

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 911**

51 Int. Cl.:

A23L 2/70 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A23L 2/52 (2006.01)
A23L 2/02 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2006 PCT/EP2006/063109**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2006 WO06131569**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2006 E 06777310 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 1895862**

54 Título: **Procedimiento de preparación de un producto alimenticio enriquecido con probióticos y empobrecido en ácidos orgánicos**

30 Prioridad:

10.06.2005 FR 0505911

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

28.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BEVERINI, MARC;
LACORRE, CHRISTELLE;
FRANCOIS, ALAN y
LABBE, MICKAEL**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 606 911 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

Procedimiento de preparación de un producto alimenticio enriquecido con probióticos y empobrecido en ácidos orgánicos.

5

Descripción

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un producto alimenticio a base de frutas, del tipo bebidas o purés de frutas, que comprende una concentración de probióticos vivos y estables preferentemente mayor de 10^8 UFC/ml, un contenido alto en frutas que es preferentemente mayor de 50%, y cuyo contenido de ácido orgánico está reducido de 10% a 100%, de preferencia de 30% a 70%, muy de preferencia en 60%, con respecto al contenido inicial de ácido orgánico de la matriz de frutas.

10

La ingestión de microorganismos vivos denominados probióticos, algunos de los cuales son bacterias, en particular los que pertenecen al género *Lactobacillus*, es particularmente benéfica para la salud. De hecho, los probióticos han sido el objeto de muchos estudios que demuestran efectos clínicos preventivos en varios campos (por ejemplo en las manifestaciones alérgicas, diarrea infecciosa y enfermedades inflamatorias), y sobre ciertas funciones fisiológicas (por ejemplo la digestión de la lactosa, el tránsito intestinal y la inmunidad). En particular, estos probióticos son capaces de promover el funcionamiento adecuado de la flora intestinal, que probablemente afecta la población general. De hecho, entre otras cosas, estas bacterias producen otras bacteriocinas y ácido láctico, que aumentan indirectamente la digestibilidad de los productos alimenticios, promueven la peristalsis intestinal y aceleran la evacuación de las heces. Además, estas bacterias producen algunas vitaminas del complejo B, y en general promueven la absorción de vitaminas y minerales, reducen el colesterol sanguíneo, refuerzan el sistema inmune y recubren las membranas mucosas de los intestinos para proteger contra la invasión y actividad de los microorganismos dañinos.

15

20

25

Por esta razón, las industrias agroprocesadoras han intentado durante varios años incorporar dichas bacterias en sus productos.

30

Dichos productos con bacterias añadidas tradicionalmente son productos lácteos; sin embargo, la industria agroprocesadora tiene la oportunidad de desarrollar otros productos alimenticios, particularmente a base de frutas.

35

De la técnica anterior ya se conocen otros productos alimenticios de frutas con bacterias añadidas de tipo *Lactobacillus*, por ejemplo de la solicitud de patente Internacional WO 00/70972, y la solicitud de patente europea EP 0 113 055.

35

Sin embargo, ha sido posible observar crecimiento bacteriano en productos alimenticios a los que se han añadido los lactobacilos, por lo que durante el almacenamiento de los productos se altera la calidad de los mismos debido a la producción de gases y sabores extraños, haciéndolos así inadecuados para su consumo.

40

Muchos microorganismos son capaces de descarboxilar los ácidos cinámicos sustituidos, tales como el ácido trans-4-hidroxi-metoxi-cinámico (ácido ferúlico), y el ácido trans-4-hidroxi-cinámico (ácido p-cumárico), para formar los dos compuestos volátiles siguientes, respectivamente: 3-metoxi-4-hidroxiestireno (4-vinil-guayacol) y 4-hidroxiestireno (4-vinil-fenol). Estas moléculas son las responsables de los sabores extraños de tipo "fenol", "ahumado", de "guante" y de "medicina". La actividad del ácido p-cumárico y del ácido ferúlico descarboxilado fue detectada en bacterias de tipo *Lactobacillus*. En particular, los lactobacilos conocidos por estas actividades son los siguientes: *L. brevis*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. paracasei* (referencia bibliográfica: Van Beek, S. y Priest FG – 2000 – "Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation" – *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (12) : 5322-8). De esta manera, las cepas de lactobacilos son capaces de producir sabores extraños partiendo de ácidos fenólicos por medio de las rutas de biotransformación.

45

50

En la actualidad, las soluciones propuestas en la técnica anterior para resolver este problema que incluye la producción de gases y sabores extraños, consisten en conservar los productos a una temperatura de entre 4°C y 8°C, y con una concentración baja en frutas (aproximadamente 25%), por ejemplo como en la solicitud de patente internacional WO 00/70972, presentada por la empresa PROBI.

55

Sin embargo, estas soluciones no hacen posible proponer productos que tengan una concentración en frutas mayor de 50%, y además que comprenden una concentración significativa de bacterias vivas y estables del género *Lactobacillus*. Se entiende que una concentración significativa significa una población mayor o igual que 10^8 UFC/ml de producto. Se entiende que bacterias estables significa una población de bacterias que tiene una actividad metabólica reducida (producción de gases y/o sabores extraños, y acidificación bajo condiciones de almacenamiento limitadas y controladas) cuando están frías, es decir, a una temperatura de entre 4°C y 10°C. La acidificación posterior limitada es el resultado de una reducción de la concentración de ácidos orgánicos presentes en el producto, por una parte, y por otra parte la temperatura de almacenamiento baja de dicho producto.

60

65

Un producto alimenticio a base de frutas del tipo de bebida o puré de fruta que comprende probióticos estables vivos, tendrá la ventaja de proveer al consumidor los beneficios de las frutas y los probióticos.

5 El Plan Nacional de Nutrición y la Salud recomienda el consumo de un mínimo de 5 porciones de frutas y verduras al día. Observaciones realizadas por muchos científicos muestran que el consumo de más fruta y verdura en particular hace posible reducir la concentración del colesterol y la ingestión de lípidos, y limitar la frecuencia de la obesidad en los niños.

10 Varios estudios científicos sugieren similarmente que los probióticos pueden tener una función principal con respecto a la salud. Cada cepa de probiótico puede ofrecer beneficios de salud específicos. Entre estos beneficios se pueden encontrar: mejoramiento del sistema digestivo haciendo funcionar las defensas naturales y reforzándolas. Algunos probióticos actúan absorbiendo proteínas y otros producen vitaminas. Similarmente, algunos pueden producir compuestos que combaten la propagación de bacterias patógenas y por lo tanto tienen una función en el ecosistema intestinal.

15 Sería deseable para la industria agroprocesadora poder preparar dichos productos alimenticios, y ese es el objeto de esta invención.

20 Para aumentar la viabilidad de las bacterias, las solicitudes de patente europea EP 0 113 055 y EP 0 166 238, presentadas por Kirin Beer, proponen que la concentración de polifenoles de los zumos de frutas, que son componentes bacteriostáticos, sea reducida selectivamente poniendo el zumo en contacto con agentes absorbentes. En este caso, el objetivo deseado también es promover la fermentación de las bacterias y no mantener la población inicial estable como es el caso de acuerdo con esta invención.

25 Es conocido en el estado de la técnica que las frutas contienen ácidos orgánicos, y los inventores han observado que las bacterias del género *Lactobacillus* metabolizan estos ácidos orgánicos, y que este metabolismo de ácidos orgánicos puede ser el responsable de la producción de dióxido de carbono o los sabores extraños en los productos de fruta. La composición de ácidos orgánicos de algunas frutas también se pueden conocer consultando las fuentes bibliográficas, por ejemplo como las escalas de acidez por fruta en el "Code of Practice" del AIJN.

30 Muchas cepas de los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* son capaces de degradar malato, citrato, piruvato, fumarato, tartrato y gluconato para producir gases. En comparación con la medición del gas producido, la determinación del contenido de diacetilo y acetoina es un procedimiento más efectivo para detectar la degradación de piruvato (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).

35 De hecho, cuando se degradan, los ácidos orgánicos como ácido málico o ácido cítrico no presentan al consumidor estos problemas que incluyen la generación de sabores desagradables, a menos que esta asimilación vaya acompañada de una producción excesivamente alta de acetato, que también produce sabores extraños. Sin embargo, en este caso la asimilación de estos ácidos orgánicos por parte de las cepas bacterianas producirán CO₂, que inflará el envase del producto. De hecho, estos ácidos orgánicos son metabolizados naturalmente por algunas especies de lactobacilos para producir piruvato (el compuesto principal de los ciclos metabólicos tales como el metabolismo del carbono) y CO₂; además, el piruvato por sí solo es el sujeto de las reacciones de descarboxilación, aumentando así proporcionalmente las concentraciones de CO₂ producido.

45 Algunos de estos ácidos orgánicos son compuestos fenólicos (ácido cumárico, ácido ferúlico), y la degradación de estos compuestos por las cepas bacterianas puede producir sabores extraños en el producto.

50 Dependiendo del pH del producto final, el perfil sensorial de un ácido es muy variable. De esta manera, el ácido láctico es más astringente a pH 3.5 en comparación con el ácido cítrico y el ácido málico (Hartwing, P., McDaniel, M.R., 1995, "Flavor characteristics of lactic, malic, citric and acetic acids at various pH levels", *Journal of Food Science*, 60 (2), 384-388).

55 La figura 1 muestra así el mecanismo del metabolismo del ácido málico (o malato), ácido cítrico (o citrato) y piruvato.

60 Existen bebidas comerciales, en particular el producto ProViva® distribuido por Skánemejerier, que contiene una cepa del género *Lactobacillus* a una concentración máxima igual a 10⁸ UFC/ml y a un pH ácido (pH=3.8). Sin embargo, la estabilidad del producto solo se garantiza cuando se almacena a 4°C y por una concentración baja de zumo de frutas (<25%). Además, los productos comerciales ProViva® se han dirigido a ciertos tipos de frutas que tienen concentraciones bajas de ácido orgánico y que no incluyen los zumos principales como zumo de naranja, zumo de manzana y zumo de múltiples frutas exóticas.

65 Los inventores han mostrado que el empobrecimiento de los ácidos orgánicos de la matriz de la fruta en la que está basado el producto alimenticio, hace posible reducir o eliminar la producción de dióxido de carbono o sabores extraños del producto alimenticio final después del acondicionado, mientras que al mismo tiempo protege la calidad nutricional del producto, sin importar la fruta, la concentración de la fruta ni la concentración de ácido orgánico del

producto final. De esta manera, los inventores proponen controlar y recomendar una concentración de ácido orgánico limitativa que debe ser ajustada a la concentración objetivo de la matriz de fruta en la fórmula y al tipo de fruta en cuestión.

5 Por lo tanto, un objeto de esta invención es un producto alimenticio de fruta acondicionado que comprende probióticos vivos y estables, y cuyo contenido de ácido orgánico está reducido de 10% a 100%, de preferencia de 30% a 70%, y muy de preferencia en 60% con respecto al contenido inicial de ácido orgánico de la matriz de fruta, y en donde la producción de sabores extraños está reducida o eliminada en comparación con la matriz de fruta inicial.

10 Se entiende que el término probiótico designa microorganismos vivos que, cuando se incorporan en una cantidad suficiente, tienen un efecto positivo sobre la salud, mas allá de los efectos nutricionales tradicionales.

De acuerdo con esta invención, el término probióticos vivos significa probióticos cuya tasa de supervivencia después de 28 días en un producto alimenticio de acuerdo con esta invención es mayor de 60%, ventajosamente mayor de 80%.

La viabilidad de los probióticos se mide mediante las técnicas de conteo conocidas para el experto en la materia, por ejemplo conteo de masa, conteo de superficie, células de Malassez, conteo directo, turbidez, nefelometría, conteo electrónico, citometría de flujo, fluorescencia, medición de impedancia y análisis de imagen.

De acuerdo con esta invención, el término probióticos estables designa probióticos que no tienen actividad durante al menos 30 días a 10°C. La ausencia de actividad da como resultado:

- Ausencia de producción de gas (CO₂) detectable durante su almacenamiento ya acondicionado;
- Una calidad organoléptica constante sin alteración de la calidad inicial de la matriz de fruta y sin producción de sabores extraños;
- Ausencia de post-acidificación significativa (reducción del pH en < 0.5 unidades);
- No hay proliferación de los probióticos y hay retención de la población inicial (±50%).

Las cepas bacterianas según la invención son las cepas de *Lactobacillus plantarum* depositadas en la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes el 4 de abril de 2002, con el número CNCM I-2845.

La cepa de *Lactobacillus plantarum* depositada en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen von Zellkulturen GMBH el 16 de marzo de 1995 con el número DSM 9843 es comercializada por la compañía PROBI, con el nombre *Lactobacillus plantarum* 299v®. Esta cepa tiene muchas ventajas para usar como un probiótico en un producto alimenticio de fruta:

- Cumple los criterios establecidos por la comunidad científica para prebióticos.
- Está patentada, caracterizada (RAPD, ribotipificación), y su clasificación está confirmada.
- Es GRAS (Reconocido Generalmente como Seguro);
- Ya está presente a una concentración de 10⁸ UFC/ml en el producto ProViva® distribuido por Skánemejerier, y se ha consumido desde 1994;
- Tiene una tasa de supervivencia muy buena a un pH ácido menor de 4;
- Es amilasa-negativa y por lo tanto no degrada la textura del producto final.

Sin embargo, esta cepa también tiene varias desventajas:

- Tiene un fuerte potencial de post-acidificación.
- Produce defectos organolépticos significativos asociados con la síntesis de ácido acético.
- Degrada ácido cítrico (por ejemplo zumo de limón, zumo de naranja) o ácido málico (por ejemplo zumo de manzana o de pera) produciendo así dióxido de carbono gaseoso, y por lo tanto siendo posibles los problemas de hinchamiento, particularmente si se rompe la cadena de frío (es decir, llevarlo a una temperatura superior a 8°C).

De esta manera, esta cepa tiene muchos puntos positivos pero no se puede usar como tal en los productos alimenticios de fruta, sin agotar los ácidos orgánicos de la matriz de fruta en la cual se basa el producto alimenticio.

Lo mismo es cierto para la cepa de *Lactobacillus plantarum* depositada en la Collection Nationale des Cultures de Microorganismos el 4 de abril de 2002, con el número CNCM I-2845.

5 De acuerdo con la invención, se entiende que el término matriz de fruta designa un zumo de frutas, un concentrado de zumo de frutas reconstituido, o un puré de fruta, sin probióticos, sin ácidos orgánicos agotados, pero que comprende opcionalmente otras sustancias tales como por ejemplo azúcar, agua, aromatizantes, colorantes para alimentos, agentes edulcorantes, antioxidantes, leche, conservantes, acidificantes, agentes texturizantes, proteínas animales (proteínas de leche, proteínas de suero, etc.) o proteínas vegetales (soja, arroz, etc.), o proteínas de extractos vegetales (soja, arroz, etc.).

15 Por el término sabores extraños se entiende un sabor que es anormal para el producto alimenticio. Un sabor extraño es desagradable para el consumidor y por lo tanto no deseable. De esta manera, para ilustración, para el producto alimenticio de acuerdo con la invención, es posible citar el sabor extraño “terroso como de heno” que resulta de la fermentación y oxidación del producto, el sabor extraño “de vinagre” que resulta del fermento de ácido orgánico presente en el producto, y el sabor extraño “rancio” que resulta de la presencia de ácidos grasos volátiles.

20 También pueden ser detectados en el producto los sabores denominados “positivos”, tal como por ejemplo los sabores de “naranja” o “de frutas”. Puesto que estos sabores no son desagradables para el consumidor, no se incluyen en los “sabores extraños” de acuerdo con esta invención.

25 La concentración de moléculas responsables de los “sabores extraños” se mide por medio de microextracción en fase sólida (SPME) asociada con cromatografía de gas (GC) acoplada con un espectrómetro de masa (SM). Este procedimiento fue desarrollado específicamente y tiene mayor sensibilidad, mientras que al mismo tiempo tiene buena reproducibilidad y repetibilidad. La SPME permite una concentración específica de las moléculas volátiles objetivo para una cuantificación mejorada e identificación mejorada. La CG permite la separación de las moléculas volátiles en función de la polaridad y la masa molar de las mismas, y la obtención así de los picos que corresponden a cada molécula. La concentración de cada molécula se expresa en áreas pico, es decir, en unidades de absorción (UA) proporcionales a su concentración en la muestra. Finalmente, por una parte la espectrometría de masa permite la identificación positiva de cada molécula por medio de su fragmentación en iones característicos, y por otra parte una segunda cuantificación de las moléculas volátiles en donde, esta vez, la concentración se expresa en unidades de masa.

35 Por el término aromatizantes se entiende los ingredientes destinados a dar un sabor (es decir un sabor u olor) a un producto alimenticio.

Los aromatizantes se usan por dos objetivos principales:

- 40 - o bien refuerzan el sabor natural del producto alimenticio, o lo restauran parcialmente si es demasiado débil (productos que pierden parte de su sabor durante el proceso de fabricación),
- o bien reemplazan un ingrediente introduciendo al mismo tiempo un sabor aromático al producto final (por ejemplo yogur saborizado con fresa).

45 De acuerdo con esta invención, los aromatizantes preferidos son: manzana, naranja, bayas rojas, fresa, melocotón, albaricoque, frambuesa, zarzamora, grosella, limón, frutas cítricas, pomelo, plátano, piña, kiwi, pera, cereza, coco, granadilla, mango, higo, ruibarbo, melón, frutas múltiples, frutas exóticas, vainilla, chocolate, café y capuchino.

50 Por el término colorantes (para alimentos) se entiende sustancias capaces de restaurar o dar coloración al producto alimenticio.

De acuerdo con esta invención los colorantes preferidos son beta-caroteno y carmín.

55 El término agente edulcorante significa sustancias capaces de imitar el poder endulzante del azúcar sin introducir necesariamente las calorías del azúcar.

De acuerdo con esta invención, los agentes edulcorantes preferidos son aspartame, acesulfame K, sacarina, sucralosa y ciclamato.

60 El término antioxidante significa sustancias capaces de prevenir o reducir el fenómeno de la oxidación que, entre otras cosas, ocasiona la ranciedad de las grasas o el oscurecimiento de las frutas y vegetales cortados.

De acuerdo con esta invención, los antioxidantes preferidos son vitamina C, vitamina E y extracto de romero.

65 Se entiende que el término leche significa leche de origen animal (por ejemplo de vaca, cabra y oveja) o zumos de origen vegetal (por ejemplo zumo extraído de soja, tofu, arroz, avena, quinua, castaña, almendra o avellana).

El término conservantes significa sustancias destinadas a ayudar a la conservación, impidiendo la presencia y desarrollo de microorganismos indeseables en el producto alimenticio final (por ejemplo mohos o bacterias responsables de intoxicación alimentaria).

5 De acuerdo con la invención, los conservantes preferidos son ácido sórbico y dióxido de azufre.

El término agentes texturizantes significa sustancias que hacen posible mejorar la presentación o comportamiento del producto alimenticio final. Los agentes texturizantes pueden ser emulsionantes, estabilizadores, agentes espesantes o sustancias formadoras de gel. Se puede usar en el producto alimenticio de acuerdo con la invención solo o en combinación.

De acuerdo con esta invención, los agentes texturizantes preferidos son: pectina, usada como una sustancia formadora de gel, semilla de algarrobo, carragenanos, alginatos, goma guar, goma de xantano, almidón y mono- y diglicéridos de ácidos grasos comestibles.

Se entiende que el término acidificantes significa preferentemente ácido láctico o ácido cítrico o ácido fosfórico.

El término agua se entiende opcionalmente como agua purificada por ósmosis. El agua purificada por ósmosis hace posible limitar la cantidad de minerales presentes en el producto final, puesto que los minerales pueden ser similarmente responsables de sabores extraños.

De hecho el potasio, cloro, magnesio y calcio son más bien amargos en diversas formas (KCl, NH₄Cl, CaCl₂, acetato de calcio, LiCl, MgSO₄...), mientras que el sodio, litio y sulfato son más bien salados o ácidos dependiendo de su forma (forma salada: NaCl, Na₂SO₄, tartrato de Na; forma ácida: NaNO₃, 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 también pueden tener un efecto de "salación" sobre las moléculas volátiles responsables de los sabores extraños "ahumado", "fenólico", etc, promoviendo la transición de los mismos a la fase gaseosa arriba del producto, aumentando así la intensidad de los sabores extraños percibidos.

De acuerdo con esta invención, el término ácidos orgánicos designa en particular ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido pirúvico, ácido fumárico o ácido glucónico.

Los ácidos orgánicos cuyo contenido se reduce o elimina en comparación con la matriz de frutas inicial son preferentemente el ácido málico o cítrico.

El contenido inicial de ácido orgánico de la matriz de frutas puede ser conocido de las fuentes bibliográficas. Cuando la matriz de frutas es un zumo de frutas o un concentrado de zumo de frutas reconstituido, las referencias bibliográficas se refieren a la concentración de ácido orgánico de los zumos de frutas. Dichas fuentes, por ejemplo, son las tablas extraídas del "Code of Practice on Absolute Quality Requirements for Juices" de AIJN, como la que se presenta a continuación:

Tabla 1: Extracto del "Code of Practice on Absolute Quality Requirements for Juices" de AIJN, que muestra la concentración de ácido orgánico de zumos de frutas.

	Acido cítrico (g/L)	Acido L-málico (g/L)
Naranja	6,7-17	0,8-3
Pomelo	8-20	0,2-1,2
Manzana	50-200	Min 3
Uva	0,5 máx.	2,5-7
Piña	3-11	1,0-4,0
Limón	45-63	1,0-7,5
Granadilla	25-50	1,3-5,0
Pera	4 máx.	0,8-5
Albaricoque	1,5-16	5-20
Grosella	26-42	1-4
Cereza ácida	0,4 máx.	15,5-27
Frambuesa	9-22	0,2-1,2
Fresa	5-11	0,6-5
Melocotón	1,5-5	2-6
Mandarina	6-22	0,5-3

Cuando la matriz de fruta no es un zumo de fruta ni un zumo de frutas reconstituido a base de concentrado, las fuentes bibliográficas se refieren a la concentración de ácido orgánico de las frutas. Dichas fuentes son por ejemplo "La composition des aliments: tableaux des valeurs nutritives" 2000 (6ª edición); Souci S.W.; Fachmann W; Kraut H:

Sherz H; a continuación se reproduce una tabla de muestra:

Tabla 2: Concentración de ácido orgánico de frutas.

Fruta	Acido cítrico (mg/100 g)			Acido málico (mg/100 g)		
	Media	Min	Max.	Media	Min	Max.
Pera	140	80	200	170	100	240
Fresa	748	670	940	303	90	340
Melocotón	240	160	320	330	280	370
Piña	630	580	670	94	87	100
Uva	23			327	220	650
Manzana	29	9	30	426	270	790
Albaricoque	400	140	700	1000	700	1300
Naranja	1042	600	1880	89	40	190
Plátano	201	80	390	360	240	500
Mango	264	200	327	74		
Cereza ácida	4.7			1800		
Cereza (dulce)	13	10	15	940	730	1110
Ciruela	34	23	55	1220	820	1990
Ciruela pasa	158			5690		
Zarzamora	18	15	21	900	860	950
Arándano	523			850		
Frambuesa	1720	1060	2480	400	0	800
Uva	1296	1000	1460	180	50	310
Guayaba	537	532	541	325	182	469
Kiwi	995	980	1010	500	470	530
Granadilla	3250			650		
Papaya	54	29	100	29	27	31
Limón	4683	3500	7200	200		
Membrillo				930		
Eterio				3100		
Lichi	16			239		
Granada	500			100		
Melón	75	0	150		0	50

5 En ambos casos, el valor de la tabla que se usa para determinar el contenido inicial de ácido orgánico de los zumos de frutas o las frutas es el valor mínimo.

10 Además, el contenido inicial de ácido orgánico de la matriz de frutas puede ser definido por medio de cualquier procedimiento de cuantificación adecuado.

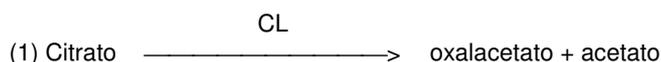
Dichos procedimientos son, por ejemplo:

15 - Medición de la acidez titulable, que cuantifica la concentración de ácidos presentes en la matriz de frutas. Esta consiste en neutralizar una muestra de la matriz de frutas con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N, la cantidad de hidróxido de sodio requerida para alcanzar un pH de 8, haciendo así posible reducir el valor de la acidez total.

20 - Prueba cromatográfica usando HPAEC (Cromatografía de Intercambio Aniónico de Alto Rendimiento) (procedimiento Dionex: 164-166 avenue Joseph Kessel 78960 Voisins Le Bretonneux, Francia), acoplada con detección conductimétrica.

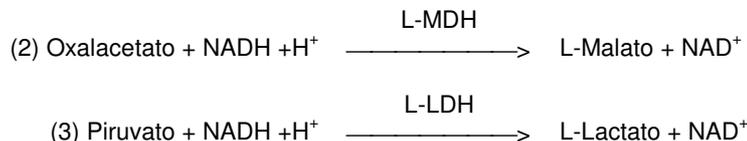
25 - Los ácidos málico y cítrico se pueden analizar por medio de procedimientos enzimáticos; los procedimientos de referencia son recomendados por la Federación Internacional de Productores de Zumos de Frutas (IFU) (estas referencias se han establecido desde 1985): IFU 21 para ácido málico e IFU 22 para ácido cítrico; estos son procedimientos espectrofotométricos que incluyen reacciones de enzima.

30 El procedimiento IFU 21 funciona basándose en el siguiente principio: el ácido cítrico (citrato) presente inicialmente en la matriz de frutas se convierte en oxalacetato y acetato en la reacción catalizada por la enzima citrato liasa, CL (1).



En presencia de las enzimas L-malato deshidrogenasa y L-lactato deshidrogenasa, el oxalacetato y el piruvato producidos por descarboxilación son reducidos a L-malato y L-lactato, respectivamente, por medio del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) (2) (3).

5

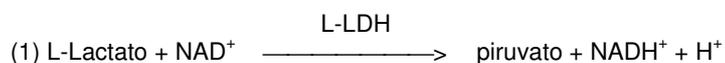


La cantidad de NADH oxidado en las reacciones (2) y (3) es estequiométrica con la cantidad de citrato. El NADH se determina midiendo la absorción de luz del mismo a 334, 340 o 365 nm. Esta medición hace posible determinar la cantidad de ácido cítrico presente inicialmente en la matriz de frutas.

10

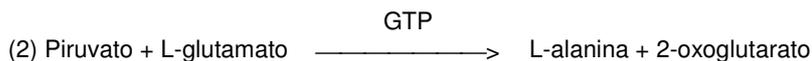
El procedimiento IFU 22 funciona basándose en el siguiente principio: el ácido L-láctico (L-lactato) presente inicialmente en la matriz de frutas se oxida a piruvato con dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) en presencia de L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) (1).

15



El equilibrio de esta reacción está basado en el lado de L-lactato. Atrapando el piruvato en una reacción subsiguiente catalizada por la enzima glutámico-pirúvico transaminasa (GPT) en presencia de L-glutamato, el equilibrio se puede desplazar a favor del piruvato y NADH (2).

20



La cantidad de NADH formado en la reacción anterior es estequiométrica con la cantidad de ácido L-láctico. El incremento de NADH se determina midiendo la absorción de luz del mismo a 334, 340 ó 365 nm. Esta medición hace posible determinar la cantidad de ácido L-láctico presente inicialmente en la matriz de frutas.

25

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, el producto alimenticio puede ser una bebida, preferentemente que contiene zumo de frutas o zumo de frutas reconstituido a base de un concentrado.

30

De acuerdo con esta invención se pueden citar los siguientes como zumos de frutas: zumo de naranja, y en particular el de 10-12° Brix NDC (No De Concentrado), y como un concentrado de zumo de naranja reconstituido CJNC (Concentrado de Zumo de Naranja Congelado) de 66° Brix, y los otros concentrados de zumo de frutas de entre 10° y 70° Brix.

35

El producto alimenticio según el procedimiento de la invención comprende entre 50% y 99.99% de zumo o de puré de frutas.

Los probióticos están a una concentración de entre $5 \cdot 10^5$ UFC/ml y $1 \cdot 10^9$ UFC/ml, preferentemente a una concentración mayor o igual que 10^8 UFC/ml. Muy preferentemente, la concentración es $4 \cdot 10^7$ UFC/ml.

40

El producto alimenticio tiene un pH de entre 3 y 4.

El producto alimenticio se conserva, y por lo tanto puede ser consumido, durante al menos 30 días a una temperatura máxima de 10°C sin requerir la adición de agentes bacteriostáticos.

45

El producto alimenticio está hecho a base de una fruta.

El producto está hecho a base de varias frutas.

La o las frutas tienen un contenido alto de ácido orgánico.

50

Las frutas son: naranja, limón, uva, piña, manzana, pera, melocotón o bayas rojas.

De manera preferida, el producto alimenticio comprende leche y/o zumo vegetal.

55

El zumo vegetal es preferentemente un zumo hecho de soja (zumo extraído de soja o tofu).

Los ácidos orgánicos eliminados preferentemente de la matriz de frutas son ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido pirúvico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido p-cumárico o ácido cafeico.

Un objeto de esta invención es un procedimiento de preparación de un producto alimenticio con las características de la reivindicación 1.

5 De acuerdo con esta invención, la etapa a) de empobrecimiento de los ácidos orgánicos de una matriz de frutas se realiza por medio de la selección de una matriz de frutas que tiene una acidez natural baja.

10 De acuerdo con esta invención, el término matriz de frutas que tiene acidez natural baja designa una matriz de frutas de la cual se obtiene naturalmente un zumo de bajo contenido de ácido, cuya acidez está entre el valor bajo indicado en el "Código de Práctica" de la AIJN (La Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea), reconocido por todos los profesionales del campo de los zumos de frutas, y menos del 50% de este valor.

15 La acidez natural depende no solo de la fruta, sino también de la variedad de la misma, el clima y el tiempo de cosecha. Consecuentemente se definen escalas de acidez por fruta y los valores se muestran en la siguiente tabla: (fuente: AIJN):

Tabla 3: Escalas de acidez de frutas de acuerdo con la AIJN.

Frutas	Acidez titulable (expresada en g de ácido cítrico anhidro por litro de zumo, medida a pH 8.1)
Naranja	5-15
Pomelo	7,7-18,5
Manzana	2,2-7,5
Uva	4-11
Piña	3,2-11,5
Limón	44,8-62
Granadilla	25,6-50
Pera	1,4-7 g/kg
Albaricoque	6,4-19,2 g/kg
Grosella	26,7-40,1
Cereza ácida	12,8-22,6
Frambuesa	12,2-20
Fresa	5,1-11,5
Melocotón	3,2-8 g/kg
Plátano	2-3,8
Mandarina	5,8-19,2

20 En cuanto a la naranja, las variedades encontradas que tienen acidez natural baja pueden tener por ejemplo un valor de acidez de 3 (es decir, 40% por abajo del valor bajo de la escala).

25 De acuerdo con esta invención, la selección de una matriz de frutas que tiene una acidez natural baja se efectúa por medio de una selección varietal de las frutas o controlando la maduración de las frutas.

Preferentemente, las frutas serán seleccionadas tan pronto como alcancen la madurez tardía.

30 De acuerdo con esta invención, la etapa a) para agotar los ácidos orgánicos de una matriz de frutas realiza por medio de la desacidificación de la matriz de frutas.

35 De acuerdo con esta invención, la desacidificación (reducción de la acidez titulable) de la matriz de frutas se efectúa por medio de electrodiálisis de la matriz de frutas, precipitación de los ácidos orgánicos de la matriz de frutas con sales de calcio, fermentación maloláctica, asimilación selectiva del ácido cítrico, o paso de la matriz de frutas por una resina de intercambio aniónico.

La fermentación cítrica produce diacetilo y acetoina por medio de las bacterias lácticas.

40 La desacidificación de la matriz de frutas de acuerdo con la invención se efectúa preferentemente por medio de electrodiálisis o paso de la matriz de frutas por una resina de intercambio aniónico.

De hecho, una resina de intercambio aniónico es ideal para recoger los compuestos que tiene radicales ácidos COOH, puesto que estos radicales se separan fácilmente en COO⁻ (anión) y H⁺ (catión), y por lo tanto dicha resina es adecuada para recoger los ácidos orgánicos.

45 Las resinas de intercambio aniónico utilizadas, por ejemplo, pueden consistir en las resinas Dowex®1, provistas por

Dow Chemical, USA, y las resinas Amberlite® IRA-402, provistas por Rohm and Haas Co., USA.

De acuerdo con esta invención, los probióticos se incorporan como parte de un proceso de diferenciación retrasada, es decir, al final de la línea de producción e inmediatamente antes o durante la etapa del acondicionado.

5 Además, la etapa b) y la etapa c) de acuerdo con esta invención se pueden efectuar simultáneamente. En este caso hipotético, el procedimiento de acuerdo con la invención solo tiene dos etapas para prevenir las alteraciones del producto alimenticio final durante su almacenamiento, sin ninguna proliferación de microorganismos.

10 En una modalidad preferida se realiza una etapa para añadir el ácido láctico entre la etapa b) y la etapa c) de dicho procedimiento, o simultáneamente con las mismas. La cantidad de ácido láctico por añadir será determinada fácilmente por los expertos en la materia basándose en la cepa deseada de bacteria por utilizar.

Leyenda de la figuras:

15 La figura 1 es un diagrama de la asimilación metabólica de citrato y malato, y de la producción de acetato en las bacterias lácticas.

Ejemplos

20 (La cepa DSM 9843 y los productos alimenticios comprenden la cepa DSM 9843 no forman parte de la presente invención)

25 **Ejemplo 1.** Formación de gases por las cepas *L-plantarum* DSM 9843 y *L. Plantarum* I-2845 (depositadas en el cncm el 04/04/02) con respecto al zumo de frutas inoculado.

I. Materiales y procedimientos:

I.1. Preparación de las suspensiones bacterianas e inoculación de los zumos de frutas.

30 Se hace un primer precultivo de 2 mL con las cepas DSM 9843 e I-2845. Este precultivo sirve para sembrar 100 mL de SRM neutro al 1% (es decir, 10^8 - 10^9 UFC/mL). De este segundo precultivo se siembran 3 x 1.000 mL de SRM neutro (es decir, 10^8 - 10^9 UFC/mL).

35 Cada cepa se somete a centrifugación (Beckman JA-25, rotor JA-10), de la siguiente manera, utilizando matraces de 500 mL:

- llenar 6 matraces con 330 mL de cultivo,
- 40 - centrifugar durante 10 min, 12.000 g, 20°C,
- eliminar el sobrenadante y añadir 165 mL de cultivo,
- centrifugar durante 10 min, 12.000 g, 20°C,
- 45 - eliminar el sobrenadante.

Cada pella obtenida se lleva entonces de forma separada nuevamente al zumo de frutas probado, y la suspensión obtenida se vuelve a regresar al bric de zumo de frutas, que después se vuelve a cerrar cuidadosamente.

50 I.2 Pruebas de ácido orgánico

La técnica elegida consiste en separar los ácidos orgánicos por medio de cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPAEC). La detección de los ácidos orgánicos se realiza mediante la detección conductimétrica supresora (SCD).

55 El sistema cromatográfico usado es de la marca DIONEX (de tipo DX600) que comprende un sistema de detección conductimétrico supresor. La celda conductimétrica controlada termostáticamente (de tipo DS3) se acopla con un sistema de autosupresión externo ASRS-ULTRA (4 mm). Este supresor electrolítico se usó con unos medios de recirculación de agua a contracorriente Milli-Q, a una velocidad de flujo de 4 mL/min (presión aproximada de 1.05 kg/cm²).

60 Una columna de intercambio aniónico de tipo AS11-HC (4mm) se asocia con una columna de guarda de tipo AG11-HC. La velocidad de flujo de elución es de 1.5 mL/min.

65

II Resultados:II.1 Cuentas bacterianas

- 5 Se hace un conteo bacteriano durante el almacenamiento de los productos con el fin de evaluar la supervivencia de *L. plantarum* de las matrices de zumos de frutas.

Tabla 4: Cuentas bacterianas de *L. Plantarum* durante almacenamiento de los zumos de frutas a 10°C

10

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
I-2845	D0	1,1·10 ⁹ UFC/mL	9,8·10 ⁸ UFC/mL	6,0·10 ⁸ UFC/mL
	D5	4,5·10 ⁹ UFC/mL	1,6·10 ⁹ UFC/mL	3,9·10 ⁹ UFC/mL

II.2 Demostración del consumo de ácidos orgánicos durante el almacenamiento.

15

Las pruebas de ácido orgánico se efectuaron a los 0 y 5 días, al mismo tiempo que el conteo, y los resultados se resumen en la tabla 4.

Tabla 5: Metabolitos producidos y ácidos orgánicos consumidos cuando el zumo de frutas que contiene *L. Plantarum* se almacenó a 10°C

		Lote	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	0,00
	+ DSM 9843	D5	++	3,38	27,93	4,44	6,72	0,21
	+ I-2845	D5	++	3,39	40,86	4,38	21,20	0,19
Zumo de Naranja	Control	D0	-	3,34	0,00	0,00	0,00	0,00
	+ DMS 9843	D5	+++	3,26	53,79	25,78	11,99	4,91
	+ I-2845	D5	++	3,27	48,90	15,60	13,26	1,42
Zumo de uva	Control	D0	-	3,22	0,00	0,00	0,00	0,00
	+ DMS 9843	D5	++	3,23	40,79	10,38	23,50	2,09
	+ I-2845	D5	+++	3,24	44,59	8,16	33,87	1,43

20

De acuerdo con los resultados presentados en la tabla 5, es muy evidente que el ácido málico es el sustrato más consumido por *L. plantarum*, sin importar la cepa implicada. Este consumo no solo va acompañado de la producción de acetato y lactato, y por lo tanto una reducción notable del pH (particularmente en el zumo de naranja y de manzana), sino también de una producción de gas que tiene un efecto macroscópico sobre el acondicionado.

25

De acuerdo con las rutas metabólicas presentadas en la figura 1, la ausencia producción de formiato (sin la acción de piruvato-formiato liasa), el contenido de pentosa muy bajo en los zumos de frutas tratados, se puede proponer la siguiente reconciliación general de CO₂ (expresada en moles):

30

$$\text{CO}_2 \text{ total} = \text{malato consumido} + \text{citrato consumido} + (\text{acetato total producido} - \text{acetato derivado de citrato}).$$

De esta manera, reemplazando el acetato producido del citrato con la cantidad de citrato consumido:

35

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

Conclusión:

40

De esta manera, el ácido málico, y a un menor grado el ácido cítrico, contribuyen fuertemente a la producción de gases durante el almacenamiento a 10°C de los zumos de frutas que contienen una dosis alta (> 1·10⁹ UFC/mL) de la bacteria *L. plantarum* DSM 9843 o I-2845.

Ejemplo 2: Dilución de los zumos de naranja para definir las concentraciones máximas de ácidos orgánicos compatibles con *L. plantarum* con respecto al porcentaje de zumo en la fórmula.

Se hicieron diluciones con 5%, 10%, 20% y 30% de zumo de naranja; estas diluciones corresponden a las velocidades de desacidificación de 95%, 90%, 80% y 70%.

Tabla 6

5

% de zumo en el producto	% de Acidificación	pH	Hinchamiento observado
30%	70%	pH natural	Hinchamiento el D+3
30%	70%	3,7	Hinchamiento el D+5
20%	80%	pH natural	Hinchamiento leve el D+14
20%	80%	3,7	Hinchamiento muy leve
10%	90%	pH natural	no
10%	90%	3,7	no
5%	95%	pH natural	no
5%	95%	3,7	no

Para que una bebida de zumo de naranja que contiene *L. plantarum* sea estable más de 30 días después de su fabricación, los presentes inventores determinaron que es necesario que tenga las siguientes características:

10

Tabla 7

% de Zumo de naranja en la bebida	Acidez del zumo de naranja	Relación Brix/acidez
100	0,4-0,6	100-150
75	1,3-1,45	41-46
50	2,2-2,3	27-30

Comentarios:

- 15 - la relación "Brix/acidez" designa la relación entre el valor de Brix del zumo y el número de gramos de ácido cítrico anhidro por 100 gramos de zumo (relación Brix/ácido).
- 20 - el "valor de Brix" designa el contenido de azúcar determinado por refractometría, al cual se le añade la corrección de acidez de acuerdo con el procedimiento de la Association of Official Analytical Chemistry de los Estados Unidos, titulada "Solids (Soluble) in Fruit Products", publicada en "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry" 14ª edición, 1984 (contenido Brix) DORS/88-8, art. 2; DORS/95-548, art. 2; DORS/2000-184, art. 27; DORS/2003-6, art. 65 (F).

Ejemplo 3: Análisis sensorial de varios productos

25

Con posterioridad a los problemas técnicos del uso de la cepa DSM 9843 en medios de planta (producción de CO₂ por medio del metabolismo del ácido málico o cítrico, que resulta en el hinchamiento de los briks de UHT; producción de sabores extraños debido a la presencia de ácidos orgánicos y el metabolismo de los ácidos fenólicos), se probaron las siguientes soluciones técnicas:

30

- 1) Desacidificación de los zumos en resinas de intercambio iónico,
- 2) Uso de agua purificada por ósmosis (para evaluar el impacto de los minerales sobre los sabores extraños),
- 35 3) Uso de varios tipos de ácidos para acidificación: ácido láctico, ácido cítrico o ácido fosfórico,

Se realizaron 7 pruebas de todas estas hipótesis:

Tabla 8

40

Pruebas	Tipo de zumo de naranja (24%)	Presencia de leche (16%)	Tipo de ácido para pH 3.8
SLC	Zumo estándar	Si (L)	Acido cítrico (C)
DLC	Zumo desacidulado (D)	Si	Acido cítrico
SLL	Zumo estándar	Si	Acido láctico (L)
DLL	Zumo desacidulado	Si	Acido láctico
DLL (purificado por ósmosis)	Zumo desacidulado	Si	Acido láctico

DL	Zumo desacidulado	No	Acido láctico
LL	Sin zumo	Si	Acido láctico

Resultados:

Tabla 9

5

Mezcla		Tipo de ácido	Prueba	Sabor el día 0	Sabor el D30	HOJA DE BALANCE
Zumo estándar	+ leche	+ ácido cítrico	SLC	sabor de "zumo" +++ sabores extraños -	sabor "de zumo" + sabores extraños (heno, tierra, establo) +++	↓ sabor de "zumo" sabores extraños ↑↑↑
	+ leche	+ ácido láctico	SLL	sabor de "zumo" +++ sabores extraños -	sabor de "zumo" + sabores extraños (heno, tierra, establo) +++	↓ sabor de "zumo" sabores extraños ↑↑↑
Zumo desacidulado	+ leche	+ ácido cítrico	DLC	sabor de "zumo" +++ sabores extraños -	sabor de "zumo" - sabores extraños (vinagre) +++	↓ sabor de "zumo" sabores extraños ↑↑↑
	+ leche	+ ácido láctico	DLL	sabor de "zumo" - sabores extraños --	sabor de "zumo" - sabores extraños (rancio) +	Sin sabor de "zumo" sabores extraños ↑
	+ leche	ácido láctico +	osmosis - DLL purificado	sabor de "zumo" - sabores extraños --	sabor de "zumo" - sabores extraños (un poco a zumo de frutas) -	Sin sabor de "zumo" Sin sabores extraños
	+ leche	ácido láctico +	DL	sabor de "zumo" +++ sabores extraños ---	sabor de "zumo" - sabores extraños (un poco a zumo de frutas) -	↓ sabor de "zumo" sin sabores extraños
Leche		ácido láctico +	LL	sabor de "zumo" -- sabores extraños --	sabor de "zumo" -- sabores extraños (muy frutal/floral) ---	Sin sabor de "zumo" Sin sabores extraños

Comentario: Los sabores se evaluaron de – (intensidad muy débil de este sabor) a +++ (intensidad muy fuerte de este sabor). Una flecha hacia abajo en la tabla (↓) indica una reducción, una flecha hacia arriba (↑) indica un aumento, y tres flechas hacia arriba (↑↑↑) indican un aumento significativo de los sabores aromáticos positivos y/o negativos del zumo (sabores de "zumo"; sabores extraños).

10

Hablando en términos generales, aunque el ácido cítrico refuerza el sabor de "zumo de naranja" en los productos del D0 al D30, todos los productos pierden estas características organolépticas y son relativamente neutros con respecto a los sabores frutales /de naranja.

15

Desde una perspectiva metabólica, en realidad el ácido cítrico es un precursor de sabores extraños porque es metabolizado por *Lactobacillus plantarum* para formar ácido acético (en el caso de zumo desacidulado) o etilfenol (en el caso de zumo estándar). Consecuentemente, la adición de ácido cítrico debe ser tan pequeña como sea posible para impedir la formación de estas moléculas, mientras que al mismo tiempo debe tener un efecto positivo sobre los sabores de "zumo".

20

ES 2 606 911 T3

Con respecto al tipo de zumo, la desacidificación de zumos es un procedimiento que hace posible prevenir la formación de sabores extraños (excepto en presencia de ácido cítrico), y persisten solo los sabores rancios, principalmente debido a la presencia de leche. Consecuentemente, se debe ajustar la relación zumo desacidulado /leche.

5 Finalmente, los mejores resultados en cuanto a la ausencia de sabores extraños (heno, establo, tierra, vinagre, rancio) y a la presencia de sabores aromáticos característicos del zumo de naranja, se obtienen con el zumo desacidulado, mezclado con agua purificada por ósmosis, y acidulado con ácido láctico.

10 **Ejemplo 4:** Zumo de frutas + fórmula de leche

Tabla 10

Zumo de naranja + producto de leche a un pH objetivo de 3,8	
Agua	Aproximadamente 70%
Azúcar	Aproximadamente 7,5%
Concentrado de zumo de naranja desacidificado	Aproximadamente 4,5%
Aromatizante de naranja	0,0054%
Pectina	0,56%
Beta-caroteno	0,09%
Leche	Aproximadamente 16,5%
Acido láctico	pH final 3,8
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 9843	Sembrado a 0,1%

15 **Ejemplo 5.** Fórmulas de zumo de naranja al 50% y 75%

Tabla 11

Zumo de naranja al 50% a un pH objetivo de 3,6	
Agua	80,4
Azúcar	3,5
Concentrado de zumo de naranja desacidificado	11
Pulpa	3,7
Pectina	0,2
Colorante	0,02
Acido láctico	0,4
Acido ascórbico	0,03
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 9843	Sembrado a 0,1%

20

Tabla 12

Zumo de naranja al 75% a un pH objetivo de 3,6	
Agua	80,2
Azúcar	1,3
Concentrado de zumo de naranja desacidificado	13,4
Pulpa	3,9
Pectina	0,2
Colorante	0,02
Acido láctico	0,13
Acido ascórbico	0,03
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 9843	Sembrado a 0,1%

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de preparación de un producto alimenticio acondicionado a base de frutas, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- (a) empobrecimiento en ácidos orgánicos de una matriz a base de frutas,
- (b) adición de probióticos a la matriz obtenida tras la etapa a),
- 10 (c) acondicionamiento del producto obtenido tras la etapa b),
- en el que el producto alimenticio acondicionado a base de frutas comprende entre 50% y 99,99% de zumo o de puré de frutas y de probióticos *Lactobacillus plantarum* vivos depositados el 4/04/02 con el número CNCM 1-2845 en la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes,
- 15 el producto alimenticio tiene un contenido en ácidos orgánico disminuido de 10% a 100%, preferentemente de 30% a 70%, más preferentemente de 60%, con respecto al contenido inicial en ácidos orgánicos de la matriz de frutas, y la producción de sabores extraños en el producto alimenticio está reducida o eliminada con respecto a la matriz de frutas inicial.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la etapa a) de empobrecimiento en ácidos orgánicos de la matriz a base de frutas se realiza por medio de la selección de una matriz de frutas de acidez natural baja, siendo dicha matriz una matriz a base de frutas a partir de la cual se obtiene un zumo con una acidez comprendida entre el valor bajo indicado en el "Código de Práctica" de la AIJN y -50% de dicho valor.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que la selección de una matriz de frutas con acidez natural baja se realiza por medio de la selección varietal de las frutas y/o del control de la maduración de las frutas.
- 30 4. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la etapa a) de empobrecimiento en ácidos orgánicos de la matriz a base de frutas se realiza por medio de la desacidificación de la matriz de frutas.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que la disminución de la acidez titulable de la matriz de frutas se realiza por medio de la electrodiálisis de la matriz de frutas, de la precipitación de los ácidos orgánicos de la matriz de frutas con sales de calcio, de la fermentación maloláctica, de la asimilación selectiva de ácido cítrico, y/o del paso de la matriz de frutas por una resina de intercambio aniónico.
- 35 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la etapa b) y la etapa c) se realizan simultáneamente.
- 40 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la matriz a base de frutas es un zumo de frutas, un zumo de frutas reconstituido a base de concentrado, o un puré de frutas.
- 45 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que una etapa de adición de ácido láctico se realizará entre la etapa b) y/o la etapa c) de dicho procedimiento, o simultáneamente con las mismas.
- 50 9. Cepa de *Lactobacillus plantarum* depositada el 4/04/02 con el número CNCM I-2845 en la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes.

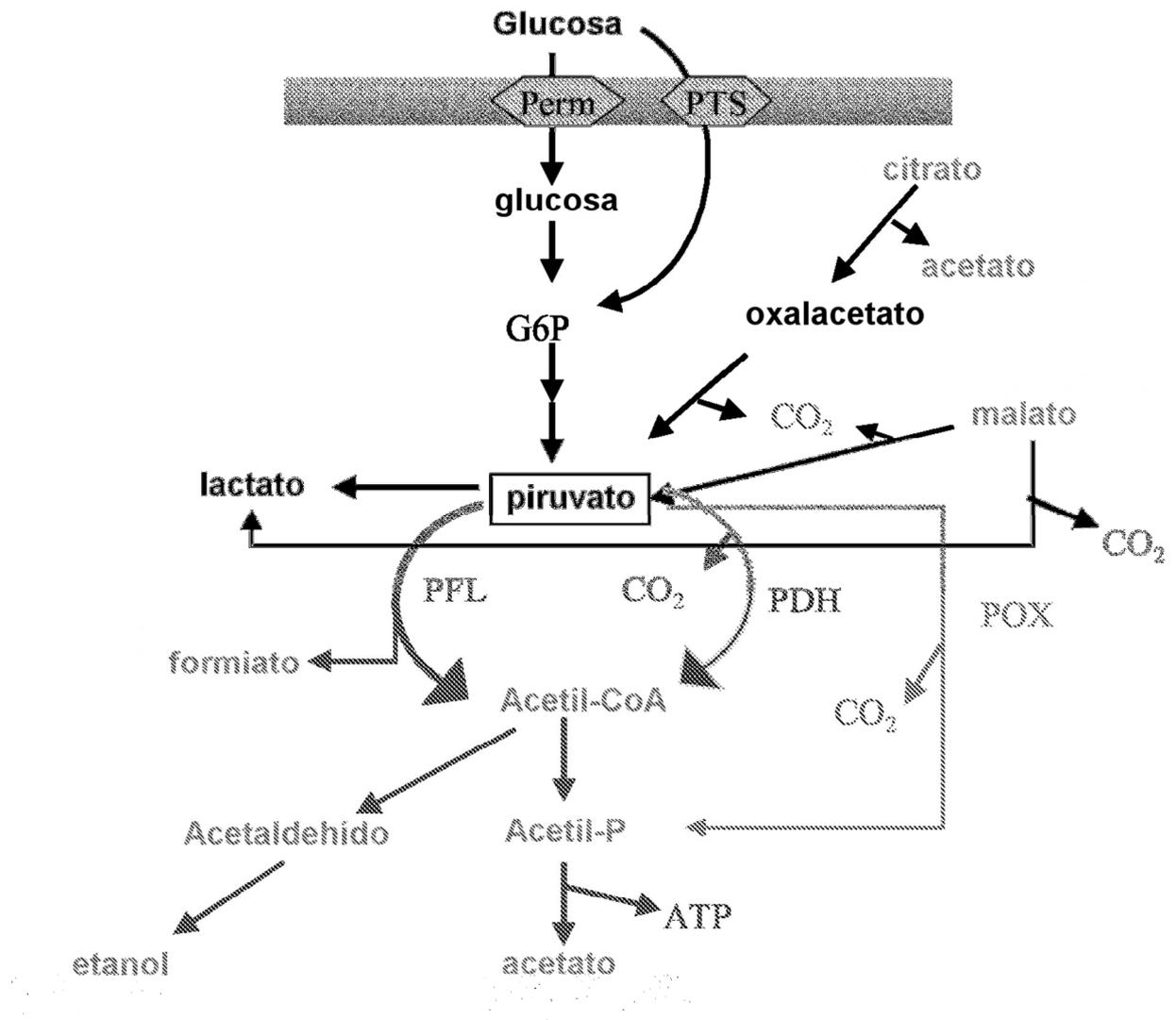


Figura 1