

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 601 777**

(51) Int. Cl.:

A23G 1/42 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A23L 7/126 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2011 PCT/EP2011/053752**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11113771**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011 E 11707870 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2547214**

(54) Título: **Producto lácteo fermentado seco que contiene una densidad elevada de bifidobacterias vivas**

(30) Prioridad:

17.03.2010 WO PCT/IB2010/001192

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

16.02.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**TEISSIER, PHILIPPE;
REGULIER, PASCAL;
STRAKA, LUKAS;
COENEN, GERARDUS;
BUIJSSE, CARLA y
CREDOZ, YVES**

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 601 777 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 lácteo fermentado seco que contiene una densidad elevada de bifidobacterias vivas.

5 La presente invención pertenece al campo de la industria alimentaria, más específicamente la industria láctea.

La presente invención se refiere a un producto lácteo fermentado seco que contiene bifidobacterias vivas en una concentración mínima de 8×10^7 cfu/g.

10 La invención se refiere asimismo a un método para preparar dichos productos y a aplicaciones de dichos productos en la industria alimentaria.

15 Los probióticos y las composiciones comestibles que comprenden dichos probióticos se han convertido en muy populares para promover o mantener la salud en los mamíferos, incluido el ser humano. Generalmente, los probióticos son bacterias vivas, o fracciones activas de las mismas, que brindan un beneficio para la salud de un anfitrión cuando son consumidos.

20 Las composiciones alimenticias que comprenden probióticos viables tienden a presentar una baja estabilidad. Normalmente, las composiciones que contienen probióticos listas para usar se almacenan y distribuyen en condiciones de refrigeración, por lo que las composiciones son productos frescos. Alternativamente, se proporcionan concentrados alimenticios secos que contienen probióticos, los cuales se deben disolver de manera extemporánea en suspensiones para su consumo inmediato o se consumen directamente en forma de polvo o cápsula, a fin de asegurar que un porcentaje suficientemente alto de las células bacterianas contenidas allí sigan resultando viables hasta que se consuma el producto y con posterioridad.

25 Sin embargo, los concentrados bacterianos secos brindan sólo beneficios de estabilidad parciales. Un problema que presentan las composiciones secas que contienen probióticos se debe al nivel de agua disponible en las composiciones. De hecho, los niveles entre moderados y relativamente altos de agua en las composiciones secas proporcionadas hasta la fecha permiten que las bacterias contenidas en las mismas sigan metabolizándose durante el almacenamiento. Este metabolismo no deseado produce metabolitos ácidos y otros productos secundarios, así como la descomposición y la reducción de la viabilidad de las bacterias en sí. Esto confiere sabores desagradables a las composiciones y/o altera sus propiedades organolépticas en términos de color, textura y demás, y las composiciones resultantes finalmente son ineficaces o inadecuadas para el consumo.

35 En un intento por solucionar este problema, hasta el momento se han propuesto diversas soluciones.

40 La mayoría de estas soluciones se basan en la utilización de un medio de cultivo seco que contiene bacterias viables (ver, por ejemplo, la solicitud de patente US publicada con el nº 2005/0100559 el 12 de mayo de 2005). Las composiciones alimenticias finales se obtienen entonces añadiendo a una preparación alimenticia, un medio de cultivo que contiene bacterias, seco y preferentemente preconcentrado, o un concentrado bacteriano seco obtenido al separar la biomasa del medio de cultivo y secar la biomasa recuperada. Ninguna de estas composiciones alimenticias finales son productos fermentados, tales como leches o yogures fermentados. Y, en muchos casos, las composiciones obtenidas no resultan adecuadas para el consumo humano (en especial cuando se usan medios de cultivo).

45 Alternativamente, en la solicitud de patente internacional nº WO 2007/077401, publicada el 12 de julio de 2007, se proporciona una leche o yogur en polvo fermentado que contiene niveles muy altos de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, y que presenta ventajosas capacidades de almacenamiento. Este polvo, que muestra una interesante estabilidad y características microbiológicas y organolépticas, es adecuado para el uso de *S. thermophilus* y *L. Bulgaricus*. Sin embargo, el medio de cultivo y las condiciones de secado propuestas no se adaptan al uso de otro tipo de cepas bacterianas de ácido láctico. En particular, la viabilidad de las bifidobacterias se vería altamente obstaculizada en estas condiciones. El documento JP 2006280263 divulga un polvo de células microbianas de bifidobacteria viable y su utilización.

55 A pesar de estos avances, el almacenamiento prolongado de composiciones bacterianas secas, en particular composiciones secas que contienen bacterias de ácido láctico, está aún lejos de ser óptimo, en especial cuando se usan bacterias delicadas, tales como las bifidobacterias.

60 Este problema es abordado por primera vez por la presente invención, que proporciona una composición seca que contiene bifidobacterias que poseen excepcionales capacidades de almacenamiento y viabilidad. De hecho, como se muestra a continuación, los inventores fueron los primeros en la técnica en descubrir las condiciones apropiadas para generar un producto lácteo fermentado seco que contiene un alto nivel de bifidobacterias viables y que presenta una prolongada vida útil, dado que es conocido que las bifidobacterias son bacterias sensibles o delicadas, y su viabilidad depende en gran medida del pH y de la temperatura.

65 Es divulgado en la presente memoria un producto lácteo fermentado seco que contiene bifidobacterias vivas en una

concentración mínima de 8×10^7 cfu/g.

Un "producto lácteo fermentado seco" de acuerdo con la presente invención es comestible y adecuado para el consumo por parte de mamíferos, preferentemente para consumo humano. En particular, es divulgada en la presente memoria una leche fermentada seca comestible para consumo humano.

El término "leche fermentada" tiene el significado habitual que se le atribuye en la industria láctea, es decir, es un producto destinado al consumo por parte de un mamífero, más particularmente para consumo humano, y que procede de la fermentación láctica acidificante de un sustrato lácteo inicial o una mezcla láctea inicial. Dicho producto puede contener ingredientes secundarios, tales como frutas, vegetales, azúcares, saborizantes, etc. El término "leche fermentada" satisface guías oficiales estrictas. En este caso, se puede hacer referencia al Codex Alimentarius (preparado por la Comisión de Codex Alimentarius bajo el amparo del contenido de FAO y ODM, y publicado por la Information Division de la FAO, disponible on-line en <http://codexalimentarius.net>; ver, en particular, el volumen 12 del Codex Alimentarius, "Standards for milk and dairy products" y la norma "Codex Stan A-11(a)-1975", norma actualmente denominada Codex Stan 243-2003). En particular, se puede hacer referencia a la ley francesa nº 88-1203, del 30 de diciembre de 1988, sobre la leche fermentada y el yogur, publicada en el Official Journal of the French Republic el 31 de diciembre de 1988.

Debe apreciarse que (i) la coagulación de "leche fermentada" no se puede llevar a cabo por ningunos medios distintos del resultado de la actividad de las bacterias de ácido láctico utilizadas; (ii) una "leche fermentada" no ha sido sometida a ningún tratamiento que retire un elemento constituyente de la mezcla láctea utilizada, y en particular no se le ha extraído el coágulo; (iii) una "leche fermentada" se puede suplementar con uno o varios extractos saborizantes, uno o varios saborizantes naturales y, hasta un límite del 30% en peso del producto final, uno o varios azúcares y demás sustancias alimenticias que otorgan un gusto específico, por ejemplo, cereales; (iv) la incorporación de sustituyentes de grasas y/o proteínas de origen no lácteo no está permitida; (v) la cantidad de ácido láctico libre contenido en una leche fermentada no debe ser inferior a 0,6 gramos por cada 100 gramos en el punto de venta, y la cantidad de material proteico, expresada como la porción láctica, no debe ser inferior al de la leche normal.

30 Un producto "seco" según la presente invención es, por ejemplo, un producto en polvo o un producto granulado.

El producto divulgado en la presente memoria contiene bifidobacterias vivas en una concentración mínima de 8×10^7 cfu/g durante por lo menos 3 meses a temperatura ambiente.

35 Preferentemente, la actividad acuosa (a_w) del producto divulgado en la presente memoria es menos de 0,25. Alternativa o adicionalmente, el pH del producto según la presente invención es de 4,3 a 5,8, preferentemente de 4,6 a 5,3.

40 Preferentemente, el producto divulgado en la presente memoria es un "producto estable durante el almacenamiento", es decir, un producto que presenta propiedades estructurales y funcionales que no cambian ni varían significativamente durante un periodo de almacenamiento del producto de por lo menos 3 meses a temperatura ambiente. La "temperatura ambiente" es preferentemente de 15 a 25°C, incluso más preferentemente de 18°C a 23°C. El periodo de "3 meses a temperatura ambiente" por lo tanto corresponde al "periodo de almacenamiento mínimo" o a la "vida útil mínima" del producto. Se pueden tolerar cambios o variaciones mínimas 45 del producto durante el almacenamiento, siempre que se mantenga por lo menos la concentración mínima de bifidobacterias vivas durante el periodo de almacenamiento mínimo (dicho de otro modo, no se produce una significativa pérdida de viabilidad de las bifidobacterias durante el almacenamiento). En algunas formas de realización, se pueden conservar ventajosamente una o varias características adicionales del producto, como se divulga en la presente memoria: por ejemplo, la actividad acuosa a_w de menos de 0,25; el pH de 4,3 a 5,8; y/o el 50 contenido de materia seca, el contenido de proteína, el contenido de otras bacterias vivas de ácido láctico, tales como *L. Bulgaricus* y/o *S. thermophilus* y/o *Lactococcus lactis*, las propiedades organolépticas, etc. (para los detalles, ver a continuación).

55 El producto divulgado en la presente memoria no es un producto fresco que requiera ser almacenado en condiciones de refrigeración (por ejemplo, a 4°C).

60 A menos que se indique lo contrario, todas las concentraciones, contenidos o cantidades de bacterias se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo (cfu/g) del producto. Las concentraciones se expresan entonces por referencia a un producto que es el producto final u otro producto, tal como un producto de partida o un producto intermedio. El experto en la materia podrá identificar de manera clara y precisa el producto al que se hace referencia a partir de la presente descripción.

65 La "concentración bacteriana mínima" es el contenido bacteriano mínimo durante toda la vida útil mínima del producto seco. Se puede considerar como la "concentración bacteriana final", correspondiente a la concentración bacteriana del producto al final del periodo de almacenamiento mínimo. Preferentemente, la concentración mínima de bifidobacterias del producto de la presente invención es de 10^8 cfu/g, preferentemente $2,5 \times 10^8$ cfu/g, más

preferentemente 4×10^8 cfu/g, y todavía más preferentemente 5×10^8 cfu/g.

La "concentración bacteriana máxima" es el contenido bacteriano máximo durante toda la vida útil mínima del producto seco. Puede corresponder a la "concentración bacteriana inicial", es decir, la concentración bacteriana del producto inmediatamente después de ser elaborado, al comienzo del periodo de almacenamiento mínimo. Preferentemente, la concentración máxima de bifidobacterias del producto de la presente invención es de 5×10^9 cfu/g, preferentemente de $2,5 \times 10^9$ cfu/g, y todavía más preferentemente de 10^9 cfu/g. Puede ser importante no usar concentraciones de bifidobacterias mayores a las divulgadas en la presente memoria, a fin de evitar que se generen productos secundarios no deseados, tales como ácido acético, que impartirían sabores desnaturalizantes desagradables al producto alimenticio resultante.

Debe apreciarse que el producto de la invención también se puede almacenar durante períodos de tiempo más cortos a mayor temperatura o durante periodo de tiempo más largos que el periodo de almacenamiento mínimo definido anteriormente. Por ejemplo, después de un periodo de almacenamiento de 1 mes a 35°C, la concentración de bifidobacterias es preferentemente de por lo menos 3×10^7 cfu/g. Alternativamente, después de un periodo de almacenamiento de 5 o incluso 6 meses a 20°C, la concentración de bifidobacterias puede ser, por ejemplo, de por lo menos 3×10^7 cfu/g, preferentemente por lo menos 7×10^7 cfu/g, incluso más preferentemente por lo menos 1×10^8 cfu/g. Estas concentraciones por lo tanto corresponden a las concentraciones mínimas de bifidobacterias en estas condiciones de almacenamiento específicas. Preferentemente, incluso en estas condiciones de almacenamiento, la concentración de bifidobacterias no es superior a 5×10^8 cfu/g, preferentemente no es superior a 10^8 cfu/g, incluso más preferentemente no es superior a 8×10^7 cfu/g, correspondiente así a las máximas concentraciones de bifidobacterias en estas condiciones.

El producto divulgado en la presente memoria contiene bifidobacterias vivas. Dichas bifidobacterias se seleccionan preferentemente de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animalis*, en especial *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* y combinaciones de las mismas. Ventajosamente, dichas bifidobacterias comprenden por lo menos *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis*, preferentemente la cepa I-2494 depositada el 20 de junio de 2000, en la *Collection Nationale de Cultures des Microorganismes* (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS cedex 15, France.

Resulta interesante que el producto divulgado en la presente memoria pueda comprender además otras bacterias vivas de ácido láctico, en especial bacterias de ácido láctico seleccionadas de *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Lactococcus* sp. y combinaciones de ellas. Más particularmente, dichas bacterias vivas de ácido láctico se seleccionan de *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus raffinolactis*, *Streptococcus cremoris*, *Lactococcus lactis* y combinaciones de las mismas. Las bacterias vivas de ácido láctico preferidas para su utilización en la presente invención se seleccionan de *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* y combinaciones de las mismas. En este caso, el producto según la invención puede contener:

- una concentración de bacterias *L. bulgaricus* vivas de 3×10^6 cfu/g a 3×10^9 cfu/g; y/o
- una concentración de bacterias *S. thermophilus* vivas de 10^7 cfu/g a 3×10^8 cfu/g; y/o
- una concentración de bacterias *L. lactis* vivas de 5×10^6 cfu/g a 5×10^8 cfu/g.

Ventajosamente, si el producto fermentado divulgado en la presente memoria contiene dicha concentración de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, cumple con las especificaciones de "yogur" (véase el Codex Alimentarius, disponible on-line en <http://codexalimentarius.net>, en especial el estándar CODEX STAN 243-2003). De hecho, no todos los productos fermentados que contienen estas bacterias se pueden denominar yogures, sino únicamente aquellos en los cuales las bacterias vivas *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* están presentes en por lo menos 1×10^7 cfu/g.

Preferentemente, la actividad acuosa a_w del producto divulgado en la presente memoria es de menos de 0,25, incluso más preferentemente de menos 0,2. El término "actividad acuosa (a_w)" se refiere al agua del alimento que no está unida a moléculas de alimento y que de esta forma puede soportar el desarrollo de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos (hongos)), incluidos los microorganismos patógenos. La a_w preferentemente se mide a temperatura ambiente, tal como 20-26°C, por ejemplo a 25°C.

Preferentemente, el pH del producto divulgado en la presente memoria es de 4,3 a 5,8, más preferentemente de 4,6 a 5,3. Las bifidobacterias generalmente son sensibles a la acidez. Por lo tanto, los inventores prestaron gran atención al pH durante la concepción de la presente invención.

Resultó de hecho un desafío para los inventores proporcionar un producto alimenticio seco fermentado que contiene *Bifidobacterium*, en el cual se previene no sólo la contaminación microbiana sino también la pérdida de viabilidad de las bifidobacterias durante el almacenamiento a temperatura ambiente. Con este fin, tras considerables esfuerzos en materia de investigación, los inventores lograron especificar un nivel de acidez apropiado (pH) y una a_w para obtener

un producto satisfactorio, como se revela en el contexto de la presente invención.

Preferentemente, el producto divulgado en la presente memoria tiene un contenido de materia seca (DM) de 94% a 98%, todavía más preferentemente de 95% a 97%. Preferentemente, la mezcla láctea fermentada que proporcionará el producto divulgado en la presente memoria tras su secado tiene un contenido de materia seca de 10% a 30%, incluso preferentemente de 15% a 25%, y más preferentemente de 24%. Por encima de 30%, las bacterias de ácido láctico, incluidas las bifidobacterias, tienen muchas dificultades para desarrollarse. Además, se requiere dicho contenido de DM para poder poner en práctica la(s) correspondiente(s) etapa(s) de secado.

5 Típicamente, el contenido de DM corresponde a la masa de material residual medida después de colocar el producto a 105°C durante 17 horas, con respecto al volumen inicial o a la masa inicial del producto. El contenido de DM se puede medir de manera directa, es decir, colocando el producto cuyo contenido de DM se debe determinar a 105°C durante 17 horas y midiendo la masa de material residual que contenía el volumen inicial del producto tratado. Alternativamente, el contenido de DM se puede medir de manera indirecta, es decir, midiendo un parámetro del producto del cual se puede deducir o estimar el contenido de DM. A título de ejemplo, el experto en la materia puede medir la densidad del producto a una temperatura dada (por ejemplo, a 45°C) y a partir de ella deducir el correspondiente contenido de DM, por ejemplo usando un cuadro o una curva de correspondencia ya trazada por el experto, a fin de deducir, a partir de la densidad medida a la temperatura dada, el correspondiente contenido de DM para el producto en cuestión. Por ejemplo, con respecto a una mezcla láctea inicial utilizada como material de partida para elaborar un producto lácteo fermentado según la presente invención, generalmente se prefieren las mediciones indirectas, tales como la densitometría, ya que se pueden llevar a cabo más rápidamente que el método directo. Una mezcla láctea inicial convencional presenta un contenido de DM del orden del 10-20%, por ejemplo 11-13%. Una leche fermentada obtenida por fermentación láctica de dicha mezcla láctea inicial convencional presenta un contenido de DM que no es sustancialmente distinto del de la mezcla láctea inicial, es decir, un contenido de DM convencional del orden de 10-20%.

10 Preferentemente, la viscosidad de la mezcla láctea fermentada que proporcionará el producto divulgado en la presente memoria tras el secado es de 50 mPa.s a 250 mPa.s, incluso más preferentemente de 50 mPa.s a 400 mPa.s.

15 20 25 Para obtener la viscosidad requerida, la mezcla láctea fermentada preferentemente se somete a cizallamiento usando, por ejemplo, un equipo mezclador dinámico con alta velocidad periférica (mínimo 30 m/s) o utilizando una máquina homogeneizadora con una presión mínima de 150 bars.

30 35 La medición de la viscosidad se realiza ventajosamente a 10°C con un viscosímetro Rheomat y los siguientes parámetros: 1-1/64s-1/10s.

40 Preferentemente, en la mezcla láctea fermentada que proporcionará el producto divulgado en la presente memoria tras el secado, el contenido de proteína es de 3% a 7%, incluso más preferentemente de 3,5% a 6,2%.

45 50 Preferentemente, el producto divulgado en la presente memoria comprende además uno o varios aditivos alimenticios seleccionados de:

- agentes protectores para bifidobacterias;
- edulcorantes o azúcares;
- nutrientes promotores del crecimiento para bifidobacterias;
- agentes dispersantes; y
- combinaciones de los mismos.

55 60 Preferentemente, el producto divulgado en la presente memoria comprende extracto de levadura, goma arábica, pectina, celulosa y por lo menos un azúcar seleccionado de sacarosa, fructosa, lactosa y glucosa.

65 Los "agentes protectores para bifidobacterias" son agentes aceptables para uso alimenticio que pueden favorecer la supervivencia de las bifidobacterias. Dichos agentes preferentemente mantienen una concentración lo suficientemente alta de bifidobacterias vivas en el producto, durante toda la elaboración (en especial, las etapas de secado) y el almacenamiento. Los agentes apropiados se pueden seleccionar de goma arábica, celulosa y trealosa.

Los "edulcorantes o azúcares" son edulcorantes de carbohidratos aceptables para uso alimenticio, que pueden ser edulcorantes naturales o artificiales, con pocas o ninguna caloría. Los ejemplos preferidos de azúcares apropiados son sacarosa, fructosa, lactosa y glucosa.

Los "nutrientes promotores del crecimiento para bifidobacterias" son agentes aceptables para uso alimenticio que pueden mejorar el crecimiento de bifidobacterias siendo, por ejemplo, metabolizados por las bifidobacterias. Por ejemplo, se puede citar la goma arábica y el extracto de levadura.

65 Los "agentes dispersantes o dispersantes" son agentes aceptables para uso alimenticio que pueden mejorar la

recuperación de una composición líquida homogénea tras la disolución del producto seco en un líquido apropiado (correspondiente a la reconstitución de una composición líquida). Estos agentes evitarán ventajosamente que las proteínas de la leche se precipiten tras la reconstitución de una composición líquida ácida. Los dispersantes adecuados se pueden seleccionar de pectina, lecitina, celulosa y carragenano.

5 Se pueden añadir uno o varios aditivos alimenticios adicionales para mejorar las propiedades del producto. Dichos aditivos alimenticios adicionales se pueden seleccionar de vitaminas (por ejemplo, vitamina A, B1, B2, B6, B12, C, D, E, K, ácido fólico, etc.), enzimas, plastificantes, agentes colorantes (pigmentos, tinturas, etc.), agentes saborizantes (por ejemplo, sabores de fruta), antioxidantes, agentes tampón, lubricantes (por ejemplo, aceites vegetales), estabilizantes y combinaciones de los mismos. De ser necesario, el experto podrá seleccionar los aditivos alimenticios apropiados entre todos los aditivos alimenticios y excipientes bien conocidos disponibles en el mercado.

10 Preferentemente, el producto lácteo no contiene almidón, hidrolizado de almidón ni material gelatinizado.

15 También constituye un objeto de la presente invención un método o procedimiento para preparar un producto lácteo fermentado seco, como se describe en la presente memoria.

20 Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para preparar un producto lácteo fermentado seco que presenta una alta densidad de bifidobacterias vivas, que comprende:

25 a) proporcionar una mezcla láctea inicial caracterizado por que dicha mezcla láctea inicial comprende uno o más ingredientes seleccionados de entre:

- leche;
- crema;
- leche en polvo desnatada; y
- combinaciones de las mismas

30 b) opcionalmente, añadir a dicha mezcla láctea inicial uno o más aditivos seleccionados de:

- agentes protectores de bifidobacterias;
- edulcorantes o azúcares;
- nutrientes promotores del crecimiento para bifidobacterias;
- agentes dispersantes; y
- combinaciones de los mismos;

35 c) inocular dicha mezcla láctea inicial o la mezcla obtenida en la etapa b) con bifidobacterias vivas en una concentración máxima de 10^9 cfu/g;

40 d) fermentar la mezcla inoculada obtenida en la etapa c) a una temperatura de 35°C a 39°C, en particular de 36°C a 37°C, durante un periodo de tiempo de 4 a 6 horas, y a un pH de 4,3 a 5,8;

45 e) el secado primario de la mezcla fermentada obtenida en la etapa d) en una cámara de secado por pulverización que presenta una temperatura de entrada de aire de 120°C a 145°C y una temperatura de salida de aire de 50°C a 70°C, durante un periodo de tiempo de 30 a 50 segundos, a una temperatura de alimentación de menos de 40°C;

50 f) opcionalmente, el secado secundario del producto resultante, preferentemente sobre un lecho fluidizado;

55 g) recuperar dicho producto;

h) opcionalmente, envasar el producto obtenido en la etapa g); y

i) opcionalmente, almacenar el producto obtenido en la etapa g) o h), preferentemente durante hasta 3 meses a temperatura ambiente

60 caracterizado por que la etapa e) y opcionalmente la etapa f) se realizan hasta obtener un polvo de producto lácteo fermentado que presenta una a_w inferior a 0,25.

65 Preferentemente, el producto se almacena durante 3 meses a temperatura ambiente en condiciones de bajo nivel de oxígeno (por ejemplo, nitrógeno).

65 Preferentemente, el producto de acuerdo como se describió anteriormente se obtiene a partir de una mezcla láctea inicial usando este método. Por lo tanto, todas las definiciones y características preferidas descritas anteriormente con respecto al producto lácteo fermentado seco son aplicables al presente método.

En particular, las bifidobacterias se seleccionan de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animalis*, en especial *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* y combinaciones de ellas. Ventajosamente, dichas bifidobacterias comprenden por lo menos *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis*, preferentemente la cepa I-2494 depositada el 20 de junio de 2000 en CNCM.

El término "mezcla láctea inicial" significa una masa blanca según se usa convencionalmente en la industria láctea. Generalmente, se designa como "leche", que es una composición que consiste esencialmente en leche y/o componentes de la leche. La leche normalmente es de origen animal y puede ser leche entera, leche desnatada, leche semidesnatada, leche concentrada, leche fresca, leche en polvo, leche reconstituida, leche enriquecida con componentes de leche y/o aditivos alimenticios, etc. La fermentación láctica de dicha "mezcla láctea inicial" por las bifidobacterias da como resultado un producto que preferentemente se destina al consumo humano, y más particularmente se puede designar como una leche fermentada.

De manera importante, la "mezcla láctea inicial" de acuerdo con la presente invención no es un medio de cultivo bacteriano que se puede definir como un medio que favorece y/o estimula el desarrollo de bacterias de ácido láctico. De hecho, un medio de cultivo permitirá obtener un inóculo bacteriano que puede conducir, tras una separación apropiada, a una biomasa bacteriana concentrada, en el que dicho inóculo o dicha biomasa concentrada es útil para agregar a un producto alimenticio, tal como un producto alimenticio ya fermentado (que ha sido fermentado de este modo por otras bacterias de ácido láctico distintas de las contenidas en el inóculo o la biomasa concentrada). Por el contrario, la mezcla láctea inicial usada en la presente invención es un material de partida que se transformará, tras la fermentación láctica, a fin de obtener un producto adecuado para ser consumido por un mamífero (preferentemente, el ser humano) (de ser necesario, después de la reconstitución en un líquido, especialmente si el producto es seco). De hecho, la mezcla láctea inicial pasará por una etapa de fermentación por parte de las bacterias de ácido láctico que se agregan a ella al inicio del proceso de elaboración. Posteriormente no se agregará ninguna otra bacteria durante el proceso. Este significa que todos los materiales presentes durante la etapa de fermentación estarán contenidos en el producto final.

Preferentemente, la mezcla láctea inicial comprende uno o varios ingredientes seleccionados de:

- 30
- leche;
 - crema;
 - leche en polvo desnatada; y
 - combinaciones de las mismas.

35 Muchos compuestos que se pueden agregar a un medio de cultivo para estimular y/o alentar el desarrollo de bacterias de ácido láctico no se pueden agregar a una "mezcla láctea inicial" con el fin de obtener un producto lácteo fermentado de acuerdo con la invención. En particular, éste es el caso con muchos surfactantes y/o agentes emulsionantes y/o agentes solubilizantes y/o detergentes, tales como el monooleato de polioxietilen-sorbitán-20 (40 también conocido como polisorbato 80 o Tween 80).

Preferentemente, la mezcla obtenida en la etapa b) presenta la siguiente fórmula (Tabla 1):

45 Tabla 1

Ingredientes	% en peso
Leche	76,19
Crema	7,03
Leche en polvo desnatada	10,26
Azúcar	4,00
Goma arábiga	2,00
Extracto de levadura	0,02
Pectina y celulosa	0,50

Preferentemente, en la etapa c), la mezcla láctea inicial o la mezcla obtenida en la etapa b) se inoculan con bifidobacterias vivas en una concentración máxima de 5×10^8 cfu/g, preferentemente $2,5 \times 10^8$ cfu/g.

50 Preferentemente, se agregan asimismo otras bacterias vivas de ácido láctico en la etapa c), en la que dichas bacterias de ácido láctico se seleccionan ventajosamente de *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Lactococcus* sp. y combinaciones de las mismas.

55 En el método de la invención, se lleva a cabo la inoculación masiva de la mezcla láctea. Esta inoculación masiva tiene el efecto de causar un desarrollo muy limitado de biomasa. Los inventores han demostrado que, mientras que el desarrollo celular bacteriano se reduce considerablemente, inesperadamente la actividad de fermentación es totalmente equivalente o incluso mejor que la que se puede observar durante la fermentación convencional de la

leche. La invención de este modo propone y permite que el desarrollo celular se separe de la actividad de fermentación.

5 Como se mencionó anteriormente, no se agregan más bacterias vivas, en especial bacterias de ácido láctico, después de la etapa d).

La fermentación láctica (etapa d)) se lleva a cabo usando técnicas conocidas por el experto en la materia, para obtener un producto lácteo fermentado que puede ser una leche fermentada.

10 Cuando se hace referencia a una "fermentación láctica", esto significa una fermentación láctica acidificante, que da como resultado la coagulación y la acidificación de la leche después de la producción de ácido láctico, que puede estar acompañado por la producción de otros ácidos, dióxido de carbono y diversas sustancias, tales como exopolisacáridos (EPS) o sustancias aromáticas, por ejemplo diacetilo y acetaldehído.

15 Entonces, durante la fermentación (etapa d)), se realiza la acidificación simultánea de la mezcla inoculada y la adaptación bacteriana a los esfuerzos fisicoquímicos (en especial, la acidificación del medio y las posteriores condiciones de secado). Esto mejorará ventajosamente la estabilidad del producto resultante durante el almacenamiento. Las condiciones de fermentación deben ser controladas a fin de: (i) optimizar la acidificación simultánea del medio y la adaptación bacteriana; (ii) evitar una pérdida sustancial de viabilidad de las bifidobacterias

20 (y al mismo tiempo no favorecer y/o estimular el desarrollo bacteriano); y (iii) evitar que las bacterias generen productos secundarios no deseados, tales como ácido acético. La mezcla inoculada se mantiene así en condiciones, en particular en condiciones de temperatura, que son favorables para la actividad de fermentación de las bifidobacterias hasta obtener un producto lácteo fermentado (preferentemente una leche fermentada).

25 Por lo tanto, para la etapa de fermentación d):

- una temperatura preferida es de 36,5°C; y/o
- un periodo de tiempo preferido es de 5 horas; y/o
- un pH preferido es de 4,8.

30 En el método de la presente invención, se realiza una pulverización leve pero muy exhaustiva y se combina con la inoculación a granel de la mezcla láctea inicial para obtener las concentraciones esperadas de bifidobacterias vivas. Esto se logra sin que sea necesario agregar bacterias de ácido láctico, que no participarían en la fermentación láctica y/o que se agregarían después de la inoculación, y sin que sea necesario concentrar la masa fermentada.

35 El método de acuerdo con la presente invención no comprende ninguna etapa que consista en recoger o concentrar o separar la biomasa bacteriana. En el método de la invención, la biomasa bacteriana no se separa y resuspende.

40 La pulverización (etapa e) y opcionalmente la etapa f)) se llevan a cabo hasta obtener un polvo del producto lácteo fermentado que tenga una a_w de menos de 0,25, mientras que se asegura que las condiciones de pulverización, en particular las condiciones de temperatura aplicadas, sean suficientemente favorables para la supervivencia de las bifidobacterias.

45 Con respecto a la etapa e), las condiciones preferidas del secado primario de la mezcla fermentada obtenida en la etapa d) en la cámara de secado por pulverización son las siguientes:

- una temperatura de entrada de aire de 120°C a 140°C, preferentemente de 120°C a 138°C, incluso más preferentemente de 120°C a 135°C; y/o
- una temperatura de salida de aire de 55°C a 65°C, preferentemente de 59°C a 63°C; y/o
- el secado primario se realiza durante un periodo de tiempo de 38 a 45 segundos, preferentemente de 41 segundos; y/o
- la temperatura de alimentación se encuentra entre 3°C y 40°C, dependiendo de la textura del producto, preferentemente menos de 10°C, más preferentemente de 6°C a 9°C, y todavía más preferentemente de 8°C; y/o
- la temperatura del producto en la cámara de secado por pulverización es de 30°C a 45°C, preferentemente de 35°C a 43°C, todavía más preferentemente de 38°C a 42°C, y aún más preferentemente de 41,5°C.

60 Es conocido que la viabilidad de las bifidobacterias comienza a disminuir a una temperatura de 43°C. Éste es el motivo por el cual la temperatura será cuidadosamente controlada durante el secado del producto.

65 La actividad acuosa aún puede ser demasiado alta después de la etapa e). Si el valor a_w deseado no se ha alcanzado aún después de la etapa e), se recomienda otra etapa de secado f) a fin de disminuir dicha a_w , para

obtener el valor a_w deseado y prolongar la vida útil del producto a temperatura ambiente. La etapa de secado se puede realizar por lecho fluidizado u otras técnicas, tales como liofilización, colocar el producto bajo una atmósfera con bajo contenido de humedad, mezclarlo con aglutinantes acuosos químicos comestibles, diluirlo en una matriz seca y similares. Si se usa un lecho fluidizado en la etapa f) para secar en forma secundaria el producto obtenido en

5 la etapa e), el lecho fluidizado preferentemente es de tipo Gea Niro, Anhydro o Glatt, y se usa después de la cámara de secado por pulverización utilizada en la etapa e). Se puede ubicar en el fondo de la cámara de secado por pulverización y opcionalmente puede seguirle el enfriamiento del polvo resultante. La Tabla 2 a continuación proporciona valores a_w ilustrativos para un producto de acuerdo con la presente invención:

10 Tabla 2

Aw (-)	
Después del secado por pulverización (etapa e))	Después del secado secundario (etapa f))
0,351	0,171
0,288	0,190
0,264	0,190

15 Las condiciones apropiadas del lecho fluidizado se establecen ventajosamente según la actividad acuosa del producto a la salida de la cámara de secado por pulverización. Por ejemplo, para una actividad acuosa entre 0,27 y 0,20, las condiciones apropiadas pueden ser:

- 20 - una temperatura de 30°C a 45°C, preferentemente de 32°C a 40°C, incluso más preferentemente de 32°C a 35°C; y/o
- un tiempo de secado de 2 minutos a 120 minutos, preferentemente de 10 minutos a 60 minutos, incluso más preferentemente de 15 minutos a 30 minutos.

25 Preferentemente, la concentración de bifidobacterias en el producto obtenido en la etapa i) es la concentración de bifidobacterias mínima definida anteriormente. Dicha concentración es de por lo menos 8×10^7 cfu/g, preferentemente de 10^8 cfu/g, más preferentemente de $2,5 \times 10^8$ cfu/g, todavía más preferentemente de 4×10^8 cfu/g, y aún más preferentemente de 5×10^8 cfu/g.

30 Cuando se agregan otras bacterias de ácido láctico distintas de las bifidobacterias en la etapa c), las formas de realización preferidas son las siguientes:

- 35 - Se agrega *L. bulgaricus* en la etapa c) en una concentración de 10^5 cfu/g a 2×10^7 cfu/g; y/o el producto obtenido en la etapa i) presenta una concentración de *L. bulgaricus* de 3×10^6 cfu/g a 3×10^9 cfu/g; y/o
- Se agrega *S. thermophilus* en la etapa c) en una concentración de 2×10^5 cfu/g a 5×10^7 cfu/g; y/o el producto obtenido en la etapa i) presenta una concentración de *S. thermophilus* de 10^7 cfu/g a 3×10^8 cfu/g; y/o
- Se agrega *L. lactis* en la etapa c) en una concentración de 3×10^6 cfu/g a 2×10^8 cfu/g; y/o el producto obtenido en la etapa i) tiene una concentración de *L. lactis* de 5×10^6 cfu/g a 5×10^8 cfu/g.

40 Preferentemente, el producto obtenido en la etapa g) presenta por lo menos una de las siguientes características:

- 45 - una actividad acuosa a_w de menos de 0,25, preferentemente menos de 0,2; y/o
- un contenido de materia seca de 94% a 98%, preferentemente de 95% a 97%; y/o
- un pH de 4,3 a 5,8, preferentemente de 4,6 a 5,3, todavía más preferentemente de 4,8 a 5,3.

50 Preferentemente, el método de acuerdo con la presente invención además comprende, antes de la etapa h) o i), una etapa de mezclado del producto obtenido en la etapa g) con un polvo comestible con sabor, tal como un polvo concentrado de zumo de fruta, un polvo concentrado de zumo de vegetal, una compota de fruta o un puré de fruta.

55 Por "zumo de fruta" en la presente memoria se hace referencia a zumo de fruta, concentrado de zumo de fruta o zumo de fruta reconstituido a partir de un concentrado de zumo de fruta. Por ejemplo, las frutas se pueden seleccionar entre pera, fresa, melocotón, piña, uva, manzana, albaricoque, naranja, banana, mango, cereza, ciruela, ciruela pasa, mora, arándano, frambuesa, pomelo, guayaba, kiwi, fruto de la pasión, papaya, limón, membrillo, lichi, granada, melón, etc.

Por "zumo de vegetal" en la presente memoria se hace referencia a zumo de vegetal, concentrado de zumo de

vegetal o zumo de vegetal reconstituido a partir de un concentrado de zumo de vegetal. Por ejemplo, el vegetal se puede seleccionar entre soja, arroz, salvado, quinoa, avellana, almendra, nuez, etc.

5 Otro objeto divulgado en la presente memoria es un producto lácteo fermentado seco que presenta una alta densidad de bifidobacterias vivas, que se puede obtener mediante el método descrito anteriormente.

10 Por lo tanto, el producto lácteo divulgado en la presente memoria es un producto fermentado, preferentemente una leche fermentada, con una alta concentración de bifidobacterias en la forma viable o viva, sin la necesidad de agregar otras bacterias de ácido láctico que no participarían en la fermentación láctica y/o que se agregarían después de la inoculación, y sin la necesidad de concentrar la masa fermentada.

15 Todavía otra divulgación es un polvo con sabor que tiene una alta densidad de bifidobacterias vivas, el cual comprende mezclar un producto lácteo fermentado seco, como se describió anteriormente, y un polvo comestible con sabor, tal como un polvo concentrado de zumo de fruta o un polvo concentrado de zumo de vegetal.

20 15 El tamaño de partícula del producto lácteo fermentado seco o del polvo con sabor divulgado en la presente memoria ventajosamente se adaptará al uso que se le pretenda dar. Por ejemplo, se puede seleccionar un tamaño de partícula de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 µm para una sola partícula, que opcionalmente se aglomera o se granula para formar partículas más grandes.

25 20 Otra divulgación es un recipiente sellado que comprende un producto lácteo fermentado seco o un polvo con sabor como se describió anteriormente.

30 25 Preferentemente, dicho recipiente se selecciona entre un frasco, una bolsita, una cápsula y una lata. Los ejemplos de posibles formas de realización de un recipiente de acuerdo con la presente invención son: atmósfera con bajo nivel de oxígeno, protección contra la luz y/o la humedad, y/o transición gaseosa con el medio ambiente.

35 30 Otros objetos divulgados en la presente memoria son un producto lácteo fermentado seco o un polvo con sabor, como se describió anteriormente, para usar como:

- un probiótico; y/o
- un recubrimiento o relleno comestible.

40 35 Un "recubrimiento" es una composición comestible para ser aplicada sobre un producto alimenticio. Se puede aplicar, por ejemplo, uniformemente en su totalidad alrededor del producto alimenticio, o sobre uno o varios lados o superficies de dicho producto, o como una o varias zonas o sectores discretos.

45 40 Un "relleno" es una composición comestible para ser aplicada dentro de un producto alimenticio. Se puede aplicar, por ejemplo, en forma de "sándwich" entre dos o más piezas de un producto alimenticio, o como núcleo interno en un producto alimenticio de múltiples capas.

50 45 Otro objeto divulgado en la presente memoria es un método para preparar una composición comestible que presenta una alta densidad de bifidobacterias vivas, que comprende:

- a) agregar una preparación comestible a un producto lácteo fermentado seco o un polvo con sabor, como se describió anteriormente; y
- b) recuperar dicha composición.

55 50 Por ejemplo, una preparación comestible para usar en la etapa a) puede contener saborizante de chocolate y/o otros saborizantes, tales como saborizantes de frutas.

60 55 La preparación comestible usada en la etapa a) y/o la composición comestible recuperada en la etapa b) puede ser un recubrimiento o un relleno, como se ha divulgado anteriormente. Alternativa o adicionalmente, puede ser:

- un semilíquido, tal como un puré de fruta, una mermelada o un yogur; o
- líquido, tal como agua, leche, zumo de fruta o zumo de vegetal.

65 60 Es divulgada en la presente memoria la composición comestible que presenta una alta densidad de bifidobacterias vivas, que se puede obtener mediante el método anterior.

Otra divulgación es un método para preparar un alimento con una alta densidad de bifidobacterias vivas, que comprende:

65 65 a) recubrir o llenar una preparación de alimento con un producto lácteo fermentado seco o un polvo con sabor o una composición comestible, como se describió anteriormente; y

b) recuperar dicho alimento.

5 Todavía otra divulgación es un alimento con una alta densidad de bifidobacterias vivas, que se puede obtener mediante dicho método.

Preferentemente, el alimento divulgado en la presente memoria se selecciona entre galletas saladas, barras de cereal, refrigerios, tartas y galletas.

10 Las formas de realización no limitativas y las ventajas de la presente invención se muestran en los ejemplos siguientes.

EJEMPLOS

15 1) Ejemplo 1: Preparación de un producto lácteo fermentado seco según la presente invención

El producto se preparó secando por pulverización una masa blanca fermentada (o mezcla fermentada).

20 Un ejemplo de fórmula de mezcla láctea inicial se describió anteriormente (ver la Tabla 1).

Tabla 3: Fórmula de la masa blanca antes de la inoculación

Ingrediente	Cantidad (kg)
LECHE EN POLVO DESNATADA	10,11
LECHE DESNATADA	76,29
CREMA	7,18
AZÚCAR	4,00
GOMA ARÁBIGA	2,00
EXTRACTO DE LEVADURA	0,02
GOMA CELULOSA	0,40
MEZCLA	100,00

25 Tabla 4: Fórmula de la masa blanca después de la inoculación

Composición	Cantidad (kg)
MEZCLA	99,40
CULTIVO	0,60
WM para secado por pulverización	100,00

Otras características de la masa blanca (WM) antes de la fermentación eran:

- 30 - contenido de proteína: 6,2%;
 - contenido de grasa: 3%.

La fermentación se detuvo a un pH de 4,8 después de 5 horas 30 minutos, por enfriamiento de la mezcla resultante a una temperatura por debajo de los 20°C.

35 En todos los experimentos descritos en la presente memoria, la cantidad de bifidobacterias y la actividad acuosa se determinaron sobre el producto resultante utilizando métodos bien conocidos por el experto en la materia.

Análisis después del secado por pulverización + lecho fluidizado, con el producto almacenado < 7 días a 20°C:

- 40 a) Contenido de bifidobacterias: 1,9 E+09
 b) Actividad acuosa: 0,17 ± 0,03.

2) Estabilidad de las bifidobacterias en el tiempo en un producto preparado según el Ejemplo 1

45 Los análisis se realizaron dentro de un periodo de almacenamiento de 6 meses a 20°C:

- a) Tabla 5: Recuento de bifidobacterias

Tiempo	Contenido de bifidobacterias
< 7 días	1,9 E+09
3 meses	7,4 E+08
6 meses	1,6 E+08

b) Tabla 6: Actividad acuosa

Tiempo	Actividad acuosa (a_w)
3 meses	0,24 ± 0,03
6 meses	0,26 ± 0,03

5 **3) Ejemplo comparativo 2: Estabilidad de las bifidobacterias en el tiempo en un producto no preparado según la presente invención**

10 Se seleccionaron los parámetros como se ha divulgado en la presente memoria (composición del producto y método para prepararlo) para lograr la estabilidad de las bifidobacterias en el producto lácteo fermentado seco.

15 Si se usa un método estándar que utiliza otros parámetros arbitrarios (por ejemplo, condiciones de secado convencionales, tales como: una temperatura de entrada de aire en la cámara de secado por pulverización de aproximadamente 189°C a aproximadamente 195°C y una temperatura de salida de aire de aproximadamente 89°C a aproximadamente 95°C), sólo se puede lograr una baja concentración de bifidobacterias vivas en el producto resultante.

20 A continuación se proporciona un ejemplo de un recuento de bifidobacterias obtenido después de un secado convencional (véase, por ejemplo, las condiciones anteriores, que son estándares para la producción de polvo a base de leche). El producto seco ha sido almacenado durante menos de 7 días a 20°C.

- Recuento de bifidobacterias: < 10 E+03.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar un producto lácteo fermentado seco que presenta una alta densidad de bifidobacterias vivas, que comprende:

5 a) proporcionar una mezcla láctea inicial, caracterizado por que dicha mezcla láctea inicial comprende uno o más ingredientes seleccionados de entre:

- 10 - leche;
- crema;
- leche en polvo desnatada; y
- combinaciones de las mismas

15 b) opcionalmente, añadir a dicha mezcla láctea inicial uno o más aditivos seleccionados de entre:

- 20 - agentes protectores para bifidobacterias;
- edulcorantes o azúcares;
- nutrientes promotores del crecimiento para las bifidobacterias;
- agentes dispersantes; y
- combinaciones de los mismos;

25 c) inocular dicha mezcla láctea inicial o la mezcla obtenida en la etapa b) con bifidobacterias vivas a una concentración máxima de 10^9 cfu/g;

30 d) fermentar la mezcla inoculada obtenida en la etapa c) a una temperatura desde 35 a 39, en particular desde 36°C a 37°C, durante un periodo de tiempo desde 4 a 6 horas y a un pH desde 4,3 a 5,8;

35 e) secar de manera primaria la mezcla fermentada obtenida en la etapa d) en una cámara de secado por pulverización que presenta una temperatura de entrada de aire desde 120 a 145°C y una temperatura de salida de aire desde 50 a 70°C, durante un periodo de tiempo de 30 a 50 segundos, a una temperatura de alimentación inferior a 40°C;

40 f) opcionalmente, secar de manera secundaria el producto resultante, preferentemente sobre un lecho fluidizado;

35 g) recuperar dicho producto;

45 h) opcionalmente, envasar el producto obtenido en la etapa g); y

40 i) opcionalmente, almacenar el producto obtenido en la etapa g) o h), preferentemente durante hasta 3 meses a temperatura ambiente;

45 caracterizado por que la etapa e) y opcionalmente la etapa f) son realizadas hasta que se obtiene un polvo de producto lácteo fermentado que presenta una a_w inferior a 0,25.

50 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho producto lácteo fermentado seco contiene unas bifidobacterias vivas a una concentración mínima de 8.10^7 cfu/g.

55 3. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que dicho producto lácteo fermentado seco contiene unas bifidobacterias vivas a una concentración mínima de 8.10^7 cfu/g durante por lo menos 3 meses a temperatura ambiente.

55 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicho producto lácteo fermentado seco presenta una concentración máxima de bifidobacterias de 5.10^9 cfu/g, preferentemente $2.5.10^9$ cfu/g, y todavía preferentemente 10^9 cfu/g.

60 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dichas bifidobacterias son seleccionadas de entre *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animalis*, especialmente *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* y combinaciones de las mismas.

65 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que otras bacterias de ácido láctico vivas son añadidas en la etapa c), siendo dichas bacterias de ácido láctico seleccionadas preferentemente de entre *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Lactococcus* sp. y combinaciones de las mismas.

65 7. Método según la reivindicación 6, caracterizado por que dicho producto lácteo fermentado seco presenta una

concentración de *Lactobacillus bulgaricus* desde 3.10^6 cfu/g a 3.10^9 cfu/g; y/o una concentración de *Streptococcus thermophilus* desde 10^7 cfu/g a 3.10^8 cfu/g; y/o una concentración de *Lactococcus lactis* desde 5.10^6 cfu/g a 5.10^8 cfu/g.

- 5 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que dicho producto lácteo fermentado seco presenta un contenido de materia seca desde 94 a 98%, preferentemente desde 95% a 97%.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que dicha mezcla láctea inicial presenta un contenido de materia seca desde 10 a 30%.