 14, 28 y 37 días de almacenamiento a 10°C.

Resultados

Los resultados se muestran mediante la tabla III a continuación, y mediante la figura 7, que representa el seguimiento de la población de bifidobacterias en función del tiempo.

Estos resultados muestran un efecto muy claro de la goma de acacia, y de la asociación goma de acacia + cisteína sobre el crecimiento de las bifidobacterias. En el caso de la asociación goma de acacia + cisteína, se observa además un efecto particularmente claro sobre la supervivencia de las bifidobacterias durante la conservación.

Tabla III

	Ensayo 1 Acacia	Ensayo 2 Acacia + cisteína	Control	Control de cisteína
Goma de acacia	0,8%	0,8%	0%	0%
Equivalente puro de cisteína	0 mg/l	6,9 mg/l	0 mg/l	6,9 mg/l
Bifidus inoculados	1,92 E+7 UFC/g	1,67 E+7 UFC/g	1,92 E+7 UFC/g	1,67 E+7 UFC/g
Número de Bifidus a las 2 h de almacenamiento	2,3 E+8 UFC/g	5,4 E+8 UFC/g	1,3 E+8 UFC/g	2,1 E+8 UFC/g
Número de Bifidus a D+2	1,0 E+8 UFC/g	3,5 E+8 UFC/g	ND	1,2 E+8 UFC/g
Número de Bifidus a D+8	2 E+8 UFC/g	3,9 E+8 UFC/g	1,3 E+8 UFC/g	1,8 E+8 UFC/g
Número de Bifidus a D+14	1,2 E+8 UFC/g	4,2 E+8 UFC/g	6,9 E+7 UFC/g	1,4 E+8 UFC/g
Número de Bifidus a D+28	5,2 E+7 UFC/g	2,5 E+8 UFC/g	3,9 E+7 UFC/g	8,8 E+7 UFC/g
Número de Bifidus a D+37	4,4 E+7 UFC/g	2,0 E+8 UFC/g	3,2 E+7 UFC/g	7,8 E+7 UFC/g

ND: no determinado

El mismo experimento se reprodujo con un producto al 2,7% de proteínas, que contenía el 0,8% de goma de acacia, y sembrado con un fermento suplementado con cisteína, correspondiente a la adición de 1,90x10⁷ UFC/ml de *Bifidobacterium animalis* y 7 mg/l de cisteína.

Los resultados se muestran mediante la tabla IV.

Estos resultados confirman el efecto de la goma de acacia, y sobre todo de la asociación goma de acacia + cisteína

sobre la supervivencia de las bifidobacterias. 52 días después de la inoculación, las bifidobacterias supervivientes son, en efecto, 2 veces más numerosas en el producto adicionado con goma de acacia, y 10 veces más numerosas en el producto adicionado con goma de acacia y con cisteína que en el producto de control.

5

Tabla IV				
	Ensayo 3	Ensayo cisteína	Ensayo acacia	Control
Goma de acacia	0,8%	0%	0,8%	0%
Equivalente puro de cisteína	7 mg/ml	7 mg/ml	0 mg/ml	0 mg/ml
Bifidus inoculados	1,90 E+07 UFC/g	1,90 E+07 UFC/g	1,90 E+07 UFC/g	1,90 E+07 UFC/g
Número de Bifidus a D+2	4,70 E+08 UFC/g	1,05 E+08 UFC/g	1,50 E+08 UFC/g	7,00 E+07 UFC/g
Número de Bifidus a D+8	2,50 E+08 UFC/g	9,00 E+07 UFC/g	1,00 E+08 UFC/g	7,00 E+07 UFC/g
Número de Bifidus a D+14	3,40 E+08 UFC/g	7,00 E+07 UFC/g	5,00 E+07 UFC/g	3,00 E+07 UFC/g
Número de Bifidus a D+21	2,40 E+08 UFC/g	4,00 E+07 UFC/g	6,00 E+07 UFC/g	3,00 E+07 UFC/g
Número de Bifidus a D+28	1,20 E+08 UFC/g	2,00 E+07 UFC/g	3,00 E+07 UFC/g	9,00 E+06 UFC/g
Número de Bifidus a D+35	1,00 E+08 UFC/g	6,00 E+06 UFC/g	1,00 E+07 UFC/g	5,00 E+06 UFC/g
Número de Bifidus a D+52	3,00 E+07 UFC/g	3,00 E+06 UFC/g	6,00 E+06 UFC/g	3,00 E+06 UFC/g

Referencias bibliográficas

- 10 - Lian y otros; Survival of Bifidobacteria after spray-drying. International Journal of Food Microbiology, 2002, vol. 74, Nº1/2, p. 79-86.
- Lian y otros; Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. International Journal of Food Microbiology, 2003 vol. 86, n°3, p. 293-301.
- Hsiao y otros 2004; Effect of packaging conditions and temperature on viability of microencapsulated bifidobacteria during storage. Journal of Science of Food and Agriculture, 2004, vol. 84, n°2, p. 134-139.
- 15 - Desmond y otros 2002. Improved survival of Lactobacillus paracasei NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. Journal of Applied Microbiology, 2002, vol. 93, p. 1003-1011.
- Wyatt y otros 1986; A change in human faecal flora in response to inclusion of gum arabic in the diet. British Journal of Nutrition, 1986, vol.55, n°2, p. 261-266.
- Cherbut y otros 2003; Acacia gum is a bifidogenic dietary fibre with high digestive tolerance in healthy humans. Microbial Ecology in Health and Disease, 2003, vol. 15, n°1, p. 43-50.
- 20 - Grand y otros, 2003; Quantitative analysis and molecular identification of bifidobacteria strains in probiotic milk products. European Food Research and Technology, vol. 217, p. 90-92.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para aumentar la viabilidad de las bifidobacterias durante la conservación de un producto alimentario fresco fermentado que contiene una o varias cepas de *Bifidobacterium*, **caracterizado porque** comprende la adición de goma arábica a dicho producto alimentario antes del fin de su envasado.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho producto alimentario contiene, además, una o varias cepas de bacterias lácticas diferentes de *Bifidobacterium*.
- 10 3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado porque** comprende, además, la adición, como mínimo, de un aminoácido que contiene azufre a dicho producto alimentario antes del fin de su envasado.
- 15 4. Procedimiento, según la reivindicación 3, **caracterizado porque** dicho aminoácido que contiene azufre es cisteína.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la goma arábica se añade de manera que su concentración final en el producto alimentario sea de aproximadamente de 0,1 a 3% en peso.
- 20 6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado porque** el o los aminoácidos que contienen azufre son añadidos de manera que su concentración final sea de aproximadamente 5 a 50 mg/l.
- 25 7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** comprende una etapa de fermentación de un sustrato alimentario apropiado mediante un fermento que comprende una o varias cepas de *Bifidobacterium* eventualmente asociadas con, como mínimo, una cepa de una bacteria láctica diferente de *Bifidobacterium*, y **porque** para estimular el crecimiento de dichos *Bifidobacterium*, la adición, como mínimo, de una parte de la cantidad total de goma arábica y eventualmente, como mínimo, de una parte de la cantidad total de aminoácido que contiene azufre, se realiza antes de dicha etapa de fermentación.
- 30 8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** dicho producto fermentado contiene, como mínimo, una cepa de *Bifidobacterium animalis*.
- 35 9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** las bacterias lácticas diferentes de *Bifidobacterium* comprenden una o varias cepas de *Streptococcus thermophilus* y una o varias cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subesp., *bulgaricus*.
10. Producto alimentario fermentado que puede obtenerse mediante un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 40 11. Producto alimentario fermentado, según la reivindicación 10, **caracterizado porque** se trata de un producto lácteo fermentado.
12. Producto alimentario fermentado, según la reivindicación 10, **caracterizado porque** se trata de un producto a base de sustrato vegetal fermentado.
- 45 13. Producto alimentario fermentado, según la reivindicación 10, **caracterizado porque** se trata de una carga de tipo graso.

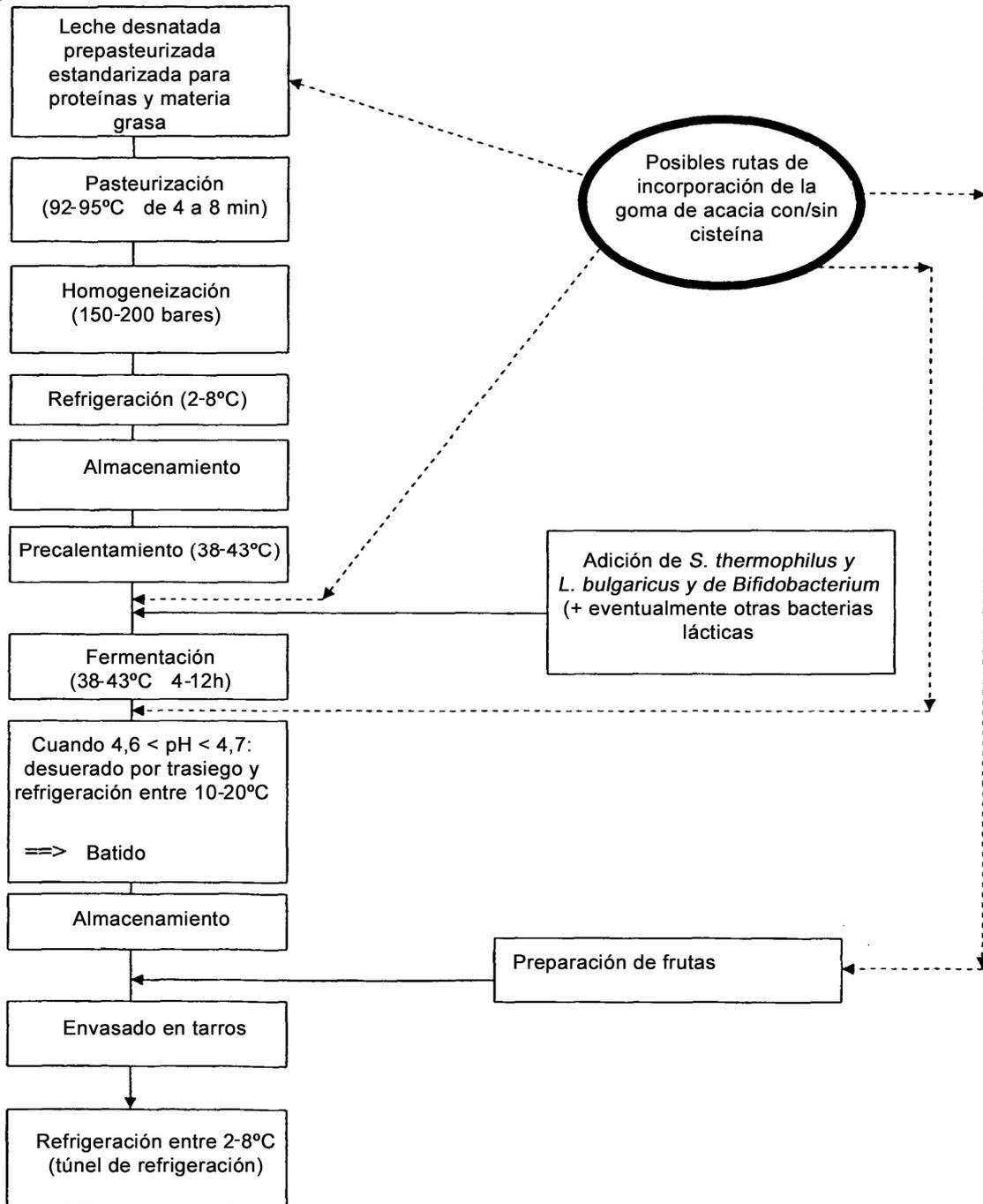


Figura 1

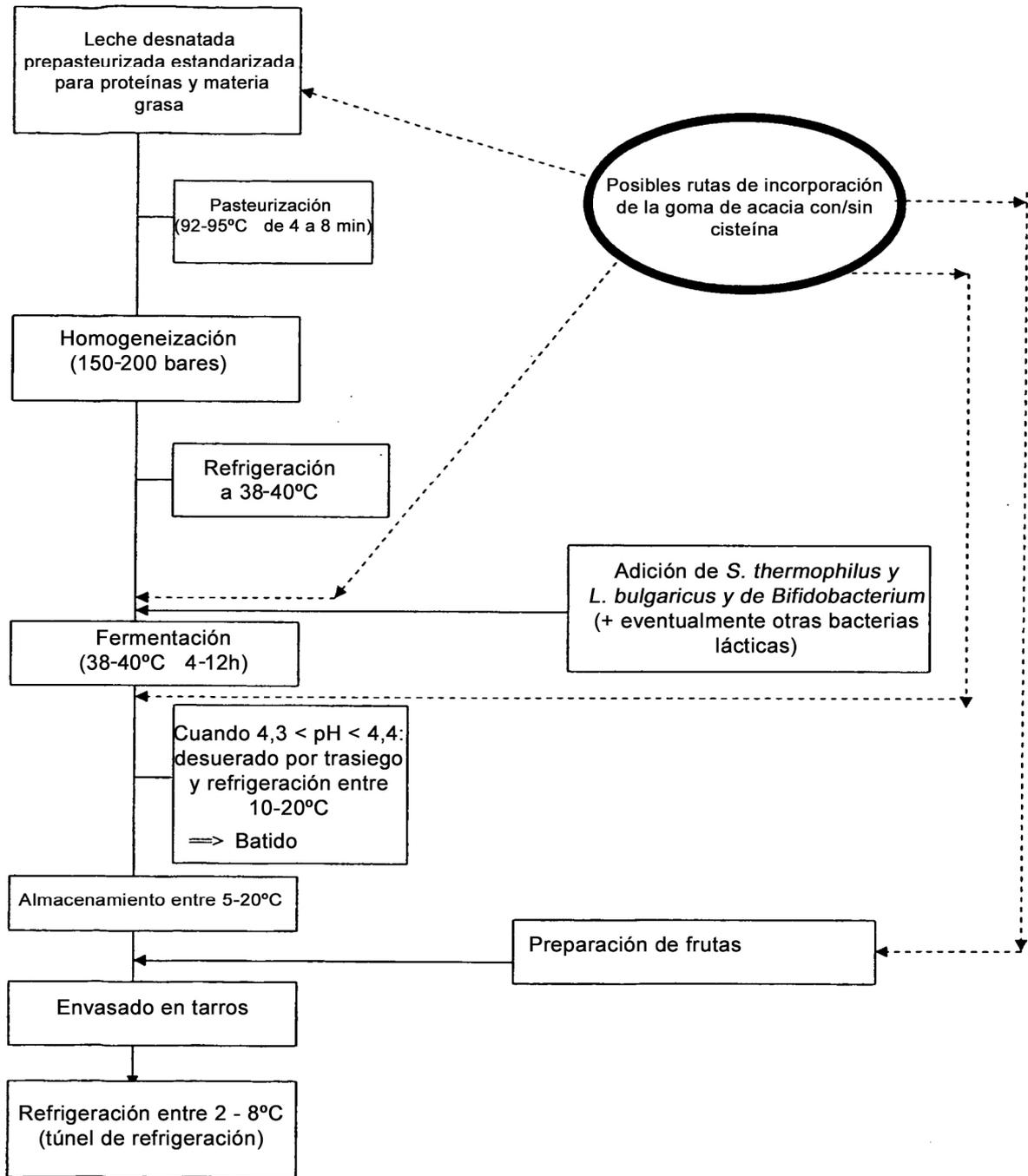


Figura 2

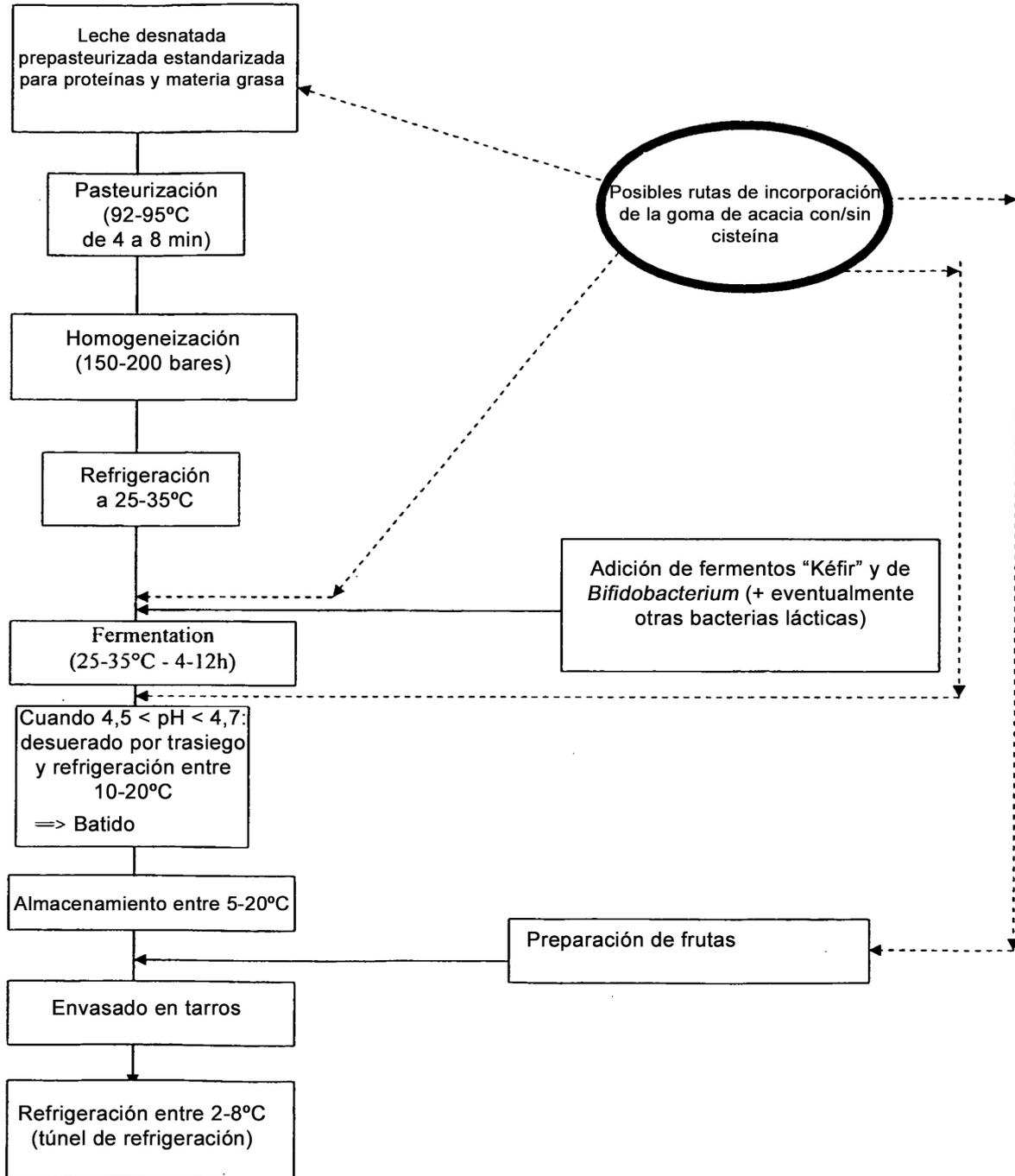


Figura 3

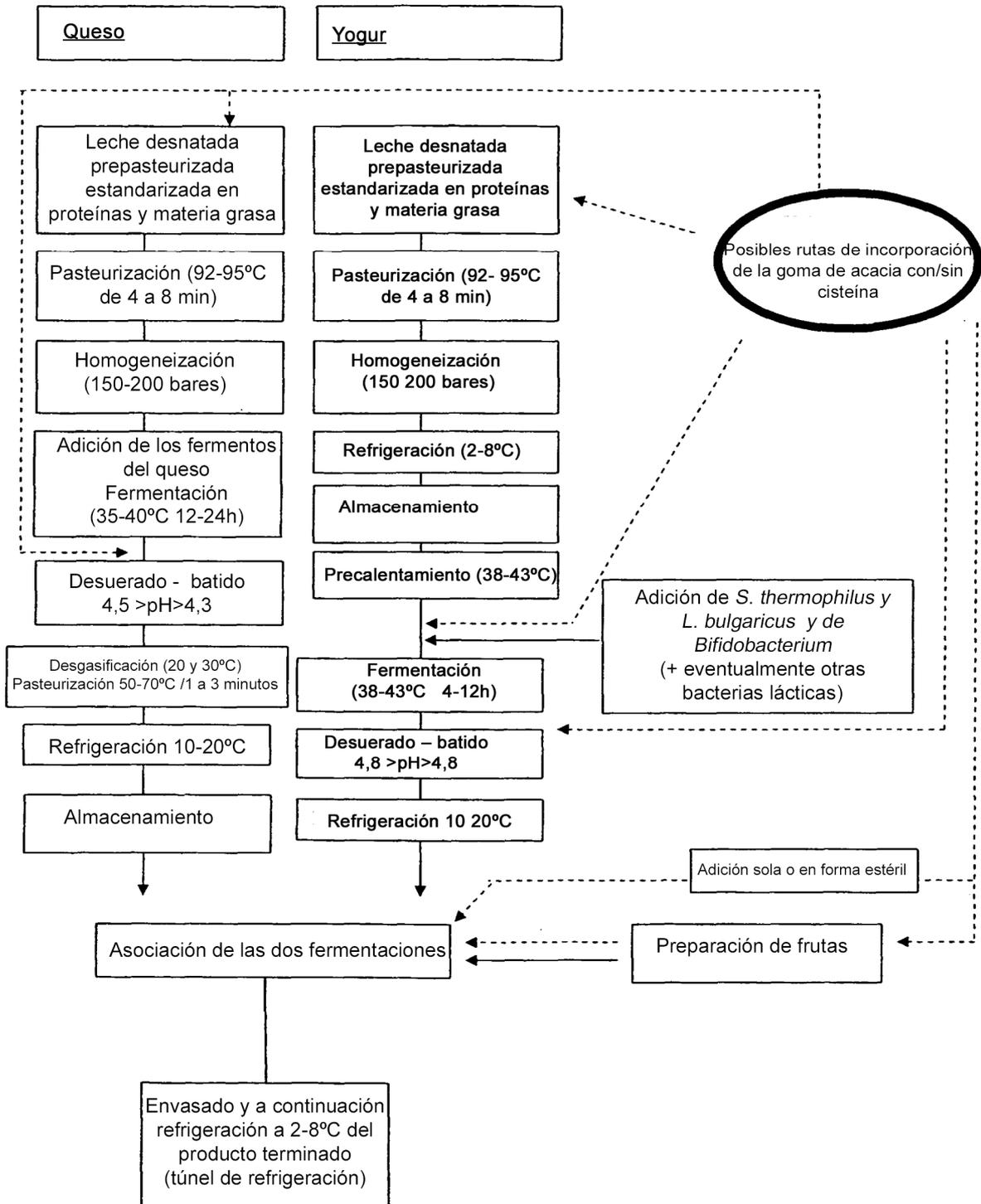


Figura 4

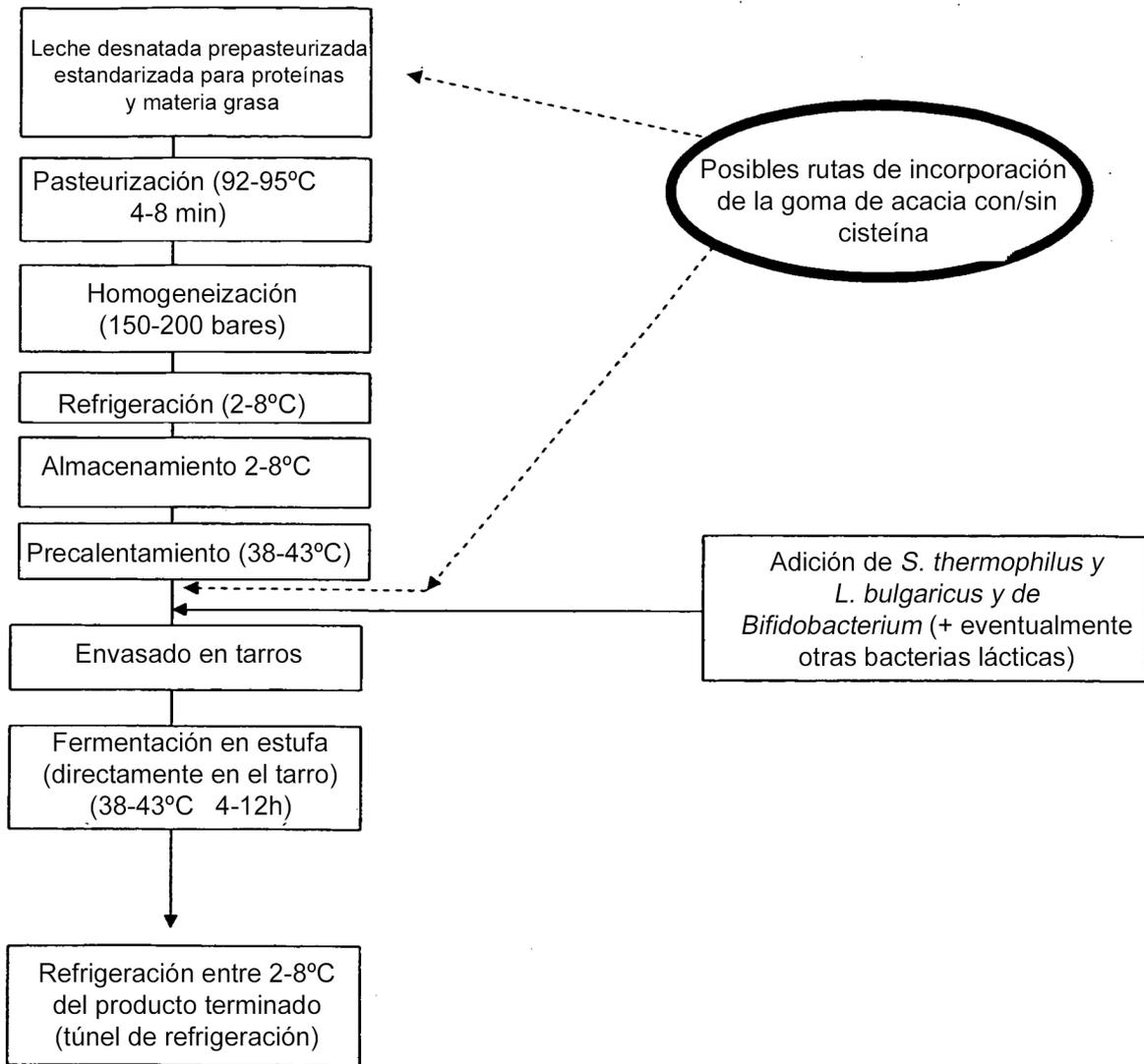


Figura 5

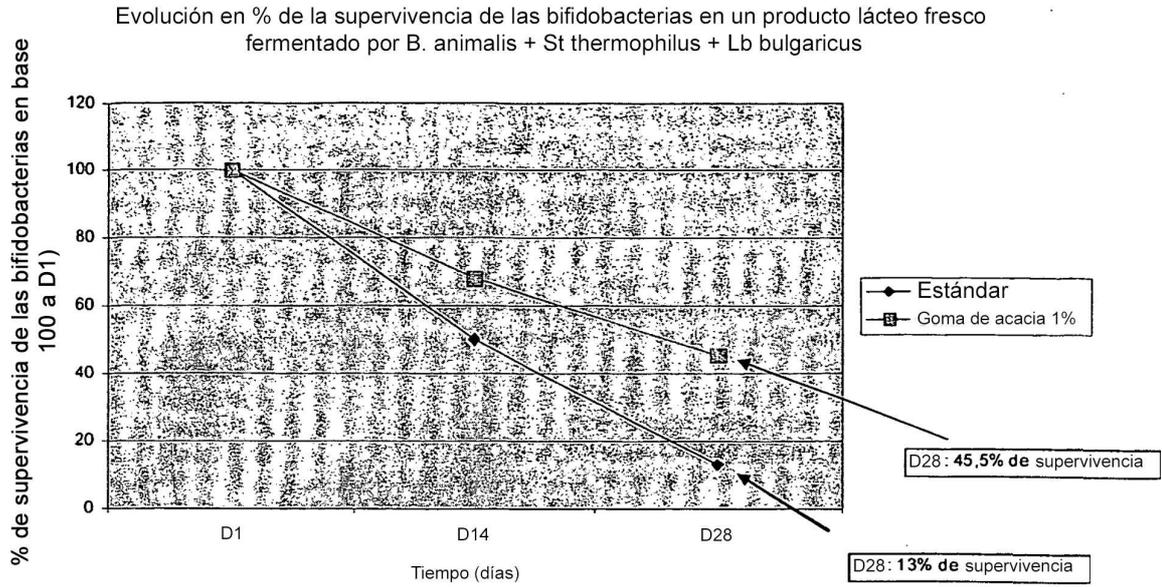


Figura 6

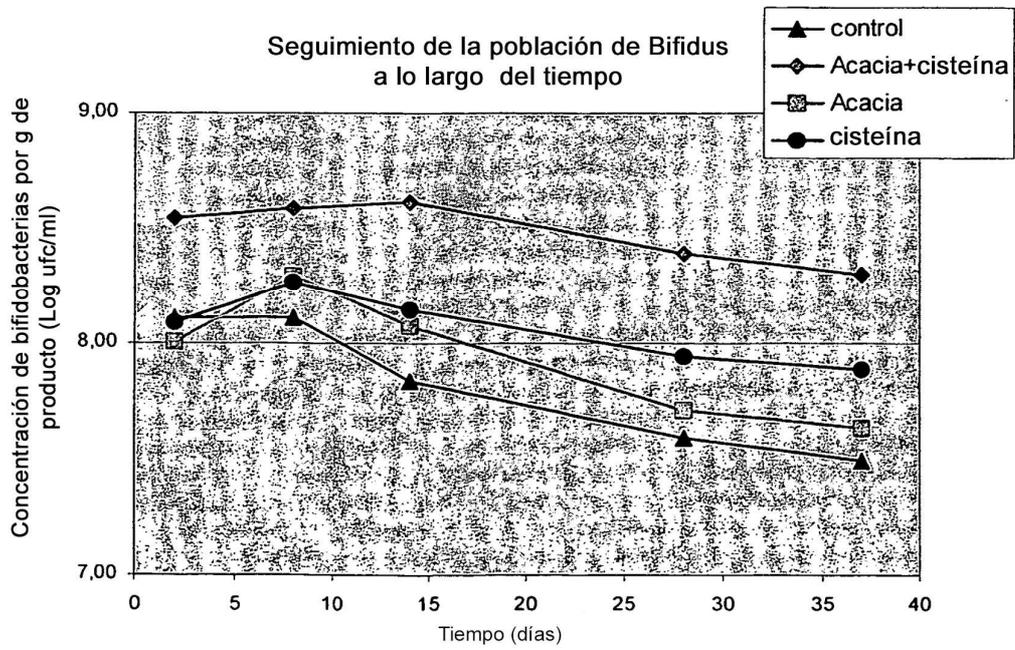


Figura 7