

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 372**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3508 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2007 E 07848001 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 2104437**

54 Título: **Producto alimenticio que comprende probióticos y un monoácido débil protonado**

30 Prioridad:

08.12.2006 FR 0610742

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

18.12.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FRANCOIS, ALAN;
PORTIER, RÉMI;
CREPEL, PASCAL y
FAURIE, JEAN-MICHEL**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 554 372 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

Producto alimenticio que comprende probióticos y un monoácido débil protonado.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de un producto alimenticio fresco a base de zumos vegetales y/o de leche, que comprende una concentración estable de probióticos vivos que producen gustos falsos y/o gases en la matriz inicial del producto alimenticio, que contiene de 1 a 20 g/l de ácido láctico protonado y que tiene un pH comprendido entre 3 y 4.

10 La ingestión de microorganismos vivos denominados probióticos, de los que algunas cepas de bacterias, en particular las que pertenecen al género *Lactobacillus*, son particularmente beneficiosos para la salud. En efecto, son objeto de numerosos estudios que demuestran unos efectos clínicos preventivos en unos campos variados (por ejemplo en los campos de manifestaciones alérgicas, de diarreas infecciosas, de enfermedades inflamatorias) y sobre algunas funciones fisiológicas (por ejemplo la digestión de la lactosa, el tránsito intestinal, la inmunidad). Estos
15 probióticos son capaces en particular de favorecer un buen funcionamiento de la flora intestinal, que es susceptible de ser de interés para la población general. En efecto, estas bacterias producen, entre otros, unas bacteriocinas y ácido láctico que aumentan indirectamente la digestibilidad de los alimentos, que favorecen el peristaltismo intestinal, y aceleran la evacuación de las heces. Además, estas bacterias producen ciertas vitaminas del complejo B, y favorecen en general la absorción de las vitaminas y minerales, disminuyen el colesterol sanguíneo, refuerzan el sistema inmunitario y recubren las mucosas intestinales a fin de protegerlas contra la invasión y las actividades de
20 microorganismos perjudiciales.

De este modo, desde hace varios años, las industrias agroalimentarias tienden a incorporar tales bacterias en sus productos.

25 Tales productos adicionados de bacterias son tradicionalmente unos productos lácteos, pero otros productos alimenticios, especialmente a base de vegetales y en particular de frutas, son interesantes de desarrollar para el mercado de la industria agroalimentaria.

30 Unos productos alimenticios a base de frutas y adicionados de bacterias del género *Lactobacillus* son ya conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo en la solicitud de patente internacional WO 00/70972, y la solicitud de patente europea EP 0113055.

35 Sin embargo, en unos productos alimenticios a base de frutas adicionados de *lactobacillus*, se ha podido observar un crecimiento y/o una actividad bacteriana que induce durante el almacenamiento de los productos una alteración de sus cualidades por una producción de gas y de gustos artificiales que los hacen inadecuados para el consumo.

En efecto, numerosos micro-organismos son, por ejemplo, capaces de descarboxilar unos ácidos cinámicos sustituidos tales como el ácido trans-4-hidroxi-3-metoxi-cinámico (ácido ferúlico) y el ácido trans-4-hidroxi-cinámico
40 (ácido p-cumárico) que pueden estar presentes en la leche o en los zumos vegetales para formar respectivamente los dos compuestos volátiles siguientes: el 3-metoxi-4-hidroxiestireno (4-vinil-guayacol) y el 4-hidroxiestireno (4-vinil-fenol). Estas moléculas son responsables de gustos falsos de tipo "fenólico, ahumado, guantes, medicinal, etc.". Las actividades ácido p-cumárico y ácido ferúlico descarboxiladas se han detectado en las bacterias del género *Lactobacillus*. En particular, los *Lactobacillus* conocidos para estas actividades son los siguientes: *L. brevis*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paracasei* (Van Beek, S y Priest FG - 2000 - Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation - Applied and
45 Environmental Microbiology, 66 (12): 5322-8). Así, por medio de unas vías de biotransformación, unas cepas de *Lactobacillus* son capaces de generar gustos falsos a partir de ácidos fenólicos.

50 Además, numerosas cepas de los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* son también capaces de degradar el malato, el citrato, el piruvato, el fumarato, el tartrato y el gluconato, que pueden estar presentes en la leche o en los zumos vegetales para producir gas (Hegazi F.Z., Abo-Elnaga I.G., 1980. Degradation of organic acids by dairy lactic acid bacteria. Mikrobiologie der Landwirtschaft der Technologie und des Umweltschutzes, 135 (3), 212). Así, por ejemplo, unos ácidos orgánicos tales como el ácido málico o el ácido cítrico, cuando están degradados, al menos que está asimilación se acompañe de una producción demasiado alta de acetato que genere
55 él también gustos falsos, no plantean esta problemática de generación de gustos desagradables para el consumidor. Sin embargo, la asimilación de estos ácidos orgánicos por unas cepas bacterianas producirá esta vez CO₂ que hinchará el embalaje del producto. En efecto, estos ácidos orgánicos son naturalmente metabolizados por ciertas especies de *Lactobacillus* para producir piruvato (el compuesto central de los ciclos metabólicos tal como el metabolismo carbonado) y CO₂; además, el piruvato está a su vez sujeto a descarboxilaciones que aumentan aún más el porcentaje de CO₂ producido.

Un producto alimenticio a base de frutas de tipo bebida o puré de frutas y que comprende probióticos vivos estables tendrá como ventaja aportar al consumidor los beneficios de los frutas y de los probióticos.

65 El Plan Nacional de Nutrición y Salud recomienda el consumo mínimo de cinco porciones de frutas y verduras por

día. Las observaciones llevadas a cabo por numerosos científicos muestran que consumir más frutas y verduras permite en particular reducir el porcentaje de colesterol, los aportes lipídicos, y limitar la prevalencia de la obesidad en los niños.

5 Un producto alimenticio a base de leche y que comprende unos probióticos vivos estables tendrá como ventaja aportar al consumidor los beneficios de un producto lácteo y unos probióticos.

10 Varios estudios científicos sugieren que los probióticos pueden desempeñar también un papel de primer plano en la salud. Cada cepa de probiótico puede ofrecer unos beneficios para la salud específicos. Se puede encontrar entre estos beneficios para la salud: una mejora del funcionamiento del sistema digestivo y un refuerzo de las defensas naturales. Algunos probióticos actúan absorbiendo unas proteínas y otros producen vitaminas. Algunos pueden también producir unos compuestos que luchan contra la propagación de bacterias patógenas y pueden así desempeñar un papel en el ecosistema intestinal.

15 Sería deseable para la industria agroalimentaria poder preparar tales productos alimenticios, sin problemas de gustos falsos y de gas, y es el objeto de la presente invención.

20 Los inventores han descubierto que adicionando la matriz inicial del producto alimenticio que comprende unos probióticos que, naturalmente, producen gustos falsos y/o gas en dicha matriz, con el ácido láctico como monoácido débil, en una zona de pH definido, este impedía a los probióticos producir gustos falsos y/o gas en el producto alimenticio.

25 Sin embargo, los inventores han mostrado asimismo que sólo la forma protonada del ácido láctico, es decir, en un medio cuyo pH es inferior al pKa del ácido láctico como monoácido débil, es eficaz para impedir a los probióticos producir gustos falsos y/o gas en el producto alimenticio.

30 Estos han podido demostrar que un pH comprendido entre 3 y 4, preferentemente entre 3,4 y 4, más preferentemente entre 3,4 y 3,7, era necesario para obtener un gusto aceptable para el consumidor, permitiendo al mismo tiempo que un máximo del ácido láctico adicionado como monoácidos débiles esté en una forma protonada. La presente invención permite en particular proporcionar unos productos que tengan una concentración superior al 50% de frutas y que comprendan unos probióticos vivos a una concentración estable.

35 Sin embargo, al ser los monoácidos débiles unos ácidos, el ácido láctico disminuirá el pH de una matriz inicial ya ácida (tal como los zumos de frutas) por debajo de estos valores de pH deseados (entre 3 y 4). Además, los monoácidos débiles tienen tendencia a tener un gusto malo, por lo tanto no es aceptable poner más de 50 g/l de ácido láctico en un producto alimenticio. Por ello, la presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de un producto alimenticio fresco que comprende una concentración estable de probióticos vivos que producen sabores falsos y/o gas en la matriz inicial del producto alimenticio, caracterizado por que contiene de 1 a 20 g/l de ácido láctico protonado y por que tiene un pH comprendido entre 3 y 4, que comprende, entre otras, las etapas de ajuste del pH a un pH diana comprendido entre 3 y 4 por adición de un ácido o de una base alimentaria.

40 Este producto alimenticio fresco que comprende una concentración estable de probióticos vivos que producen gustos falsos y/o gas en la matriz inicial del producto alimenticio y caracterizado por que contiene de 1 a 20 g/l de ácido láctico protonado, y por que tiene un pH comprendido entre 3 y 4, se conserva a una temperatura comprendida entre 0 y 15°C, preferentemente entre 4 y 10°C.

45 Un producto alimenticio fresco (es decir conservado a una temperatura comprendida entre 0 y 15°C, preferentemente entre 4 y 10°C) preferido en el sentido de la presente invención, contiene más de 2,2 g/l y hasta 20 g/l de ácido láctico protonado, y su pH está comprendido entre 3,4 y 4. Tal producto presenta así un contenido en ácido láctico protonado superior a 2,2 g/l, con un máximo de 20 g/l, y un pH superior a 3,4, con un valor máximo de 4.

50 De manera preferida, esta cantidad de ácido láctico protonado es la presente en el producto al final de su fabricación.

55 Por producto alimenticio fresco, se entiende designar según la presente invención un producto alimenticio que se conservará entre 0 y 15°C, preferentemente entre 4 y 10°C.

60 Se entiende generalmente por "producto alimenticio fresco" unos productos conservados entre 4 y 8°C, pero es conocido por el experto en la materia que el refrigerador del consumidor está más generalmente a una temperatura comprendida entre 4 y 10°C. Es por ello que los productos alimenticios se formulan con el fin de poder ser conservados a tales temperaturas (comprendidas entre 4 y 10°C).

65 Por probiótico, se entiende designar unos microorganismos vivos que, cuando son ingeridos en cantidad suficiente, ejercen un efecto positivo sobre la salud más allá de los efectos nutricionales tradicionales.

Por probióticos vivos, se entiende designar, según la presente invención, unos probióticos cuyo porcentaje de supervivencia, después de 28 días, en un producto alimenticio según la presente invención es superior al 60% y ventajosamente superior al 80%.

5 La viabilidad de los probióticos se mide mediante técnicas de numeración conocidas por el experto en la materia como, por ejemplo, la numeración en masa, la numeración en superficie, las células de Malassez, el recuento directo, la turbidez, la nefelometría, el recuento electrónico, la citometría de flujo, la fluorescencia, la impedanciometría, el análisis de imágenes.

10 Por concentración estable, se entiende designar, según la presente invención, una concentración de probióticos vivos que varía como máximo el 50%, preferentemente el 10% en una duración de 35 días a partir de la adición de los probióticos vivos a la matriz inicial del producto alimenticio, a una temperatura de 10°C.

15 Según la presente invención, la concentración de bacterias en el producto alimenticio es superior a 10^5 , preferentemente superior a 10^7 UFC/ml, todavía más preferentemente superior a $0,5 \cdot 10^8$ UFC/ml. De manera todavía más preferida entre todas, la concentración está comprendida entre $0,5 \cdot 10^8$ y $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml.

20 Así, por ejemplo, a una concentración inicial del producto alimenticio según la presente invención de 10^8 UFC/ml, una concentración estable estaría comprendida entre $0,5 \cdot 10^8$ UFC/ml y $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml, preferentemente entre $0,9 \cdot 10^8$ UFC/ml y $1,1 \cdot 10^8$ UFC/ml.

En particular, estos probióticos pueden ser unas cepas bacterianas.

25 Por cepas bacterianas, se entiende designar preferentemente, según la presente invención, unas bacterias lácticas, del género *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.* y en particular *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescents*, *Bifidobacterium infantis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, o sus mezclas.

30 Más particularmente, las cepas bacterianas preferidas según la presente invención son del género *Lactobacillus*, o *Bifidobacterium*, preferentemente *Lactobacillus plantarum* y todavía más preferentemente las cepas *Lactobacillus plantarum* depositadas el 16/03/95 con el número DSM 9843 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen von Zellkulturen GmbH, o de las cepas de *Lactobacillus plantarum* depositadas el 4/04/02 con el número CNCM I-2845 en la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes.

35 La cepa de *Lactobacillus Plantarum* depositada el 16/03/95 con el número DSM 9843 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen von Zellkulturen GmbH está comercializada por la compañía PROBI, bajo el nombre de *Lactobacillus plantarum* 299v®. Esta cepa posee numerosas ventajas para una utilización como probiótico en un producto alimenticio a base de frutas:

- responde a los criterios probióticos fijados por la comunidad científica.
- está patentada, caracterizada (RAPD, ribotipificación) y su clasificación está confirmada;
- es GRAS (del inglés "Generally Reconized As Safe");
- está ya presente en una cantidad de 10^8 UFC/ml en el producto ProViva® distribuido por Skanemejerier y se consume desde 1994;
- presenta una muy buena supervivencia a un pH ácido inferior a 4;
- es amilasa negativa, por lo tanto no degrada la textura del producto final.

55 Sin embargo, esta cepa tiene también varios inconvenientes:

- presenta un fuerte potencial de post-acidificación
- genera defectos organolépticos importantes relacionados con la síntesis del ácido acético.
- degrada el ácido cítrico (por ejemplo, zumo de limón, zumo de naranja) o el ácido málico (por ejemplo zumo de manzana o de pera) con producción de gas carbónico, lo que da los problemas de hinchamiento posibles, en particular si la cadena del frío es interrumpida (es decir, superación de la temperatura en 8°C).

65 Esta cepa presenta por lo tanto numerosos puntos positivos, pero su utilización para la fabricación de productos

alimenticios no permite obtener una calidad (en particular organoléptica) aceptable, debido a esta producción de gustos falsos y/o de gas.

5 Este es asimismo el caso para la cepa de *Lactobacillus plantarum* depositada el 4/04/02 con el número CNCM I-2845 en la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes.

Más particularmente, los probióticos según la presente invención son los probióticos que producen gustos artificiales y/o gas en la matriz inicial del producto alimenticio.

10 Por matriz inicial del producto alimenticio, se entiende designar, según la presente invención, un producto alimenticio, preferentemente leche, zumo vegetal, siendo preferentemente un zumo de frutas o un zumo de verduras, o un zumo de frutas o de verduras reconstituidas a base de concentrado, sin probiótico, no empobrecido de ácidos orgánicos, pero que comprende de manera opcional otras sustancias tales como, por ejemplo, azúcar, agua, aromas, colorantes, edulcorantes, agentes anti-oxígeno, leche, conservantes, agentes de textura, proteínas de origen animal (proteínas de leche, de lactosuero, etc.) o vegetal (soja, arroz, etc.) o unos extractos de vegetales (soja, arroz, etc.).

20 Así, por ejemplo, si el producto alimenticio fabricado con la ayuda del procedimiento según la presente invención es a base de zumo de frutas, adicionado de probióticos vivos y de monoácido débil protonado, la matriz inicial del producto alimenticio es un zumo de frutas.

25 Asimismo, otro ejemplo puede ser: si el producto alimenticio fabricado con la ayuda del procedimiento según la presente invención es a base de leche, adicionado de probióticos vivos y de monoácido débil protonado, la matriz inicial del producto alimenticio es leche.

Según la presente invención, el producto alimenticio es preferentemente a base de una matriz inicial de zumo vegetal y/o de leche. Este producto alimenticio puede ser un producto lácteo fermentado.

30 Por "productos lácteos fermentados" se entienden más particularmente unos productos lácteos fermentados listos para el consumo humano, es decir unos alimentos lácteos fermentados.

Aquí, se consideran más particularmente por este término las leches fermentadas y los yogures. Dichos alimentos lácteos fermentados pueden alternativamente ser unos quesos blancos o unos "petits-suisse".

35 Se da a los términos "leches fermentadas" y "yogures" sus significados habituales en el campo de la industria láctea, es decir unos productos destinados al consumo humano, y que proceden de la fermentación láctica acidificante de un sustrato lácteo. Estos productos pueden contener unos ingredientes secundarios tales como frutas, vegetales, azúcar, etc. Se puede referir, por ejemplo, al Decreto francés nº 88-1203 del 30 de diciembre de 1988 relativo a las leches fermentadas y a los yogures, publicado en el Journal Officiel de la République Française el 31 de diciembre de 1988.

45 Se puede referir también al "Codex Alimentarius" (preparado por la Comisión del Codex Alimentarius bajo los auspicios de FAO y de la OMS, y publicado por la Division Information de la FAO, disponible en Internet en la dirección <http://www.codexalimentarius.net>; véase más particularmente el volumen 12 del Codex Alimentarius "Normes Codex pour le lait et les produits laitiers", y la norma "CODEX STAN A-1 1(a)-1975").

50 El término "leche fermentada" está así reservado aquí al producto lácteo preparado con un sustrato lácteo que ha sufrido un tratamiento al menos equivalente a la pasteurización, inoculado con unos microorganismos que pertenecen a la especie o a las especies características de cada producto. Una "leche fermentada" no ha sufrido ningún tratamiento que permita sustraer un elemento constitutivo del sustrato lácteo utilizado, y en particular no ha sufrido un escurrido del coágulo. La coagulación de las "leches fermentadas" no debe obtenerse mediante medios diferentes a los que resultan de la actividad de los microorganismos utilizados.

55 El término "yogur", por su parte, está reservado a la leche fermentada obtenida, según los usos locales y constantes, mediante el desarrollo de bacterias lácticas termófilas específicas denominadas *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que deben encontrarse vivas en el producto acabado, a razón de al menos 10 millones de bacterias por gramo con respecto a la parte láctea.

60 En algunos países, la reglamentación permite la adición de otras bacterias lácticas en la producción de yogur, y en particular la utilización adicional de cepas de *Bifidobacterium* y/o de *Lactobacillus acidophilus* y/o de *Lactobacillus casei*.

Estas cepas lácticas adicionales están destinadas a conferir al producto acabado diversas propiedades, tales como la propiedad de favorecer el equilibrio de la flora intestinal, o de modular el sistema inmunitario.

65 En la práctica, el término "leche fermentada" es por lo tanto generalmente utilizado para designar las leches

fermentadas diferentes de los yogures, y puede tomar, según los países, el nombre de «Kefir», «Kumiss», «Lassi», «Dahi», «Leben», «Filmjôlk», «Villi», «Acidophilusmilk» por ejemplo.

5 La cantidad de ácido láctico libre contenida en el sustrato lácteo fermentado no debe ser inferior a 0,6 g por 100 g durante la venta al consumidor, y el contenido en materia proteica aportada a la parte láctea no debe ser inferior a la de una leche normal.

10 La denominación "queso blanco" o "petit-suisse" está aquí reservada a un queso no madurado, no salado, que ha sufrido una fermentación por unas bacterias lácticas únicamente (y ninguna otra fermentación que la fermentación láctica).

15 El contenido en materia seca de los quesos blancos puede ser reducida hasta 15 g o 10 g por 100 g de queso blanco, según si su contenido en materia grasa es un 25% superior a 20 g, o como máximo igual a 20 g, por 100 g de queso blanco, después de una desecación completa. El contenido en materia seca de un queso blanco está comprendido entre el 13 y el 20%. El contenido en materia seca de un "petit-suisse", por su parte, no es inferior a 23 g por 100 g de "petit-suisse". Está generalmente comprendida entre el 25 y el 30%. Los quesos blancos y "petit-suisse" son generalmente agrupados bajo la denominación de "quesos frescos" utilizada de manera habitual en el campo técnico de la presente invención.

20 Por zumo vegetal, se entiende designar, según la presente invención, unos zumos de frutas o zumos de verduras, o zumos de frutas o de verduras reconstituidas, a base de concentrado, o unos zumos extraídos de soja, tonyu, arroz, avena, quinoa, castaña, almendra o avellana.

25 Las frutas preferidas según la presente invención son: pera, fresa, melocotón, piña, uva, manzana, albaricoque, naranja, plátano, mango, guindas, cereza (dulce), ciruela, ciruela pasa, mora, arándano, frambuesa, pomelo, guayaba, kiwi, fruta de la pasión, papaya, limón, membrillo, baya de escaramujo, litchi, granada, o melón.

De manera preferida, el zumo vegetal es un zumo de frutas.

30 Por gustos falsos, se entiende un gusto anormal para el producto alimenticio. Un gusto falso es desagradable para el consumidor y por lo tanto no deseado. Así, a título de ejemplo, se pueden citar para los productos alimenticios fabricados con la ayuda del procedimiento según la presente invención, el gusto falso de tipo "terroso-heno" por medio de la fermentación y la oxidación del producto, de tipo "vinagre" o de tipo "fenólico, ahumado, guantes, medicinal, etc." por medio del fermento a partir de ácidos orgánicos presentes en el producto, y de tipo "rancio" a través de la presencia de ácidos grasos volátiles.

El gusto falso de tipo "terroso-heno" es la consecuencia de la presencia de compuestos tales como el alfa-terpineol, la acetoina, el inalool, el 4-etilfenl.

40 El gusto falso de tipo "vinagre" es la consecuencia de la presencia de ácido acético.

Los gustos falsos de tipo "fenólico, ahumado, guantes, medicinal, etc." son la consecuencia de la presencia de compuestos tales como el 3-metoxi-4-hidroxiestireno (4-vinilguayacol) y el 4-hidroxiestireno (4-vinilfenol).

45 El gusto falso de tipo "rancio" es la consecuencia de la presencia de compuestos tales como el ácido benzoico, la 2-nonanona, el ácido decanoico, el ácido octanoico, el ácido dodecanoico.

50 En el sentido de la presente invención, unos probióticos que producen gustos falsos son unos probióticos que, por su metabolismo, serán responsables, directa o indirectamente, de la presencia de uno o varios de estos compuestos seleccionados entre el alfa-terpineol, la acetoina, el inalool, el 4-E-fenol, el ácido acético, el 3-metoxi-4-hidroxiestireno (4-vinilguayacol) y el 4-hidroxiestireno (4-vinilfenol), el ácido benzoico, la 2-nonanona, el ácido decanoico, el ácido octanoico, el ácido dodecanoico.

55 Unas notas denominadas "positivas" pueden también ser detectadas en el producto, tales como, por ejemplo, unas notas de tipo "naranja" o "afrutado". Estos gustos no son desagradables para el consumidor, por lo tanto no están comprendidos en los "gustos falsos" según la presente invención.

60 El contenido de moléculas responsables de "gustos falsos" se mide por microextracción en fase sólida (SPME) asociada a un cromatógrafo en fase gaseosa (CPG) acoplado a un espectrómetro de masa (SM). Este procedimiento se ha desarrollado específicamente y posee una sensibilidad incrementada, teniendo al mismo tiempo una buena reproductibilidad y una buena repetibilidad. La SPME permite una concentración específica de las moléculas volátiles dianas para una mejor cuantificación y una mejor identificación. La CPG permite la separación de las moléculas volátiles según su polaridad y su masa molar y así obtener unos picos que corresponden a cada molécula. El contenido de cada molécula se expresa en el área del pico, es decir en unidad de absorbancia (UA) proporcional a su concentración en la muestra. Finalmente, el espectrómetro de masa permite por un lado una cierta identificación de cada molécula a través de su fragmentación en iones característicos y, por otro lado, una segunda

cuantificación de las moléculas volátiles en la que el contenido está, esta vez, expresado en unidad de masa.

Así, un procedimiento para identificar un probiótico que produce gustos falsos en la matriz inicial del producto alimenticio comprende las etapas siguientes:

- 5 a) seleccionar la matriz inicial de interés para el producto alimenticio (por ejemplo leche y/o zumo vegetal)
- b) añadir a esta matriz inicial 10^8 UFC/ml del probiótico a ensayar
- 10 c) envasar el producto obtenido en la etapa b) (tetabrik de cartón de tipo tetabrik de leche, botella de plástico, etc.)
- 15 d) después de 35 días, medir la presencia y/o el contenido de moléculas responsables de "gustos falsos" buscados, por ejemplo el 3-metoxi-4-hidroxiestireno (4-vinil-guayacol) y el 4-hidroxiestireno (4-vinilfenol) (o uno de los compuestos citados anteriormente) por microextracción en fase sólida (SPME) asociada a un cromatógrafo en fase gaseosa (CPG) acoplado a un espectrómetro de masa (SM), tal como se ha definido anteriormente,
- 20 e) de manera opcional, hacer probar el producto por un grupo de expertos en análisis sensorial que atribuirá una nota entre 0 y 3, siendo 0 la nota para "ninguna presencia de gusto falso en el producto probado" y 3 la nota para "presencia de un gusto falso muy fuerte", sólo los productos que tienen una nota comprendida entre 0 y 1 son aceptables organolépticamente,
- 25 f) identificar los probióticos que producen gustos falsos en la matriz inicial del producto alimenticio como los añadidos en los productos alimenticios para los cuales se mide en la etapa d) una presencia de moléculas responsables de "gustos falsos" buscados, en particular el 3-metoxi-4-hidroxiestireno (4-vinil-guayacol) y el 4-hidroxiestireno (4-vinilfenol) (o uno de los compuestos citados anteriormente) y/o los que tienen una nota media comprendida entre 1 y 3 en el ensayo del grupo de expertos en análisis sensorial de la etapa e).

30 Por gas, se entiende designar preferentemente, según la presente invención el CO_2 .

Del mismo modo que para identificar un probiótico que produce gustos falsos, para identificar un probiótico que produce un gas en la matriz inicial del producto alimenticio se utiliza un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- 35 a) seleccionar la matriz inicial de interés para el producto alimenticio (por ejemplo leche y/o zumo vegetal)
- b) añadir a esta matriz inicial 10^8 UFC/ml del probiótico a ensayar
- 40 c) envasar el producto obtenido en la etapa b) en un envase deformable (tetabrik de cartón tipo tetabrik de leche, botella de plástico, tarro de yogur, etc.)
- d) después de 35 días, medir la presión en el envase
- 45 e) de manera opcional, hacer probar el producto por un grupo de expertos que conocen bien este tipo de producto que atribuirá una nota entre 0 y 5, siendo 0 la nota para "ninguna presencia de deformación del envase" y 5 la nota para "deformación máxima del envase", siendo aceptables sólo los productos que tengan una nota comprendida entre 0 y 1,
- 50 f) identificar los probióticos que producen gas en la matriz inicial del producto alimenticio como los añadidos en los productos alimenticios para los cuales se mide en la etapa d) una presión en el envase y/o los que tienen una nota comprendida entre 1 y 5 en el ensayo del grupo de expertos que conocen bien este tipo de producto de la etapa e).

55 Se describe a continuación un procedimiento de medición de presión tal como el utilizado en la etapa d):

Después de la inoculación de *L. plantarum* con fuerte concentración (10^8 UFC/ml) de un zumo de frutas (zumo de naranja por ejemplo), durante la conservación del producto en unos envases flexibles herméticamente cerrados por una tapa flexible (por ejemplo: tarro de yogur, botella de cartón, etc.), se puede detectar una liberación gaseosa. Esta puede por ejemplo estar caracterizada por unas mediciones reológicas (medición de la resistencia de la tapa al aplastamiento por una fuerza longitudinal) o unas mediciones de presión pinchando directamente a través de la tapa con una jeringa acoplada a un manómetro.

65 Por aromas, se entiende designar, en el sentido de la presente invención, unos ingredientes destinados a dar un sabor (es decir un gusto y/o un olor) a un producto alimenticio.

Las aromas se utilizan con dos objetivos tecnológicos principales:

- o bien refuerzan el sabor natural del producto alimenticio, o lo restituyen parcialmente si es demasiado débil (productos que han perdido una parte de su gusto durante el procedimiento de fabricación),
- o bien sustituyen un ingrediente que aporta una nota aromática al producto acabado (por ejemplo: yogur con aroma a fresa).

Según la presente invención, los aromas preferidos son: manzana, naranja, frutos rojos, fresa, melocotón, albaricoque, ciruela, frambuesa, mora, grosella, limón, cítricos, pomelo, plátano, piña, kiwi, pera, cereza, coco, frutos de la pasión, mango, higo, ruibarbo, melón, multifrutas, frutas exóticas, vainilla, chocolate, café, capuchino.

Por colorantes, se entienden unas sustancias capaces de aportar al producto alimenticio, de reforzar o conferir una coloración.

Según la presente invención, los colorantes preferidos son: el beta-caroteno, el carmín.

Por edulcorante, se entienden unas sustancias capaces de imitar el poder endulzante del azúcar sin aportar por ello las calorías del azúcar.

Según la presente invención, los edulcorantes preferidos son: aspartamo, acesulfamo K, sacarina, sucralosa y ciclamato.

Por agentes anti-oxígeno, se entienden unas sustancias capaces de evitar o reducir los fenómenos de oxidación que provocan, entre otros, la rancidez de las materias grasas o el oscurecimiento de las frutas y verduras cortadas.

Según la presente invención, los agentes anti-oxígeno preferidos son: vitamina E, extracto de romero.

Por leche, se entiende la leche de origen animal (por ejemplo vaca, cabra, oveja) o las leches reconstituidas a partir de ingredientes lácteos.

Por conservantes, se entienden unas sustancias destinadas a ayudar a la conservación impidiendo la presencia y el desarrollo de microorganismos indeseables (por ejemplo: mohos o bacterias responsables de intoxicaciones alimentarias) en el producto alimenticio final.

Según la presente invención, los conservantes preferidos son el ácido sórbico, el ácido ascórbico y el anhídrido sulfuroso.

Por agentes de textura, se entienden unas sustancias que permiten mejorar la presentación o la resistencia del producto alimenticio final. Los agentes de textura pueden ser unos emulsionantes, unos estabilizantes, unos espesantes, o unos gelificantes. Pueden ser utilizados en el producto alimenticio según la presente invención solos o en combinación.

Según la presente invención, los agentes de textura preferidos son: la pectina, la semilla de algarrobo, los carragenanos, los alginatos, la goma guar, la goma de xantana, el almidón, los mono- y diglicéridos de ácidos grasos alimentarios.

Por agua, se entiende de manera opcional el agua osmotizada. El agua osmotizada permite limitar la cantidad de minerales presentes en el producto final, pudiendo los minerales ser responsables también de gustos falsos.

El potasio, el cloro, el magnesio y el calcio son, en efecto, bastante amargos en diferentes formas (KCl, NH₄Cl, CaCl₂, acetato de Ca, LiCl, MgSO₄, etc.) mientras que el sodio, el litio y el sulfato son más bien salados y/o ácidos según la forma en la que se encuentran (forma salada: NaCl, Na₂SO₄, tartrato de Na; forma ácida: Na₂NO₃, acetato de Li; forma salada y ácida: acetato de Na, ascorbato de Na, citrato de Na). Además de estos efectos directos sobre las cualidades sensoriales de los productos, estos compuestos pueden también tener un efecto "salting out" sobre las moléculas volátiles responsables de gustos falsos de tipo "ahumado, fenólico, etc." favoreciendo su paso en fase vapor por encima del producto, aumentando así la intensidad de los gustos falsos percibidos.

De manera preferida según la invención, el producto alimenticio comprende entre 5 y 20 g/l de ácido láctico como monoácido débil alimentario, todavía más preferentemente de 10 a 20 g/l.

Por monoácido débil alimentario, se entiende designar según la presente invención un monoácido débil apto para ser consumido. Se trata aquí del ácido láctico.

Por monoácido débil protonado, se entiende designar según la presente invención un monoácido débil cuya función ácida no ha cedido su protón H⁺.

Un ácido débil es un ácido que no se disocia totalmente en agua: cuando un ácido débil AH se pone en presencia de agua, tiene lugar la reacción siguiente: $AH + H_2O \rightleftharpoons A^- + H_3O^+$. La reacción no es total pero equilibrada.

5 Un ácido débil, después de ceder un protón H^+ , se transforma en una base débil.

Un monoácido es un ácido que comprende solamente una única función ácida.

10 El monoácido débil en forma protonada puede estar presente naturalmente en la matriz inicial del producto alimenticio, o añadido en la matriz inicial del producto alimenticio mediante un procedimiento según la presente invención.

15 El interés de utilizar unos monoácidos débiles en forma protonada está relacionado con su actividad antibacteriana que depende de su capacidad para reducir el pH y de su capacidad para liberar un protón. Esta última capacidad está en función del pH del medio así como del valor pKa del ácido considerado, que es aquí el ácido láctico. Cuando están en forma protonada, los monoácidos débiles son liposolubles y tienen así la capacidad de entrar en las células microbianas. Una vez en el interior de las células, estos monoácidos débiles se encuentran en un medio más alcalino; de este modo, liberan su protón e inducen una disminución del pH intracelular. Esta modificación influye en el metabolismo bacteriano, en particular inhibiendo numerosas actividades enzimáticas y forzando a la bacteria a utilizar su energía expulsando los protones. Este fenómeno es la primera razón de la disminución de la actividad bacteriana. Además, Russel (1992) propone también una explicación suplementaria basada en la acumulación intracelular de aniones consiguiente al primer fenómeno (Russell, J. B. 1992. A review: another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. J. Appl. Bacteriol. 73:363-370).

25 El producto alimenticio fresco fabricado con la ayuda del procedimiento según la presente invención contiene preferentemente hasta 7,5 g/l de ácido láctico como monoácido débil alimentario, sea cual sea la forma (protonada o no).

30 De manera preferida, el pH del producto alimenticio está comprendido entre 3,4 y 3,7.

De manera preferida, los valores de pH mencionados según la presente invención son para un producto alimenticio antes del envasado o al final de su fabricación. En efecto, se puede observar en ciertos casos, y para unos productos específicos tales como los yogures, una acidificación del producto alimenticio envasado durante su conservación. Este fenómeno se denomina post-acidificación (acidificación específica de la conservación del producto).

35 Así, por ejemplo, un producto alimenticio fresco al final de su fabricación, y antes del envasado que presenta un pH de 4,5 puede, después del envasado, y tras 30 días de conservación (preferentemente entre 4 y 10°C), presentar un pH de 3,9 debido a la post-acidificación.

40 En particular, el producto alimenticio fresco está compuesto de un 80% de agua. De manera preferida, este producto alimenticio puede ser una bebida, preferentemente a base de zumo de frutas, de zumo de frutas reconstituidas a base de concentrado y/o de leche.

45 Según la presente invención, se puede citar como zumo de frutas, unos zumos de naranja y en particular el NFC (del inglés "Not From Concentrate") 10-12° Brix y como zumo de naranja reconstituido a base de concentrado el FCOJ (del inglés "Frozen Concentrate Orange Juice") a 66° Brix y los otros zumos de frutas concentrados entre 10 y 70° Brix.

50 Según la presente invención, el producto alimenticio comprende entre un 20 y un 99,99% de zumo de frutas, preferentemente entre un 50 y un 99,99% de zumo de frutas.

55 Según la presente invención, los probióticos vivos comprendidos en el producto alimenticio que producen gustos falsos y/o gas en la matriz inicial del producto alimenticio son unos probióticos que degradan unos ácidos orgánicos seleccionados del grupo que comprende: el ácido málico, el ácido cítrico, el ácido tártrico, el ácido pirúvico, el ácido fumárico, y el ácido glucónico.

Más particularmente, estos probióticos tienen la capacidad de degradar estos ácidos orgánicos en CO_2 y/o en compuestos que generan gustos falsos.

60 Todavía más particularmente, estos ácidos orgánicos están contenidos en la matriz inicial del producto alimenticio.

65 Por ácidos orgánicos, se entiende designar, según la presente invención, en particular el ácido málico, el ácido cítrico, el ácido tártrico, el ácido pirúvico, el ácido fumárico o el ácido glucónico.

Un procedimiento de identificación de las cepas que degradan unos ácidos orgánicos puede ser tal como se muestra

en el ejemplo 1.

La presente invención tiene por lo tanto por objeto un procedimiento de fabricación de un producto alimenticio tal como se ha descrito anteriormente, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- a) la adición de 1 a 50 g/l de ácido láctico como monoácido débil alimentario en la matriz inicial del producto alimenticio;
- b) la medición del pH del producto obtenido en la etapa a);
- c) el ajuste del pH del producto obtenido en la etapa b) a un pH diana comprendido entre 3 y 4, preferentemente comprendido entre 3,4 y 4, por adición de un ácido alimentario más fuerte que el monoácido débil alimentario añadido en la etapa a) si el pH medido en la etapa b) es superior al pH diana o adición de una base alimentaria si el pH medido en la etapa b) es inferior al pH diana; y
- d) la adición de probióticos vivos al producto obtenido en la etapa c),

de manera que dicho producto alimenticio:

contenga de 1 a 20 g/l de ácido láctico protonado [HA] al final de su fabricación, tal como se calcula por la ecuación siguiente:

$$[HA] = [HA]_{Tot} / (1 + 10^{pH-3,86})$$

en la que [HA] representa la concentración de monoácido débil protonado alimentario y $[HA]_{Tot}$ representa la concentración de monoácido débil alimentario, en forma protonada y no protonada,

a un pH comprendido entre 3 y 4, y

se conserva a una temperatura comprendida entre 0 y 15°C, preferentemente entre 4 y 10°C.

Según el procedimiento de la presente invención, en la etapa d) se añaden entre $5 \cdot 10^5$ y 10^9 UFC/ml de probióticos vivos, preferentemente entre $0,5 \cdot 10^8$ y $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml de probióticos vivos, más preferentemente 10^8 UFC/ml.

De manera preferida según la invención, se añade en la etapa a) entre 5 y 50 g/l de ácido láctico como monoácido débil alimentario.

Por monoácido débil alimentario, se entiende designar, según la presente invención, un monoácido débil apto para ser consumido. Se trata aquí del ácido láctico.

El producto alimenticio fabricado con la ayuda del procedimiento según la presente invención comprende ácido láctico en forma protonada. El porcentaje de forma protonada en una cantidad dada de ácido láctico como monoácido débil depende del pH del producto en el que se encuentra.

De manera general, la concentración de ácido láctico como monoácido débil en estado protonado está correlacionada con el valor del pH, según la fórmula siguiente:

$$pH = pKa + \log_{10} [A^-] / [HA],$$

en la que

[A⁻] es la concentración de la base y [HA] la concentración de la forma protonada del ácido conjugado.

Estas concentraciones se pueden medir fácilmente por un experto en la materia, mediante técnicas de rutina (por ejemplo por HPLC).

Así, por ejemplo, para obtener 1 g/l de ácido láctico protonado, se necesitan inicialmente:

- 1,1 g/l (13 mmoles/l) de ácido láctico a pH 3,
- 2,4 g/l (26 mmoles/l) de ácido láctico a pH 4.

De este modo, en el procedimiento según la presente invención, para obtener un producto alimenticio que comprende entre 1 y 20 g/l, preferentemente más de 2,2 g/l y hasta 20 g/l de ácido láctico protonado, se necesitará

añadir a la matriz inicial del producto alimenticio una cantidad de ácido láctico superior o igual a la cantidad de ácido láctico protonado deseada en el producto alimenticio, es decir entre 1 y 50 g/l de ácido láctico como monoácido débil.

5 En efecto, por ejemplo, para obtener 20 g/l (222 mmoles/l) de ácido láctico protonado, se necesitan inicialmente:

- 23 g/l (253 mmoles/l) de ácido láctico a pH 3,

- 47 g/l (529 mmoles/l) de ácido láctico a pH 4.

10 Por ácido alimentario, se entiende designar, según la presente invención, un ácido apto para ser consumido. Según la presente invención, y de manera preferida, el ácido alimentario es un ácido orgánico, preferentemente un ácido seleccionado entre el ácido ortofosfórico, el ácido cítrico, en particular el ácido cítrico monohidratado, el ácido ascórbico y el ácido málico o sus mezclas. De manera más preferida, el ácido alimentario seleccionado es el ácido ortofosfórico. Estos ácidos son, por supuesto, todos "food grade".

15 Por base alimentaria, se entiende designar según la presente invención una base apta para ser consumida. Según la presente invención y de manera preferida, la base alimentaria se selecciona entre NaOH, y unas sales, más particularmente seleccionadas entre el citrato de amonio, el citrato de calcio, el citrato de sodio, las sales de potasio, el tricalcio dicitrato, y el tampón fosfato.

20 Según la presente invención, el pH diana es preferentemente superior a 3,4 y va hasta 4, con unos valores más preferidos comprendidos entre 3,4 y 3,7. Según la presente invención, es aceptable un margen de error del pH con respecto al pH diana de 0,1.

25 Ejemplos

Ejemplo 1: Formación de gas por las cepas *L. plantarum* DSM 9843 y *L. plantarum* I-2845 (depositada en la CNCM el 4/04/02) en función del zumo de frutas inoculado.

30 I- Material y procedimientos

1.1. Preparación de las suspensiones bacterianas e inoculación de los zumos de frutas

35 Se realiza un primer precultivo de 2 ml con las cepas DSM 9844 y I-2845. Este precultivo sirve para cultivar al 1% 100 ml de MRS neutro (es decir 10^8 - 10^9 ufc/ml). A partir de este segundo precultivo se cultivan 3x 1 000 ml de MRS neutro (es decir 10^8 - 10^9 ufc/ml).

40 Para cada cepa, las centrifugaciones (Beckman JA-25, rotor JA-10) se han realizado con los botes de 500 ml de la siguiente manera:

- rellenado de 6 botes con 330 ml de cultivo
- centrifugación de 10 minutos, 12000 g, 20°C
- 45 - eliminación del sobrenadante y adición de 165 ml de cultivo
- centrifugación de 10 minutos, 12000 g, 20°C
- 50 - eliminación del sobrenadante.

Cada residuo obtenido se recoge después separadamente en el zumo de fruta a probar y la suspensión obtenida se reinserta en el tetrabrik de zumo de frutas que se cierra cuidadosamente después.

55 1.2. Ensayos de los ácidos orgánicos.

La técnica elegida consiste en separar los ácidos orgánicos por cromatografía de intercambios de aniones de alto rendimiento (HPAEC). La detección de los ácidos orgánicos se realiza por conductimetría supresora (SCD).

60 El sistema cromatográfico utilizado es de la marca DIONEX (tipo DX600) que comprende un sistema de detección por conductometría supresora. La célula de conductimetría termostataada (tipo DS3) se acopla a un sistema de auto-supresión externo ASRS-ULTRA (4 mm). Este supresor electrolítico se ha utilizado con un modo de recirculación de agua Milli-Q a contracorriente, a un caudal de 4 ml/min (presión de 15 psi aproximadamente).

65 Una columna de intercambio de aniones de tipo AS11-HC (4mm) está asociada a una columna de seguridad de tipo AG11-HC. El caudal de elución es de 1,5 ml/min.

II. Resultados:

II.1. Recuentos bacterianos

Se realizan unos recuentos bacterianos durante la conservación de los productos a fin de evaluar la supervivencia de *L. plantarum* en las matrices de zumo de frutas.

Tabla 1: recuentos bacterianos de *L. plantarum* durante la conservación a 10°C de las matrices de zumos de frutas.

Cepa	Tiempo (d)	Naranja	Manzana	Uva
DSM 9843	D0	1,8.10 ⁹ ufc/ml	1,7.10 ⁹ ufc/ml	9,5.10 ⁸ ufc/ml
	D5	5,0.10 ⁹ ufc/ml	5,8.10 ⁸ ufc/ml	4,1.10 ⁹ ufc/ml
1-2845	D0	1,1.10 ⁹ ufc/ml	9,8.10 ⁸ ufc/ml	6,0.10 ⁹ ufc/ml
	D5	4,5.10 ⁹ ufc/ml	1,6.10 ⁹ ufc/ml	3,9.10 ⁹ ufc/ml

II.2. Puesta en evidencia del consumo de ácidos orgánicos durante el almacenamiento.

Los ensayos de los ácidos orgánicos se han realizado a 0 y 5 días en el mismo momento que los recuentos, y los resultados son sintetizados en la tabla 1.

Tabla 2: metabolitos producidos y ácidos orgánicos consumidos durante la conservación a 10°C de zumo de frutas que contienen *L. plantarum*.

	Lotes	Hinchamiento de la botella	pH	Lactato producido	Acetato producido	Malato consumido	Citrato consumido
				mmol	mmol	mmol	mmol
Zumo de manzana	Control	D0	-	3,43	0,00	0,00	0,00
	+ DSM 9843	D5	++	3,38	27,93	4,44	6,72
	+ I-2845	D5	++	3,39	40,86	4,38	21,20
Zumo de naranja	Control	D0	-	3,34	0,00	0,00	0,00
	+ DSM 9843	D5	+++	3,26	53,79	25,78	11,99
	+ I-2845	D5	++	3,27	48,90	15,60	13,26
Zumo de uva	Control	D0	-	3,22	0,00	0,00	0,00
	+ DSM 9843	D5	++	3,23	40,79	10,38	23,50
	+ I-2845	D5	+++	3,24	44,59	8,16	33,87

Según los resultados presentados en la tabla 2, se muestra claramente que el ácido málico es el sustrato más consumido por *L. plantarum*, sea cual sea la cepa considerada. Este consumo se acompaña no sólo de producciones de lactato y de acetato y por lo tanto de una caída sustancial del pH (en particular en los zumos de naranja y de manzana), sino también de una producción de gas que tiene un efecto macroscópico sobre el envase.

Según las vías metabólicas presentadas en la figura 1, la ausencia de detección de formiato producido (ninguna acción del piruvato formiato liasa), el contenido muy bajo en pentosas de los zumos de frutas tratados, el resultado de producción de CO₂ (expresado en moles) siguiente puede ser propuesto:

$$\text{CO}_2 \text{ total} = \text{malato consumido} + \text{citrato consumido} + (\text{acetato total producido} - \text{acetato procedente del citrato})$$

Por lo tanto, sustituyendo el acetato producido a partir del citrato por la cantidad de citrato consumido:

$$\text{CO}_2 \text{ total} = \text{malato consumido} + \text{acetato total producido}$$

Conclusión:

El ácido málico y, en una menor medida, el ácido cítrico contribuyen por lo tanto en gran medida a la producción de gas durante la conservación a 10°C de zumos de frutas que contiene una dosis elevada (> 1.10⁹ ufc/ml) de bacteria *L. plantarum* DSM 9843 o I-2845.

Ejemplo 2:

Objetivo: demostrar que sólo el impacto del pH no permite disminuir la actividad de *L. plantarum* utilizado en un zumo de fruta.

5 Un zumo de naranja diluido al 20% se inocula para alcanzar una población inicial de 1.10^8 ufc/ml. Se añaden diferentes ácidos así como unas mezclas de ácidos para situarse en un intervalo de pH comprendido entre 3,3 y 3,4.

10 Después del envasado en tarros de yogur herméticamente sellados por una tapa de "aluminio", los tarros se conservan a 10°C y se realiza el seguimiento del hinchamiento (la producción de CO₂ permitiendo una visualización macroscópica de la actividad bacteriana).

Tabla 3:

Tipo de ácido	Porcentaje en el producto terminado para pH=3,3	pH	Contenido en monoácido débil protonado (g/l)	Hinchamiento visibles de los productos conservados a +10°C
Ácido málico	Csp	3,37	/	D+7
Ácido cítrico	Csp	3,38	/	D+7
Ácido láctico	0,40%	3,40	3,0	D+30*
Ácido ortofosfórico	Csp	3,30	/	D+7
Ácido láctico/ ácido cítrico	0,30% / 0,15%	3,40	2,2	D+8
Ácido láctico / ácido cítrico	0,40% / 0,15%	3,30	3,1	D+15*
Acido láctico / citrato de sodio	0,40% / 0,06%	3,30	3,1	no a D+7*
Ácido láctico	0,50%	3,30	3,9	no a D+7*

*: percepción organoléptica no aceptable por los consumidores.

15 Durante la conservación a 10°C, para un mismo pH (3,37-3,40), las cinéticas de hinchamiento son más rápidas si el pH es alcanzado añadiendo unos ácidos málicos y cítricos. Por el contrario, la presencia de ácido láctico permite impedir este hinchamiento. Sin embargo, la disminución del pH del producto a valores próximos a 3,3 por el ácido láctico (por ejemplo un 0,4-0,5%), en asociación o no con el ácido cítrico o citrato de sodio, no es aceptable por el consumidor, ya que el impacto organoléptico negativo del ácido láctico es muy importante (percepción muy ácida, picante, etc.).

20 El pH no es el factor palanca para reducir la actividad metabólica de *L. plantarum*, pero teniendo el ácido láctico un cierto efecto, el impacto de la disociación pH/acidez se ha probado en el ejemplo 3.

Ejemplo 3:

Objetivo: definir el par contenido en ácido láctico/pH que permite reducir la actividad metabólica conservando al mismo tiempo una población bacteriana importante ($> 10^8$ ufc/ml).

Matriz: zumo de naranja con un 100% de zumo puro (pH original = 3,6).

35 Adición del ácido láctico y después, si es necesario, ajustar el pH por adición de sosa a fin de alcanzar el valor diana.

Inoculación: 0,015% de cepa *L. plantarum* DSM 9843 a $1,4.10^{11}$ ufc/ml en 100 ml de zumo de naranja.

Tabla 4:

Ensayo n°	1	2	3	4*	5*	6	7	8	9	10
pH	3,5	4,5	4	4	4	3,6	4,5	4	4,5	3,5
[ácido láctico] (g/l)	10	0	0	5	5	0	5	10	10	5
Contenido en monoácido débil protonado (g/l)	7	0	0	2,1	2,1	0	0,9	4,2	1,8	3,5

*: repeticiones de las mismas condiciones.

40 Poblaciones bacterianas iniciales: $2,5.10^8$ ufc/ml

Poblaciones bacterianas en el D+21:

45 Ensayo n°1: 2.10^6 ufc/ml

Ensayo n°6: $6 \cdot 10^7$ ufc/ml => muy malas cualidades organolépticas.

Ensayo n°8: $4 \cdot 10^7$ ufc/ml

Ensayo n°10: $4,5 \cdot 10^7$ ufc/ml

5

10

Sea cual sea el pH inicial, los productos que no contienen ácido láctico (ensayos n° 2, 3 y 6) se han hinchado todos a partir del D+7. En esa misma fecha, el ensayo a pH elevado y bajo contenido en ácido láctico (ensayo n° 7) se ha hinchado ligeramente. Ningún otro ensayo se ha hinchado. Este resultado confirma una vez más que el pH sólo no tiene influencia sobre la actividad metabólica de *L. plantarum*.

15

A D+21, los ensayos 1, 4, 5, 8, 9 y 10 no se han hinchado. Para el ensayo n° 1, esta ausencia de hinchamiento está relacionada con la baja supervivencia bacteriana (disminución de un factor 100 de la población bacteriana). Sin embargo, en el caso de los demás ensayos, la ausencia de hinchamiento es concomitante a una buena supervivencia de las bacterias (población todavía superior a $4 \cdot 10^7$ ufc/ml). Esto permite poner en evidencia la importancia de la elección del par "pH / concentración en ácido láctico".

20

Del conjunto de estos ensayos, se ha podido definir un par pH/contenido en ácido láctico diana a fin de disminuir la actividad metabólica de *L. plantarum* (véase el ejemplo 4). La dosis de ácido láctico diana se ajustará por adición de ácido láctico molar y el pH se ajustará por el ácido ortofosfórico molar. En efecto, este último, utilizable en la industria agroalimentaria y eficaz para disminuir rápidamente el pH, no tiene ningún efecto sobre la disminución de la actividad metabólica (véase el ejemplo 2).

25

Ejemplo 4: primera aplicación sobre producto lácteo para beber con frutas.

El objetivo del ensayo es evaluar el impacto sobre la actividad de *L. plantarum* (población y gusto en el producto) de las condiciones siguientes:

30

- pH nominal del producto final o reducido a 3,9 y 3,7 por adición de ácido ortofosfórico,
- acidez láctica nominal del producto final o aumentada a 5,0 g/l por adición de ácido láctico.

35

1. Fórmula del producto:

Tabla 5:

Constituyentes	Porcentaje en masa (%)
Leche desnatada	56,91
Nata al 40% de materias grasas	2,50
Polvo de leche desnatada	0,38
Azúcar cristalizado	5,20
Fermentos lácticos de yogures	0,01
Preparación de frutas	15,00
Agua estéril + soluciones de ácidos esterilizados	20,00
TOTAL	100,00

40

2. Procedimientos de preparación:

Se realiza la mezcla de leche desnatada, nata, polvo de leche y azúcar, se pasteuriza y después se pone a fermentar a 38°C por adición de fermentos lácticos.

45

La fermentación se detiene a pH 4,60 por enfriamiento a 4°C.

La masa blanca obtenida se adiciona después de preparación de frutas, de soluciones de ácidos, de agua estéril y de *L. plantarum* congelado según la tabla presentada en el párrafo 3.

50

3. Detalles de los ensayos:

En la tabla siguiente, se detallan las características de las diferentes mezclas ensayadas para 1 kilogramo de producto final.

Tabla 6:

Número de la mezcla	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Cantidad de solución de ácido láctico molar añadida (ml)	0	0	0	4,33	4,33	4,33
Cantidad de solución de ácido fosfórico molar añadida (g)	0	13,8	24,3	0	12,1	21,0
pH del producto final	4,29	3,9	3,7	4,22	3,9	3,7
Acidez láctica del producto final	4,7	4,7	4,7	5,0	5,0	5,0
Contenido en monoácido débil protonado (g/l)	1,3	2,2	2,8	1,6	2,4	3,0
Cantidad de <i>L. plantarum</i> añadida (g)	1	1	1	1	1	1
Población inicial en <i>L. plantarum</i> (ufc/g)	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$

4. Evolución y evaluación de los productos durante su tiempo de vida.

5 En la tabla 7 siguiente, se detallan las características de las diferentes mezclas ensayadas durante su envejecimiento a una temperatura de almacenamiento de 10°C.

Tabla 7:

10

Número de la mezcla	M1	M2	M3	M4	M5	M6
pH D0	4,29	3,9	3,7	4,22	3,9	3,7
pH D+8 días	3,53	3,40	3,33	3,51	3,45	3,37
pH D+28 días	3,56	3,50	3,47	3,55	3,53	3,50
pH D+ 35 días	3,52	3,46	3,44	3,54	3,47	3,46
Población en <i>L. plantarum</i> inicial (ufc/g)	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$
Población en <i>L. plantarum</i> a D+21 días (ufc/g)	$21 \cdot 10^8$	$15 \cdot 10^8$	$11 \cdot 10^8$	$15 \cdot 10^8$	$8,8 \cdot 10^8$	$7,8 \cdot 10^8$
Evaluación visual del hinchamiento de los tarros a D+21 días Nota de 0=ausencia a 5=máx.	5	4	3	3	2	1
Evaluación del olor característico de la actividad del <i>L. plantarum</i> a D+21 Nota de 0=ausencia a 3= máx.	3	2	1	2	1	0,5
Evaluación del gusto característico de la actividad de <i>L. plantarum</i> a D+21 Nota de 0=ausencia a 3= máx.	3	2	1	2	1	0,5

5. Conclusiones:

15 Para una misma cantidad de ácido láctico, el crecimiento bacteriano de *L. plantarum* se reduce por una disminución del pH.

Para un mismo valor de pH, el crecimiento bacteriano de *L. plantarum* se reduce por un aumento del contenido en ácido láctico.

20 Como mínimo, este crecimiento bacteriano es de 0,8 log.

25 Para todas las condiciones de pH y de acidez láctica ensayadas, el pH del producto final a 35 días está comprendido entre 3,44 y 3,54. De este modo, puede ser interesante colocarse directamente en este rango de pH a partir de la fabricación del producto. Es lo que se ha ensayado en el ejemplo 5 con la comparación de los resultados obtenidos a pH 3,7 y 3,45.

Ejemplo 5: segunda aplicación sobre producto lácteo para beber con frutas.

30 Tras el ensayo descrito en el ejemplo 4, se ha realizado un nuevo ensayo a fin de evaluar el impacto sobre la actividad de *L. plantarum* (población y gusto en el producto) de las condiciones modificadas siguientes:

- pH del producto final disminuido a 3,7 y 3,45 por adición de ácido ortofosfórico,
- acidez láctica nominal (5,4 g/l) del producto final o aumentada a 7,5 g/l por adición de ácido láctico.

35

1. Fórmula del producto:

Tabla 8

Constituyentes	Porcentaje en masa (%)
Leche desnatada	54,76
Nata con un 40% de materias grasas	2,49
Polvo de leche desnatada	0,59
Azúcar cristalizado	7,15
Fermentos lácticos del yogur	0,01
Preparación de frutas	15,00
Agua estéril + soluciones de ácidos esterilizadas	20,00
TOTAL	100,00

5 La cantidad de azúcar del producto final se ha aumentado un 1,95% para compensar el impacto de la acidificación del producto sobre la organolepsia.

2. Procedimientos de preparación:

10 Se realiza la mezcla de leche desnatada, nata, polvo de leche y azúcar, se pasteuriza, y después se pone a fermentar a 38°C por adición de los fermentos lácticos.

15 La fermentación se detiene a pH 4,50 por enfriamiento a 4°C.

La masa blanca obtenida se adiciona después de preparación de frutas, de soluciones de ácidos, de agua estéril y de *L. plantarum* congelado según la tabla presentada en el párrafo 3.

3. Detalles de los ensayos:

20 En la tabla siguiente, se detallan las características de las diferentes mezclas ensayadas para 1 kilogramo de producto final.

Tabla 9:

Número de la mezcla	1'	2'	3'	4'
Cantidad de solución de ácido láctico molar añadida (ml)	0	23,85	0	23,85
Cantidad de solución de ácido fosfórico molar añadida (g)	23,33	10,83	34,67	23,5
pH del producto final	3,7	3,7	3,45	3,45
Acidez láctica del producto final (g/l)	5,4	7,5	5,4	7,5
Contenido en monoácido débil protonado (g/l)	3,2	4,4	3,9	5,4
Cantidad de <i>L. plantarum</i> añadida (g)	1	1	1	1
Población inicial de <i>L. plantarum</i> (ufc/g)	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$

4. Evolución y evaluación de los productos durante su tiempo de vida.

30 En la tabla siguiente, se detallan las características de las diferentes mezclas ensayadas durante su envejecimiento a una temperatura de almacenamiento de 10°C.

Tabla 10:

Número de la mezcla	1'	2'	3'	4'
pH D0	3,7	3,7	3,45	3,45
pH D+8 días	3,69	3,68	3,49	3,46
pH D+22 días	3,57	3,67	3,40	3,41
pH D+ 29 días	3,40	3,46	3,25	3,28
Población de <i>L. plantarum</i> inicial (ufc/g)	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$
Población de <i>L. plantarum</i> a D+22 días (ufc/g)	$1,2 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$0,8 \cdot 10^8$	$0,7 \cdot 10^8$
Población de <i>L. plantarum</i> a D+43 días (ufc/g)	$1,3 \cdot 10^8$	$0,7 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$
Evaluación visual del hinchamiento de los tarros a D+22 días Nota de 0=ausencia a 5=máx.	0	0	0	0
Evaluación del olor característico de la actividad de <i>L. plantarum</i> a D+22 Nota de 0=ausencia a 3= máx.	1	0,5	0	0
Evaluación del gusto característico de la actividad de <i>L. plantarum</i> a D+22 Nota de 0=ausencia a 3= máx.	1	1	3	0

5. Conclusiones:

5 La población en *L. plantarum* durante el envejecimiento del producto es estable (es decir entre $0,5 \cdot 10^8$ et $1,5 \cdot 10^8$ ufc/g) para un pH comprendido entre 3,45 y 3,7 y a un acidez láctica total comprendida entre 5,4 g/l y 7,5 g/l.

10 El olor característico de la actividad de *L. plantarum* no aparece a pH 3,45, sea cual sea la acidez láctica. Sin embargo, este olor está débilmente presente en los productos a pH 3,7 que permanecen muy aceptables desde el punto de vista del consumidor.

15 Se observa también que, cuando se disminuye el pH y se aumenta la acidez láctica del producto, se disminuye la supervivencia de los probióticos. De este modo, disminuir el pH por debajo de 3 y aumentar la acidez láctica (es decir, de manera más general, el contenido en monoácido débil sea cual sea su forma) por encima de 7,4 g/l induce una mortalidad bacteriana y así una no estabilidad del probiótico.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de fabricación de un producto alimenticio fresco, que comprende una concentración estable de probióticos vivos que producen gustos falsos y/o gas en la matriz inicial del producto alimenticio, estando dicho procedimiento caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

a) la adición de 1 a 50 g/l de ácido láctico como monoácido débil alimentario en dicha matriz inicial;

b) la medición del pH del producto obtenido en la etapa a);

c) el ajuste del pH del producto obtenido en la etapa b) a un pH diana comprendido entre 3 y 4, preferentemente comprendido entre 3,4 y 4, más preferentemente comprendido entre 3,4 y 3,7, por adición de un ácido alimentario más fuerte que el monoácido débil alimentario añadido en la etapa a) si el pH medido en la etapa b) es superior al pH diana, o la adición de una base alimentaria si el pH medido en la etapa b) es inferior al pH diana; y

d) la adición de probióticos vivos al producto obtenido en la etapa c),

de manera que dicho producto alimenticio:

contenga de 1 a 20 g/l de ácido láctico protonado [HA] al final de su fabricación tal como se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$[HA] = [HA]_{Tot} / (1 + 10^{pH - 3,86})$$

en la que [HA] representa la concentración de monoácido débil protonado alimentario y [HA]_{Tot} representa la concentración de monoácido débil alimentario, en forma protonada y no protonada,

a un pH comprendido entre 3 y 4, y

se conserva a una temperatura comprendida entre 0 y 15°C, preferentemente entre 4 y 10°C.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que en la etapa d), se añade una concentración de probióticos vivos superior a 10⁵ UFC/ml, preferentemente una concentración comprendida entre 0,5 10⁸ et 1,5 10⁸Ufc/ml.

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que el ácido alimentario se selecciona de entre ácido ortofosfórico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido málico y sus mezclas.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la base alimentaria se selecciona de entre NaOH, citrato de sodio, tricalcio dicitrato, un tampón fosfato y un tampón citrato.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dicho producto alimenticio es una bebida.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que dicha matriz inicial es un zumo vegetal, tal como zumo de frutas y/o leche.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que dichos probióticos son unas cepas bacterianas.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que las cepas bacterianas son del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, o sus mezclas.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que las cepas bacterianas son *Lactobacillus plantarum*, preferentemente unas cepas de *Lactobacillus plantarum* depositadas el 16/03/95 con el número DSM 9843 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen von Zellkulturen GmbH o unas cepas de *Lactobacillus plantarum* depositadas el 4/04/02 con el número CNCM I-2845 en la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado por que la concentración de bacterias en dicho producto alimenticio es superior a 10⁵ Ufc/ml, preferentemente superior a 0,5.10⁸Ufc/ml.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que en la etapa a), se añade entre 5 y 50 g/l de ácido láctico como monoácido débil alimentario.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que el producto alimenticio fresco contiene hasta 7,5 g/l de ácido láctico como monoácido débil alimentario.

- 5 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que el pH diana está comprendido entre 3,4 y 3,7.