

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 372**

51 Int. Cl.:

A23C 9/123	(2006.01)
A23C 9/12	(2006.01)
A23B 7/10	(2006.01)
A23C 9/13	(2006.01)
A23C 11/10	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2006 PCT/FR2006/001688**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2007 WO07006970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2006 E 06778858 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 1903881**

54 Título: **Procedimiento de preparación de productos alimentarios fermentados que contienen cepas probióticas**

30 Prioridad:
13.07.2005 FR 0507529

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.10.2017

73 Titular/es:
**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17 BOULEVARD HAUSSMANN
75009 PARIS, FR**

72 Inventor/es:
**TERRAGNO, LUC;
DEBRU, FRANÇOIS;
TEISSIER, PHILIPPE;
HERVE, STÉPHANE y
FAURIE, JEAN-MICHEL**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 637 372 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de productos alimentarios fermentados que contienen cepas probióticas

La invención se refiere a un procedimiento de preparación de productos alimentarios fermentados que contienen cepas probióticas.

5 Las bifidobacterias forman parte de la flora anaerobia dominante del colon. Las principales especies presentes en el colon humano son *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum ssp infantis*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum*.

10 Las bifidobacterias son bacterias probióticas de elección. Bacterias del género *Bifidobacterium* se utilizan en numerosos productos actualmente en el mercado y a menudo se añaden a productos lácteos que ya comprenden las bacterias clásicas del yogur (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*).

El consumo de bifidobacterias es reconocido como beneficioso en los procesos de restablecimiento de la población normal de bifidobacterias en personas que hayan sufrido antibioterapia. Este consumo también parece permitir la reducción del estreñimiento, prevención de las diarreas y reducción de los síntomas de la intolerancia a la lactosa.

15 Los probióticos son bacterias vivas. La utilización de estas bacterias vivas en la fabricación de productos alimentarios tales como productos lácteos es delicada principalmente en relación a las problemáticas de supervivencia de estas bacterias en el producto.

20 El 80% de los productos comercializados actualmente que contienen bifidobacterias no respetan los criterios que permiten respaldar que mejoran de forma significativa el tránsito intestinal de las personas que los consumen. Se ha recomendado una toma diaria de al menos 10^8 a 10^9 células viables como dosis mínima que permita tener un efecto terapéutico (Silva A.M., Barbosa F.H., Duarte R., Vieira L.Q., Arantes R.M., Nicoli J.R., Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice, J. Appl. Microbiol. 97 (2004) 29-37). La dosis requerida puede ser dependiente de la cepa probiótica utilizada.

25 En el caso de la fabricación de un producto alimentario bioactivo que contenga bifidobacterias se plantea por lo tanto el problema de obtener una población suficiente de estas bacterias en el producto y de mantenerla a lo largo de la "vida" del producto, sin recurrir a soluciones técnicas susceptibles de alterar las cualidades organolépticas del producto.

30 El problema del tamaño numérico de la población de cepas probióticas en un producto lácteo fermentado es un problema conocido (ver principalmente D. Roy, Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products, Lait 85 (2005) 39-56, INRA, EDP Sciences).

Se han planteado varias razones para este problema entre ellas la disminución de la población durante el almacenamiento, el crecimiento perturbado de estas bacterias a partir de un cierto pH o simplemente la mala capacidad de crecimiento de estas bifidobacterias en particular en la leche.

35 Es conocido que los fructo-oligosacáridos, algunos almidones, algunos azúcares, el glicerol y algunos extractos de levaduras tienen efectos bifidogénicos importantes. Por el contrario, el oxígeno es tóxico para algunas cepas probióticas.

40 A este respecto, se ha descrito la utilización de cisteína o de ascorbato como captador de oxígeno (A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. Talwalkar & Kailasapathy; Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3 (3) 117-124; 2004), sin que se haya demostrado, sin embargo, que la utilización de estas sustancias permita obtener y mantener a lo largo del almacenamiento poblaciones de bifidobacterias en los niveles deseados. Además, se ha observado el efecto potencialmente negativo de la cisteína sobre las propiedades finales de un yogur.

Dave R.I. et al., Journal of Dairy Science, vol. 81, nº 11, (1998) describe los efectos de la adición de cisteína sobre la viabilidad de las bacterias probióticas.

45 De forma general, los productos alimentarios fermentados, que presentan propiedades de mantenimiento relativo de las poblaciones de bifidobacterias a lo largo de la conservación de dichos productos, y que se describen en la bibliografía, generalmente no presentan propiedades organolépticas aceptables, debido principalmente a que sustancias tales como el extracto de levadura están presentes en una concentración elevada en los productos.

La invención está definida en las reivindicaciones 1-26.

50 La invención tiene principalmente como objetivo proporcionar productos alimentarios fermentados que presenten propiedades organolépticas aceptables y que contengan una alta concentración de bifidobacterias al final del periodo de fermentación y durante todo el periodo de conservación de dichos productos alimentarios fermentados.

La invención tiene por lo tanto también como objetivo proporcionar productos alimentarios fermentados que contengan bifidobacterias en buen estado fisiológico y que presenten una tasa de supervivencia alta a lo largo del periodo de conservación de dichos productos alimentarios fermentados, en particular hasta la fecha límite de consumo de los productos.

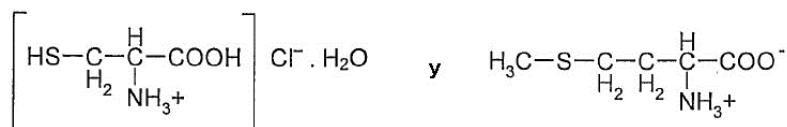
- 5 Otro objetivo de la invención es el de proporcionar procedimientos de preparación sencillos de realizar que permitan obtener los productos anteriores.

Otro objetivo de la invención es favorecer el crecimiento de las bifidobacterias en relación con las simbiosis clásicas presentes en los yogures, estando constituidas estas simbiosis de forma clásica por una o varias cepas de *Streptococcus thermophilus* y de *Lactobacillus bulgaricus*.

- 10 Los objetivos de la invención se consiguen gracias a la constatación sorprendente efectuada por los inventores de que la incorporación de aminoácidos sulfurados en la materia de partida durante la preparación de productos alimentarios fermentados que contienen bifidobacterias, en cantidad suficientemente baja para no alterar las propiedades organolépticas de los productos, permite obtener rápidamente después de fermentación poblaciones de al menos $5 \cdot 10^7$, incluso 10^8 bifidobacterias por gramo de producto, y una supervivencia aumentada de bifidobacterias hasta la fecha límite de consumo de los productos, sin modificar necesariamente el crecimiento de otras cepas bacterianas.

Por "aminoácido sulfurado" se entiende la cisteína (L-cisteína) o la metionina así como sus derivados, eventualmente en forma de sal.

- 20 En particular se podrán utilizar según la invención el hidrocloreto monohidratado de L-cisteína (monohidrocloreto monohidratado de ácido (R)-2-amino-mercaptopropiónico) o la L-metionina (ácido (S)-2-amino-4-metiltio-butírico), de fórmulas respectivas:



Por "en forma libre" se entienden aminoácidos que no están ligados a otros aminoácidos por unión peptídica en los péptidos, polipéptidos o proteínas.

- 25 Preferentemente, los aminoácidos sulfurados según la invención se utilizan en forma reducida, es decir que se reduce el grupo sulfhidrilo -SH. Esta forma preferida de aminoácidos sulfurados excluye por lo tanto en particular la cistina, forma oxidada de la cisteína que consiste en la asociación de dos cisteínas por medio de un puente disulfuro.

- 30 Como las bifidobacterias están esencialmente desprovistas de actividad proteolítica, es ventajoso utilizar los aminoácidos mencionados anteriormente en forma libre para que puedan ser asimilados directamente por las bifidobacterias.

- 35 El o los aminoácidos sulfurados utilizados según la invención son ventajosamente filtrados previamente y/o tratados en autoclave (o pasteurizados, es decir tratados a una temperatura superior a 50°C) y/o previamente irradiados, con el fin de respetar las restricciones de uso en materia de contaminación microbiológica, es decir para que estén esencialmente desprovistos de contaminantes microbianos.

Si los aminoácidos sulfurados se utilizan a una concentración superior a 75 mg/l, se constata una degradación de las propiedades organolépticas del producto alimentario.

- 40 Si los aminoácidos sulfurados se utilizan a una concentración inferior a 5 mg/l, la población de bifidobacterias superior a $5 \cdot 10^7$ ó 10^8 UFC por gramo de producto generalmente no se puede mantener durante el periodo de conservación del producto.

- 45 Es importante señalar que la concentración de aminoácidos sulfurados utilizados según la invención se refiere al o a los aminoácidos sulfurados especialmente añadidos durante la preparación de los productos. Esta concentración no tiene en cuenta la eventual producción bacteriana de aminoácidos sulfurados durante la preparación ni tampoco la cantidad de aminoácidos sulfurados en forma libre que están naturalmente presentes en la materia de partida que sirve para preparar el producto alimentario (por ejemplo en la leche) o en los adyuvantes que pueden intervenir a lo largo de la preparación.

- 50 La concentración normal de aminoácidos sulfurados presentes en la leche es de 100 a 1.300 mg/l de ellos aproximadamente 260 mg de la cisteína y 1.020 mg/l de metionina (Handbook of Milk composition, 1995, Academic Press). Hay que señalar que la gran mayoría de estos aminoácidos sulfurados presentes en la leche están en forma ligada en las cadenas peptídicas o proteicas.

Por "fermentos" se entiende el conjunto de bacterias, principalmente bacterias destinadas a la fermentación y/o bacterias de valor probiótico.

5 Por "propiedades organolépticas aceptables" se entiende principalmente la ausencia de falso gusto de tipo sulfurado, tal como se determina por un ensayo estándar de análisis sensorial, que puede corresponder al protocolo descrito a continuación.

10 El mecanismo sensorial comienza con la generación de un estímulo después del consumo de un producto. Este estímulo permite una percepción que será dependiente en el individuo consumidor de factores genéticos y fisiológicos. Esta percepción se verbaliza a continuación (se propone una lista de palabras al consumidor) y luego se cuantifica (utilización de intervalos). El consumidor da entonces una estimación global del producto que ha consumido (esta estimación estará influenciada por su cultura, sus experiencias) y dice si estaría dispuesto o no a comprar este producto (se pueden entonces aportar datos como el coste y la comunicación relativa a este producto).

El análisis sensorial es una ciencia basada en la percepción (fisiológica y psicológica) que implica los cinco sentidos (gusto, olfato, visión, audición, tacto) y que utiliza protocolos muy rigurosos.

15 Los consumidores que forman el panel que hacen los análisis sensoriales son seleccionados por sus capacidades sensoriales, sus capacidades en términos de verbalización, sus capacidades en términos de utilización de intervalos para una evaluación y sus capacidades de trabajo en grupo (para obtener consenso). Es absolutamente necesario verificar que las evaluaciones de los miembros del panel son repetibles, reproducibles, con una homogeneidad en términos de discriminación y en términos de clasificación. Ensayos que permiten
20 verificar estos pre-requisitos se repiten varias veces. La elección de los productos se hace según tres criterios principales: según la edad del producto (se eligen los productos de una misma edad), estos productos deben ser representativos en el caso de una evaluación estándar y los productos son homogéneos (pocas diferencias entre ellos). Estos productos se presentan de forma anónima y codificada, en un cierto orden y de forma homogénea (misma temperatura...).

25 Las condiciones medioambientales del análisis sensorial son importantes: es necesario estandarizar bien el aire acondicionado, la iluminación, el entorno sonoro, la decoración (neutra si es posible), el olor de la habitación en la que se va a efectuar el análisis. Los miembros del panel están en compartimentos separados. No deben fumar, ni consumir café ni mentol en las horas anteriores a la sesión del análisis. Tampoco tienen que perfumarse ni maquillarse.

30 Al finalizar este análisis, un producto se considera como de "propiedades organolépticas aceptables" si los miembros del panel no han detectado falso gusto de tipo gusto sulfurado en este producto.

35 El periodo de conservación o de almacenamiento del producto alimentario fermentado es el periodo que sigue inmediatamente al final del proceso de preparación del producto alimentario fermentado y su envasado. Durante este periodo de conservación el producto alimentario fermentado se conserva normalmente a temperatura comprendida entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10°C.

40 El producto alimentario fermentado mencionado anteriormente contiene más de $5 \cdot 10^7$, en particular más de 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimentario fermentado en particular durante un periodo de conservación de al menos 40 días. Más particularmente, el producto alimentario fermentado mencionado anteriormente contiene más de $5 \cdot 10^7$, en particular más de 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimentario fermentado hasta la fecha límite de consumo del producto.

Las fechas límite de consumo dependen de los tiempos de duración legales de conservación fijados por la legislación en vigor, que pueden variar normalmente de 15 a 50 días a partir de la fecha de fabricación. A modo de ejemplo, la duración legal de conservación generalmente es de 30 días para los productos lácteos frescos.

45 Una población de bifidobacterias que es superior o igual a 10^8 UFC/g en la fecha límite de consumo (F.L.C.) del producto conservado entre 4 y 10°C se puede considerar como una población suficiente de bifidobacterias teniendo en cuenta las recomendaciones médicas relativas al aporte de bifidobacterias en la alimentación.

50 Por "no contiene más de 0,5% de extracto de levadura o de autolisado de levadura" se entiende en particular que el producto alimentario fermentado mencionado anteriormente no contiene más de 0,5% de extracto de levadura o de autolisado de levadura a la finalización de su procedimiento de preparación y/o que el producto alimentario fermentado mencionado anteriormente no contiene más de 0,5% de extracto de levadura o de autolisado de levadura durante la duración de conservación de al menos 30 días, en particular de al menos 35 días, en particular de al menos 40 días o hasta la fecha límite de consumo, del producto alimentario fermentado mencionado anteriormente. Además, el producto alimentario fermentado mencionado anteriormente no contiene
55 tampoco una cantidad superior a 0,5% de extracto de levadura o de autolisado de levadura durante el procedimiento de preparación del producto, y principalmente en el momento de inoculación de las bacterias y durante toda la fermentación.

Por "extracto de levadura" y "autolisado de levadura" se entienden concentrados de los compuestos solubles de las células de levadura. Se remite a este respecto principalmente al artículo "Yeast extracts: production, properties and components" de Rolf Sommer (9th International Symposium on Yeasts), de donde se extraen las informaciones siguientes.

5 Los extractos de levadura se producen principalmente de autólisis, es decir que la hidrólisis celular se efectúa sin adición de otras enzimas. El extracto de levadura o el autolisado de levadura se utilizan principalmente en la industria de la fermentación y en la industria agro-alimentaria. El principal material de base utilizado para fabricar el extracto de levadura está formado por levaduras de gran concentración de proteínas (cepas de *Saccharomyces cerevisiae*) cultivadas en medios a base de molasa o está formado por levaduras de cerveza desamargada (cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o de *Saccharomyces uvarum*). Otros materiales de base utilizados son las levaduras tales como *Kluyveromyces fragilis* (fermentada sobre lactosuero) o *Candida utilis* (cultivada sobre desechos ricos en glúcidos resultantes de la industria de la madera o sobre etanol) o incluso cepas especiales de levaduras de panadería, para producir el extracto de levadura que contiene nucleótidos 5'.

10 La autólisis es el procedimiento de disociación que se usa más frecuentemente en la producción de extracto de levadura. Durante este procedimiento, las levaduras son degradadas por sus propias enzimas endógenas. El procedimiento de autólisis se puede iniciar por un choque osmótico o de temperatura controlada, que provoca la muerte celular sin inactivar las enzimas endógenas (en particular las proteasas). Un pH controlado, la temperatura y la duración de la autólisis son factores decisivos en un procedimiento de autólisis estandarizado. Añadiendo sales o enzimas (por ejemplo proteasas o mezclas de proteasas y peptidasas) en relación con la autólisis "clásica", se puede controlar la degradación proteica de las células de levaduras.

15 Además de la autólisis, el extracto de levadura se puede producir por termólisis (por ejemplo haciendo hervir las levaduras en agua a 100°C), plasmólisis (tratamiento con disoluciones muy salinas a una temperatura inferior a 100°C) y degradación mecánica (homogeneización a alta presión o trituración).

20 Después los compuestos solubles se separan de las paredes celulares insolubles y se concentran en evaporador con agitación o evaporador de película descendente. A continuación siguen unas etapas eventuales de filtración, de concentración a vacío parcial y de esterilización rápida. Existen tres tipos de extractos de levadura: el extracto de levadura líquida (materia seca: 50 a 65%); el extracto de levadura de tipo pasta viscosa (materia seca: 70 a 80%); y el extracto de levadura en polvo seco.

25 Si se toma el ejemplo de un extracto de levadura en polvo estándar utilizado en la industria de la fermentación, la composición es la siguiente:

Contenido proteico:	73-75%
Sodio:	menos de 0,5%
Polisacáridos:	menos de 5%
Oligosacáridos:	menos de 1%
Lípidos:	menos de 0,5 %

El contenido proteico se reparte normalmente de la siguiente manera:

Aminoácidos libres:	35-40%
Di, tri y tetrapéptidos (PM <600 Da):	10-15%
Oligopéptidos (PM de 2.000-3.000 Da):	40-45%
Oligopéptidos (PM de 3.000-100.000 Da):	2-5%

El contenido normal de cisteína es de 0,45%, y el contenido normal de metionina es de 1,12% (1,08% en forma libre).

35 Se prefiere la utilización de al menos un aminoácido sulfurado, a una concentración total de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular de aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l, y principalmente 12,5 mg/l, en forma libre, para la realización de un procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado por medio de fermentos que contienen bifidobacterias, cuyo producto alimentario fermentado presenta propiedades organolépticas aceptables, contiene más de aproximadamente $5 \cdot 10^7$, en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias

por gramo de producto alimentario fermentado durante un periodo de conservación de al menos 30 días, en particular de al menos 35 días y no contiene más de 0,5% de extracto de levadura o de autolisado de levadura.

5 Por otra parte, se puede preferir un producto alimentario fermentado, que presenta propiedades organolépticas aceptables, que contiene fermentos que comprenden más de aproximadamente $5 \cdot 10^7$, en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimentario fermentado durante un periodo de conservación de al menos 30 días, en particular de al menos 35 días y que presenta una concentración total de aminoácidos sulfurados en forma libre de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular de aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l, y principalmente 12,5 mg/l.

Más particularmente, dicho producto alimentario fermentado contiene fermentos que comprenden más de aproximadamente $5 \cdot 10^7$, en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimentario fermentado durante un periodo de conservación de al menos 40 días o hasta la fecha límite de consumo del producto alimentario fermentado.

15 Ventajosamente, el producto alimentario fermentado tal como se ha definido anteriormente es tal que la relación entre el número de bifidobacterias contenidas en el producto alimentario fermentado al final del periodo de conservación y el número de bifidobacterias contenidas en el producto alimentario fermentado al comienzo del periodo de conservación de al menos 30 días, en particular de al menos 35 días es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,8 en particular de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,7 y en particular de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,5.

En otros términos el índice de supervivencia de las bifidobacterias contenidas en el producto alimentario fermentado entre el comienzo del periodo de conservación (es decir el final del procedimiento de preparación) y el final del periodo de conservación está comprendido entre 20 y 80%, en particular entre 30 y 70%, y en particular entre 40 y 50%.

25 Dicho periodo de conservación es de al menos 30 días, en particular de al menos 35 días, pero más particularmente de al menos 40 días o se extiende al menos hasta la fecha límite de consumo del producto alimentario fermentado.

30 Se considera también un producto alimentario fermentado conservado durante un periodo de conservación de al menos 30 días, en particular de al menos 35 días, a una temperatura de aproximadamente 4 a aproximadamente 10°C , que presenta propiedades organolépticas aceptables y que contiene fermentos que comprenden más de aproximadamente $5 \cdot 10^7$, en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimentario fermentado.

35 Más particularmente, se puede considerar un producto alimentario fermentado conservado durante un periodo de conservación de al menos 30 días, en particular de al menos 35 días, en particular de al menos 40 días, a una temperatura de menos de 12°C o de menos de 10°C , que presenta propiedades organolépticas aceptables y que contiene fermentos que comprenden más de aproximadamente $5 \cdot 10^7$, en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimentario fermentado.

40 De forma preferida, se considera un producto alimentario fermentado tal como se ha definido anteriormente que contiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular de aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l, y principalmente 12,5 mg/l, de aminoácidos sulfurados y principalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular de aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l, y principalmente 12,5 mg/l de cisteína y/o de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg/l, de metionina.

50 Con el fin de dosificar la cisteína, es posible utilizar un analizador de aminoácidos tal como el L-8800 High Speed Amino Acid Analyzer (Hitachi High Technologies). Este analizador asocia una cromatografía de intercambio de iones con una detección colorimétrica a dos longitudes de onda (570 y 440 nm) después de reacción con la ninhidrina. También se puede recurrir a la cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectrometría de masa o una cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a una detección fluorimétrica.

La utilización más particular de cisteína es ventajosa ya que da lugar experimentalmente a un mejor efecto bifidogénico que la metionina.

55 La utilización más particular de metionina es ventajosa ya que su coste es menos elevado que el de la utilización de la cisteína.

Ventajosamente, dicho producto alimentario fermentado contiene menos de aproximadamente 0,5% (p/p) de sustancias que contienen más de aproximadamente 1,7% de aminoácidos sulfurados libres.

5 Más particularmente, dicho producto alimentario fermentado contiene menos de aproximadamente 0,5% (p/p) de extracto de levadura y/o de autolisado de levadura y/o de hidrolizado de proteínas de leche, de vegetales, de soja.

10 La presencia eventual de sustancias de tipo extracto de levadura o autolisado de levadura se detecta fácilmente en el producto mediante métodos conocidos. En particular, son detectables los glucanos o los mananos aportados por estas sustancias. Por ejemplo, al ser los glucanos y mananos fibras, se puede recurrir al método de dosificación de fibras alimentarias totales, propuesto por AFSSA (método AOAC 985.29). La adición de extracto de levadura o de una sustancia análoga también se debe traducir por una modificación completa del contenido en el conjunto de los 20 aminoácidos en el producto, así como por una modificación de la concentración de vitaminas y minerales, con relación a la composición normal del producto (para el ejemplo de la leche, se hace referencia principalmente al Handbook of Milk Composition, 1995, Academic Press).

15 Según un modo de realización preferido, las bifidobacterias contenidas en el producto alimentario fermentado tal como se ha definido anteriormente son del tipo *Bifidobacterium animalis*, principalmente *Bifidobacterium animalis animalis* y/o *Bifidobacterium animalis lactis*, y/o *Bifidobacterium breve* y/o *Bifidobacterium longum* y/o *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium bifidum*.

20 Ventajosamente, el producto alimentario fermentado tal como se ha definido anteriormente es a base de zumo vegetal y principalmente zumo de fruta o zumo de legumbre tal como zumo de soja, o de producto lácteo y principalmente de leche de vaca y/o de leche de cabra.

Dicho producto alimentario fermentado también puede ser a base de leche de oveja, de leche de camella o de leche de yegua.

Por zumo vegetal se entiende un zumo realizado a partir de extractos vegetales, principalmente de soja, de tonyu, de avena, de trigo, de maíz, ...

25 Ejemplos de zumo de legumbre son: el zumo de tomate, el zumo de remolacha, el zumo de zanahoria...

Ejemplos de zumos de fruta son: el zumo de manzana, de naranja, de fresa, de melocotón, de albaricoque, de ciruela, de frambuesa, de moras, de grosella, de piña, de limón, de cítricos, de pomelo, de plátano, de kiwi, de pera, de cereza, de maracuyá, de mango, de fruta exótica, el zumo multifruta...

30 Según el procedimiento de la invención, los fermentos del producto alimentario fermentado tal como se ha definido anteriormente contienen bacterias del género *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*.

35 Según un modo de realización preferido, los fermentos del producto alimentario fermentado tal como se ha definido anteriormente contienen bacterias lácticas, en particular una o varias bacterias del género *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, y *Lactobacillus casei* y/o *Lactobacillus reuteri* y/o *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus helveticus* y/o *Lactobacillus plantarum*, y/o bacterias del tipo *Lactococcus cremoris* y/o *Streptococcus thermophilus* y/o *Lactococcus lactis* y/o una o varias bacterias del género *Leuconostoc*.

Ventajosamente, el producto alimentario fermentado tal como se ha definido anteriormente es tal que la proporción de bifidobacterias en los fermentos es de aproximadamente 20 a aproximadamente 80%, principalmente de aproximadamente 30 a aproximadamente 70%, principalmente de aproximadamente 40 a aproximadamente 60%, y principalmente de aproximadamente 50%.

40 Por "proporción de bifidobacterias en los fermentos" se entiende la proporción de las bifidobacterias en relación al número total de bacterias incluidas en el producto alimentario fermentado, es decir en relación al conjunto de las bifidobacterias y de las otras bacterias, principalmente las bacterias *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*...

45 El buen equilibrio numérico entre las bifidobacterias y las otras cepas bacterianas en el producto alimentario fermentado al finalizar el procedimiento de preparación, y el mantenimiento sustancial de este equilibrio a lo largo del periodo de conservación, son garantes esenciales de la calidad del producto alimentario.

Una proporción de 50% de bifidobacterias constituye un buen compromiso entre las problemáticas de coste (las bifidobacterias cuestan caro) y las problemáticas de obtención de una población correcta de bifidobacterias.

50 Según un modo de realización preferido, el producto alimentario fermentado tal como se ha definido anteriormente se presenta en forma de un producto alimentario fermentado batido o de un producto alimentario fermentado bebible o de un producto alimentario fermentado firme o de un producto alimentario fermentado infantil.

Por "producto [...] batido se entiende un producto, principalmente una leche, sembrada, fermentada, batida mecánicamente y luego envasada. La fermentación de dicho producto no se efectúa en un recipiente, sino a granel, en cubas. La cuajada se bate y luego se enfría antes de ser envasada en recipientes, que se almacenan en frío. Por cuajada se entiende un coágulo de proteínas principalmente de leche.

- 5 Por "producto [...] bebible" se entiende un producto en forma esencialmente líquida. Un producto bebible es un producto tal que, después de la etapa de batido mecánico, el producto se bate en las cubas antes de ser envasado.

- 10 Por "producto [...] firme" se entiende un producto (principalmente leche) sembrada y directamente envasada en los recipientes en los que se fermenta. Después de la siembra, el producto se envasa en recipientes. Estos recipientes se pasan a continuación por lo general a la estufa durante 3 horas. Las bacterias se reproducen y consumen la lactosa que se transforma entonces parcialmente en ácido láctico, lo que modifica la estructura de las proteínas, formando lo que se llama el "gel láctico". Los recipientes pasan a continuación a una cámara fría ventilada o por un túnel de enfriamiento y se almacenan a 2-4°C.

- 15 Por "producto [...] infantil" se entiende un producto adaptado a las necesidades del lactante, con bajo contenido de proteínas y de grasa.

Dicho producto alimentario fermentado puede ser principalmente un yogur o un yogur firme, batido o bebible o una barra que contiene materia láctea, kéfir, galleta con un relleno lácteo, agua que contiene probióticos...

La invención se refiere a un procedimiento de preparación de un producto lácteo alimentario fermentado a partir de una materia de partida, que comprende

- 20 - una etapa de siembra de una materia de partida, eventualmente pasteurizada, por inoculación de fermentos de siembra que contienen bifidobacterias y bacterias del género *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, para obtener una materia sembrada,

- una etapa de fermentación de la materia sembrada obtenida en la etapa anterior de forma que se obtenga una materia fermentada,

- 25 -una etapa de incorporación de al menos un aminoácido sulfurado en forma libre a una concentración de 5 a 30 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular de aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l, y principalmente 12,5 mg/l, pudiendo intervenir esta etapa de incorporación

- bien antes de la etapa de siembra,

- 30 - bien esencialmente de forma simultánea a la etapa de siembra,

- o bien después de la etapa de siembra y antes de la etapa de fermentación, siempre que el producto alimentario fermentado no contenga más de 0,5% (p/p) de extracto de levadura y/o de autolisado de levadura.

- 35 Por "fermentación" se entiende una reacción bioquímica que consiste en liberar energía a partir de un sustrato orgánico, bajo la acción de microorganismos. Se trata de un procedimiento de transformación de una materia prima por los microorganismos, produciendo entonces esta transformación biomasa y metabolitos. En particular, la fermentación láctica es un proceso anaerobio de consumo de lactosa por las bacterias de los fermentos, lo que provoca la formación de ácido láctico y un descenso del pH.

- 40 La invención procede de la constatación sorprendente efectuada por los inventores de que la incorporación de aminoácidos sulfurados en los intervalos citados anteriormente, en ausencia de extracto de levadura y/o de autolisado de levadura o en presencia de una concentración baja de éstos, permite mejorar la resistencia de las bifidobacterias y su capacidad de sobrevivir. Las bifidobacterias contenidas en el producto alimentario fermentado a la finalización del procedimiento de preparación de la invención están en mejor estado fisiológico que si la etapa de incorporación de aminoácidos sulfurados fuese omitida, lo que permite a un mayor número de estas bifidobacterias sobrevivir a lo largo de la conservación del producto alimentario fermentado siguiente.

- 45 La cisteína y/o la metionina tienen por lo tanto en efecto bifidogénico específico. Por el contrario, la utilización de extracto de levadura y/o de autolisado de levadura, principalmente en concentraciones superiores a 0,5% (p/p), tiene tendencia a estimular al conjunto de las bacterias contenidas en el producto alimentario fermentado, lo que puede conducir a un desequilibrio de la simbiosis bacteriana en perjuicio de las bifidobacterias, y a favor principalmente, si están presentes, de las bacterias lácticas. Las consecuencias de este desequilibrio son una modificación del pH, una producción de ácido acético y/o de H₂O₂, todos ellos hechos perjudiciales para la calidad del producto.

- 50 Por otra parte, hay que señalar que a partir de una concentración de aminoácidos sulfurados superior a 30 mg/l, en particular de una concentración de aminoácidos sulfurados superior a 50 mg/l, y más particularmente a partir

- de una concentración de aminoácidos sulfurados superior a 75 mg/l, se ha constatado una degradación neta de las propiedades organolépticas de los productos alimentarios. Esta degradación se ha constatado por medio de un ensayo de gusto estándar tal como se ha descrito anteriormente, que revela la existencia de un gusto sulfurado susceptible de hacer los productos inadecuados para el consumo y la comercialización. Es importante señalar que el gusto sulfurado desagradable se produce principalmente en el caso de incorporación de cisteína y/o de metionina en más de 75 mg/l, incluso en ciertos casos con más de 50 ó 30 mg/l, pero también cuando las concentraciones de aminoácidos sulfurados sobrepasan dichos valores debido a la presencia de sustancias suplementarias, por ejemplo del extracto de levadura o del autolisado de levadura, principalmente a razón de más de 0,5% (p/p).
- 5 Otra característica importante del procedimiento de la invención es que la incorporación de los fermentos que contienen bifidobacterias se hace directamente en la materia de partida destinada a convertirse en el producto alimentario fermentado, sin recurrir necesariamente a medios artificiales/sintéticos de crecimiento intermedio.
- Según un modo de realización particular, el procedimiento tal como se ha definido anteriormente no comprende una etapa de adición de sustancias suplementarias que contengan uno o varios aminoácidos sulfurados.
- 15 Según otro modo de realización particular, el procedimiento tal como se ha definido anteriormente comprende una etapa de adición de sustancias suplementarias que contienen uno o varios aminoácidos sulfurados en forma libre, siendo la concentración de aminoácidos sulfurados en forma libre en las sustancias suplementarias inferior a aproximadamente 1,7%, preferentemente inferior a aproximadamente 0,5%, y siendo la concentración de dichas sustancias suplementarias en el producto alimentario fermentado inferior a aproximadamente 0,5%.
- 20 Más particularmente, dicha etapa de adición de sustancias suplementarias puede consistir en una adición de un extracto de levadura y/o de un autolisado de levadura y/o de un hidrolizado de proteínas de leche, de vegetales, de soja, a una concentración inferior a aproximadamente 0,5% (p/p).
- De forma preferida, esta etapa de adición de sustancias suplementarias tiene lugar antes de la etapa de fermentación, por ejemplo esencialmente de forma simultánea a la etapa de siembra y/o simultáneamente a la etapa de incorporación de al menos un aminoácido sulfurado.
- 25 El interés de una adición esencialmente de forma simultánea a la etapa de siembra y/o simultáneamente a la etapa de incorporación de al menos un aminoácido sulfurado es de orden práctico. En este caso, las sustancias suplementarias de tipo extracto de levadura son al menos parcialmente degradadas a lo largo de la fermentación, ya que sirven de aporte nutricional para los fermentos. Así, la concentración de las sustancias suplementarias de tipo extracto de levadura varía a lo largo de la fermentación.
- 30 Ventajosamente, el procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado tal como se ha definido anteriormente comprende también una etapa de pasteurización que tiene lugar antes de la etapa de siembra, permitiendo obtener una materia de partida pasteurizada a partir de la materia de partida.
- 35 Por "pasteurización" se entiende el método habitual en el campo de la conservación de los alimentos que consiste en un calentamiento rápido sin ebullición, seguido de un enfriamiento brusco, que permite la destrucción de la mayor parte de las bacterias a la vez que se conservan parcialmente las proteínas.
- Según un modo de realización particular, la etapa de incorporación de al menos un aminoácido sulfurado tiene lugar antes de la etapa de pasteurización, incorporándose el o los aminoácidos sulfurados en una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular de aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l, y principalmente 12,5 mg/l.
- 40 El interés de una incorporación antes de la etapa de pasteurización es de orden práctico.
- Según otro modo de realización particular, la etapa de incorporación de al menos un aminoácido sulfurado tiene lugar esencialmente de forma simultánea a la etapa de siembra, incorporándose el o los aminoácidos sulfurados a una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular de aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l, y principalmente 12,5 mg/l.
- 45 El interés de una incorporación esencialmente de forma simultánea a la etapa de siembra es de orden económico (el o los aminoácidos sulfurados no se destruyen parcialmente mediante un tratamiento eventual térmico o pasteurización antes de la siembra) y de orden práctico.
- 50 Según otro modo de realización particular, la etapa de incorporación de al menos un aminoácido sulfurado tiene lugar después de la etapa de siembra y antes de la etapa de fermentación, incorporándose el o los aminoácidos sulfurados a una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 20
- 55

mg/l, en particular de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular de aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l, y principalmente 12,5 mg/l.

5 El interés de una incorporación después de la etapa de siembra y antes de la etapa de fermentación es de orden práctico y asegura un aumento de la supervivencia de las bifidobacterias durante el almacenamiento del producto.

10 Hay que señalar que en el caso en el que la incorporación del o de los aminoácidos sulfurados tenga lugar antes de la etapa de pasteurización, la cantidad de aminoácidos sulfurados que se van a incorporar debe aumentarse en aproximadamente 30 a 50% en relación al caso en el que esta incorporación tenga lugar después de la eventual etapa de pasteurización, es decir principalmente de forma sustancial simultáneamente a la etapa de siembra o después de la etapa de siembra. En efecto, en el primer caso una parte de los aminoácidos sulfurados se destruye durante la pasteurización.

15 En otros términos, la parte superior del intervalo de concentración de aminoácidos sulfurados de 50-75 mg/l que está incluida en el intervalo de concentración de aminoácidos sulfurados prevista en la invención se refiere más específicamente al caso en el que la incorporación de los aminoácidos sulfurados tenga lugar previamente a una etapa de pasteurización.

20 Hay que señalar que se puede considerar dividir la etapa de incorporación de aminoácidos sulfurados en dos subetapas o más, que pueden intervenir eventualmente en momentos diferentes en el procedimiento según la invención. La concentración de aminoácidos sulfurados que está indicada anteriormente corresponde por lo tanto a la concentración total de aminoácidos sulfurados al finalizar las diferentes subetapas de incorporación de aminoácidos sulfurados.

25 Según un modo de realización preferido, el procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado tal como se ha definido anteriormente comprende una etapa de adición de una preparación intermedia simultáneamente a la etapa de siembra o entre la etapa de siembra y la etapa de fermentación, de forma que se obtenga, a partir de la materia sembrada, una materia sembrada completada, o después de la etapa de fermentación, de forma que se obtenga, a partir de la materia fermentada, una materia fermentada completada, comprendiendo dicha preparación intermedia una preparación de frutas y/o de cereales y/o de aditivos tales como aromas y colorantes, y pudiendo tener lugar dicha etapa de adición de una preparación intermedia de forma simultánea a la etapa de incorporación de al menos un aminoácidos sulfurado.

30 La preparación intermedia puede contener principalmente espesantes (fibras solubles e insolubles, alginatos, carragenanos, goma xantana, pectina, almidón, principalmente gelatinizada, goma gelana, celulosa y sus derivados, goma de guar y de algarroba, inulina) o edulcorantes (aspartamo, acesulfamo K, sacarina, sucralosa, ciclamato) o conservantes.

Ejemplos de aromas son: el aroma de manzana, naranja, fresa, kiwi, coco...

Ejemplos de colorantes son: el beta caroteno, el carmín, el rojo de cochinilla.

35 Además, la preparación de frutas anteriormente citadas puede comprender frutas enteras o en trozos o en gelatina o en confitura, permitiendo por ejemplo obtener yogures de frutas.

La preparación intermedia puede también contener extractos vegetales (soja, arroz...).

40 Según otro modo de realización de la invención, la etapa de siembra comprende la inoculación de fermentos de siembra que contienen aproximadamente de 10^6 a aproximadamente $2 \cdot 10^8$, más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 bifidobacterias, por ml (o por gramo) de materia de partida.

Si se inocula una cantidad de bifidobacterias superior a este intervalo, son susceptibles de desarrollarse falsos gustos de tipo ácido acético. Si se inocula una cantidad de bifidobacterias inferior a este intervalo, la cantidad final de bifidobacterias es insuficiente.

45 Ventajosamente, en el procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado según la invención, las bifidobacterias se eligen entre las bacterias de tipo *Bifidobacterium animalis*, principalmente *Bifidobacterium animalis animalis* y/o *Bifidobacterium animalis lactis*, y/o *Bifidobacterium breve* y/o *Bifidobacterium longum* y/o *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium bifidum*.

De forma particularmente preferida, en el procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado según la invención, las bifidobacterias se eligen entre las bacterias de tipo *Bifidobacterium animalis*.

50 Ventajosamente, en el procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado según la invención, los fermentos de siembra contienen bacterias lácteas, en particular una o varias bacterias del género *Lactobacillus spp.* y principalmente *Lactobacillus delbrueckii bularicus* y/o *Lactobacillus casei* y/o *Lactobacillus reuteri* y/o *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus helveticus* y/o *Lactobacillus plantarum*, y/o las bacterias del

tipo *Lactococcus cremoris* y/o *Streptococcus thermophilus* y/o *Lactococcus lactis* y/o una o varias bacterias del género *Leuconostoc*.

5 Según un modo de realización ventajoso del procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado de la invención, la proporción de las bifidobacterias en los fermentos de siembra es de aproximadamente 20 a aproximadamente 75%, principalmente de aproximadamente 30 a aproximadamente 50%, principalmente de aproximadamente 35 a aproximadamente 40%, y principalmente de aproximadamente 37,5%.

Por "proporción de bifidobacterias en los fermentos de siembra", se entiende la proporción de las bifidobacterias en relación al conjunto total de bacterias inoculadas durante la etapa de siembra.

10 Esta proporción corresponde a un óptimo en términos de coste y de concentración final de bifidobacterias dado que cuanto más elevada sea la concentración de bifidobacterias al comienzo, más ventaja tienen en la competición en términos de crecimiento en relación con otras cepas de fermentos, y la concentración óptima de bifidobacterias se alcanza más rápidamente.

15 Según un modo de realización preferido del procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado de la invención, la materia de partida es a base de zumo vegetal y principalmente zumo de fruta o zumo de legumbre tal como el zumo de soja, o producto lácteo y principalmente de leche de vaca y/o leche de cabra.

La materia de partida también puede comprender leche de oveja y/o leche de camella y/o leche de yegua.

20 Siendo el producto alimentario fermentado un producto lácteo, la materia de partida puede comprender leche, polvo de leche, azúcar, una mezcla de leche y de zumo vegetal, una mezcla de leche y de zumo de fruta, una mezcla de leche y de almidón.

Ventajosamente, el procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado según la invención es tal que la materia de partida pasteurizada es una materia de partida pasteurizada, ambientada, opcionalmente homogeneizada, y enfriada, obtenida a partir de una materia bruta, comprendiendo dicho procedimiento antes de la etapa de siembra las siguientes etapas sucesivas:

25 - una etapa de estandarización en materia grasa de la materia bruta de forma que se obtenga una materia estandarizada,

- una etapa de enriquecimiento en materia seca de la materia estandarizada obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga una materia enriquecida,

30 - una etapa de precalentamiento de la materia enriquecida obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga una materia de partida,

- una etapa de pasteurización y de ambientación de la materia de partida obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga una materia pasteurizada y ambientada,

35 - una etapa opcional de homogeneización de la materia pasteurizada y ambientada obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga una materia pasteurizada, ambientada y opcionalmente homogeneizada,

- una etapa de enfriamiento inicial de la materia pasteurizada, ambientada y opcionalmente homogeneizada obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga una materia de partida pasteurizada, ambientada, opcionalmente homogeneizada y enfriada.

40 Por "estandarización en materia grasa" se entiende una etapa de actualización predeterminada de la cantidad de materia grasa presente en la materia de partida.

El enriquecimiento en materia seca consiste en la adición de proteínas y de materia grasa para modificar la firmeza de la cuajada.

45 La ambientación consiste en una termización rápida de la leche y permite destruir la flora microbiana vegetativa, y por tanto de las formas patógenas. Su duración normal es de 4 a 10 minutos, principalmente de 5 a 8 minutos, y principalmente de aproximadamente 6 minutos.

50 Por "homogeneización" se entiende la dispersión de la materia grasa en la materia de tipo leche en pequeños glóbulos grasos. La homogeneización se efectúa por ejemplo a una presión de 100 a 280 bares, principalmente de 100 a 250 bares, principalmente de 100 a 200 bares, principalmente de aproximadamente 200 bares. Esta etapa de homogeneización es puramente opcional. Está ausente en el proceso de producción de producto de 0% de materia grasa.

Según un modo de realización particular, el procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado tal como se ha definido anteriormente comprende una etapa de envasado entre la etapa de siembra y la etapa de fermentación, permitiendo dicha etapa de envasado obtener, a partir de la materia sembrada obtenida en la etapa de siembra, una materia sembrada y envasada.

5 Este modo particular de realización corresponde al caso de los productos alimentarios fermentados de tipo firme.

Más particularmente, el procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado tal como se ha definido anteriormente comprende:

10 - una etapa de siembra de una materia de partida, eventualmente pasteurizada, por inoculación de fermentos de siembra que contienen aproximadamente 10^6 a aproximadamente $2 \cdot 10^8$, más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 bifidobacterias por ml de materia de partida para obtener una materia sembrada,

- una etapa de envasado de la materia sembrada obtenida en la etapa anterior, para obtener una materia sembrada envasada,

15 - una etapa de fermentación de la materia sembrada envasada obtenida en la etapa anterior, tal que la temperatura de comienzo de la fermentación es de aproximadamente 36 a aproximadamente 43°C, en particular de aproximadamente 37 a aproximadamente 40°C, la temperatura final de la fermentación es de aproximadamente 37 a aproximadamente 44°C, en particular de aproximadamente 38 a aproximadamente 41°C y el tiempo de fermentación es de aproximadamente 6 a aproximadamente 11 horas, para obtener una materia fermentada,

20 - una etapa de enfriamiento final de la materia fermentada obtenida en la etapa anterior, tal que la temperatura de comienzo del enfriamiento final es inferior a aproximadamente 22°C y la temperatura final de enfriamiento final es de aproximadamente 4 a aproximadamente 10°C de forma que se obtenga un producto alimentario fermentado.

25 Según un modo alternativo de realización, que no se refiere a la preparación de productos de tipo firme, el procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado según la invención comprende las siguientes etapas sucesivas después de la etapa de fermentación:

- una etapa de enfriamiento intermedio de la materia fermentada obtenida en la etapa de fermentación, de forma que se obtenga una materia pre-enfriada,

30 - una etapa de almacenamiento de la materia pre-enfriada obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga una materia almacenada,

- una etapa de enfriamiento final de la materia almacenada obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga un producto alimentario fermentado.

35 Según un modo de realización preferido, dicha etapa de fermentación es tal que la temperatura de comienzo de la fermentación es de aproximadamente 36 a aproximadamente 43°C y en particular de aproximadamente 37 a aproximadamente 40°C, la temperatura de finalización de la fermentación es de aproximadamente 37 a aproximadamente 44°C y en particular de aproximadamente 38 a aproximadamente 41°C, y el tiempo de fermentación es de aproximadamente 6 a aproximadamente 11 horas.

40 De forma ventajosa, dicha etapa de enfriamiento intermedio es tal que el tiempo de enfriamiento intermedio es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas y en particular de aproximadamente 1 hora 30 min a aproximadamente 2 horas y la temperatura de enfriamiento intermedio de aproximadamente 4 a aproximadamente 22°C.

De forma preferida, dicha etapa de almacenamiento es tal que el tiempo de almacenamiento es inferior o igual a aproximadamente 40 horas.

45 De forma ventajosa, dicha etapa de enfriamiento final es tal que la temperatura de comienzo del enfriamiento final es inferior a aproximadamente 22°C y la temperatura de finalización del enfriamiento final es de aproximadamente 4 a aproximadamente 10°C.

Según un modo de realización preferido, el procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado según la invención comprende:

50 - una etapa de siembra de una materia de partida, eventualmente pasteurizada, por inoculación de fermentos de siembra que contienen de aproximadamente 10^6 a aproximadamente $2 \cdot 10^8$, más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 bifidobacterias por ml (o por gramo) de materia de partida para obtener una materia sembrada,

- 5 - una etapa de fermentación de la materia sembrada obtenida en la etapa anterior, tal que la temperatura de comienzo de la fermentación es de aproximadamente 36 a aproximadamente 43°C, en particular de aproximadamente 37 a aproximadamente 40°C, la temperatura de fin de la fermentación es de aproximadamente 37 a aproximadamente 44°C, en particular de aproximadamente 38 a aproximadamente 41°C y el tiempo de fermentación es de aproximadamente 6 a aproximadamente 11 horas, para obtener una materia fermentada,
- 10 - una etapa de enfriamiento intermedio de la materia fermentada obtenida en la etapa anterior, tal que el tiempo de enfriamiento intermedio es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, en particular de aproximadamente 1 hora 30 min a aproximadamente 2 horas y la temperatura de enfriamiento intermedio es de aproximadamente 4 a aproximadamente 22°C de forma que se obtenga una materia pre-enfriada,
- 15 - una etapa de almacenamiento de la materia pre-enfriada obtenida en la etapa anterior, tal que el tiempo de almacenamiento es inferior o igual a aproximadamente 40 horas, de forma que se obtenga una materia almacenada,
- 20 - una etapa de enfriamiento final de la materia almacenada obtenida en la etapa anterior, tal que la temperatura de comienzo del enfriamiento final es inferior a aproximadamente 22°C y la temperatura de finalización del enfriamiento final es de aproximadamente 4 a aproximadamente 10°C de forma que se obtenga un producto alimentario fermentado.

Según un modo particular de realización del procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado tal como se ha definido anteriormente, una etapa complementaria de batido está prevista entre la etapa de fermentación y la etapa de enfriamiento intermedio, que permita obtener, a partir de la materia fermentada obtenida en la etapa de fermentación, una materia fermentada batida.

Por "batido" se entiende un procedimiento de agitación mecánica por medio de un agitador de turbina o de hélice. Se trata de una etapa determinante para la untuosidad del producto principalmente lácteo. Si el batido es demasiado violento, se puede producir una incorporación de aire y una separación del suero. Si el batido es insuficiente, el producto corre el riesgo de volverse posteriormente demasiado espeso.

Según un modo de realización particular, el procedimiento de preparación de un producto alimentario fermentado según la invención comprende después de la etapa de enfriamiento final una etapa de conservación del producto alimentario fermentado a una temperatura comprendida entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10°C.

La invención se refiere también a un producto alimentario fermentado tal como se ha obtenido a partir del procedimiento tal como se ha definido anteriormente.

Breve descripción de las figuras

La **figura 1** representa una comparación de los efectos de la cisteína y de la vitamina C sobre la acidificación de la leche por el fermento del ejemplo 1. En abscisas figura el tiempo en minutos, en ordenadas el pH. Curva A: testigo sin vitamina C ni cisteína; curva B: vitamina C; curva C: cisteína.

La **figura 2** representa la evolución de la población de bifidobacterias en la maqueta testigo a lo largo de la conservación a 10°C. En abscisas, el tiempo de conservación en días; en ordenadas, la población de bifidobacterias en UFC/ml. ■ : con 15 mg/l de cisteína filtrada; ▲ : sin cisteína.

La **figura 3** representa la evolución de la población de bifidobacterias en la leche en función del tratamiento del estimulante. Abscisas, tiempo de conservación en días; ordenadas: población en UFC/ml. Condiciones: ■, testigo sin cisteína ni metionina; ○, cisteína tratada en autoclave; ●, cisteína filtrada, □, metionina tratada en autoclave; curva en puntos, metionina filtrada.

La **figura 4** representa el seguimiento de la población de bifidobacterias en la maqueta producto a lo largo de la conservación a 10°C. Abscisas: tiempo de conservación en días; ordenadas: población en UFC/ml. ■ : cisteína a 12 mg/l incorporada antes de pasteurización; ▲ : testigo sin cisteína.

Ejemplos

Ejemplo 1: estudio del modo de acción de la cisteína como estimulante

Se utiliza un fermento compuesto por *Streptococcus thermophilus* (CNCM: I-1630) + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (CNCM: I-1632) + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (CNCM: I-1519) + *Bifidobacterium animalis ssp lactis* (CNCM: I-2494).

Se trata en este ejemplo de estudiar el modo de acción de la cisteína como estimulante, y de determinar si presenta un efecto metabólico o antioxidante.

ES 2 637 372 T3

El crecimiento de bifidobacterias en la leche se mide en presencia de una disolución de vitamina C (0,5 g/l) reduciendo totalmente el oxígeno del medio y de una disolución de cisteína (50 mg/l).

Constitución de la maqueta producto:

Polvo de leche descremada Milex proveedor Arla food: 120 g

5 Agua: cantidad suficiente para 1 kg

Se efectúa un tratamiento térmico que consiste en una pasteurización durante 30 minutos a 95°C en baño-maría burbujeante.

10 La cisteína proviene del proveedor Sigma. La disolución se prepara a 500 g/l, se filtra sobre unidad filtrante Nalgène 0,2 µm. Esta disolución se utiliza inyectada de forma estéril en la maqueta pasteurizada para una concentración final de 50 mg/l.

La vitamina C proviene del proveedor Sigma. La disolución se prepara a 100 g/l, se filtra sobre unidad filtrante Nalgène 0,2 µm (cat. 156-4020, Nalge Europe Ltd, Bélgica). Esta disolución se utiliza inyectada de forma estéril en la maqueta pasteurizada para una concentración final de 0,5 g/l.

Las dosis de siembra de la maqueta producto están recogidas en la siguiente tabla 1.

15 Tabla 1: dosis de siembra

Volumen para 1 l en µl			
	Testigo	Cisteína filtrada	Vitamina C
I-1630	100	100	100
I-1519 + I-1632	220	220	220
I-2494	190	190	190
Cisteína		100	
Vitamina C			5 ml

La siembra es de $5 \cdot 10^6$ UFC/ml de *Streptococcus thermophilus* y de $5 \cdot 10^6$ UFC/ml de *Lactobacillus bulgaricus*.

El seguimiento de la acidificación de la maqueta a 37°C se representa en la siguiente tabla 2 así como en la figura 1.

20 Tabla 2: seguimiento de la acidificación de la maqueta

	Vitamina C	Cisteína filtrada	Testigo
Ta	86	90	83
Vmax	-0,0079	-0,01046	-0,00791
pHm	5,96	5,82	6,06
Tmax	184	208	180
pH0	6,5	6,6	6,7
TpH 5,5	260	248	270
TpH 5	391	354	412
TpH 4,8	479	417	506
T0 UFC/ml	$1,02 \cdot 10^8$	$2,79 \cdot 10^8$	$1,47 \cdot 10^8$

Ta = tiempo de latencia (en minutos)

Vmax = velocidad máxima (en unidades pH/minuto)

pHm = pH a la velocidad máxima de acidificación

Tmax = tiempo a Vmax (en minutos)

Ph0 = pH al comienzo de fermentación

5 TpH 5,5 = tiempo para llegar a pH 5,5 (en minutos)

TpH 5 = tiempo para llegar a pH 5 (en minutos)

TpH 4,8 = tiempo para llegar a pH 4,8 (en minutos)

T0 UFC/ml = cantidad de bifidobacterias obtenidas al finalizar la fermentación.

10 Se constata que la curva de acidificación en presencia de cisteína se distingue de la curva de acidificación en presencia de vitamina C, que es casi indiscernible de la curva de acidificación testigo sin vitamina C ni cisteína. Dado que la vitamina C es un antioxidante, se deduce de ello que el efecto estimulante de la cisteína no es un efecto antioxidante sino que es más bien un efecto de aporte de aminoácido esencial.

Ejemplo 2: determinación de la dosis de estimulante cisteína

15 Se utiliza un fermento compuesto por *Streptococcus thermophilus* (CNCM: I-2272) + *Streptococcus thermophilus* (CNCM: I-2773) + *Streptococcus thermophilus* (CNCM: I-2130) + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (CNCM: I-1519) + *Bifidobacterium animalis ssp lactis* (CNCM: I-2494).

Las "maquetas de leche" están formadas por yogures batidos clásicos que comprenden el fermento descrito anteriormente.

20 La utilización de la cisteína filtrada 0,2 µm se ha evaluado en las "maquetas de leche" en las proporciones comprendidas de 5 mg/l a 50 mg/l (5 a 20 mg/l de forma preferente).

Mediante el método de numeración de las bifidobacterias, se hace referencia a M. Grand et al., Quantitative analysis and molecular identification of bifidobacteria strains in probiotic milk products, Eur. Food Res. Technol. 217:90-92 (2003).

25 La población de bifidobacterias para el ensayo que contiene la más alta concentración de L cisteína es de $3 \cdot 10^8$ UFC/ml a T+24h, correspondiendo T al momento del envasado del producto y permanece estable hasta 28 días de conservación a 10°C. La población del testigo estándar (Población testigo T0: $1 \cdot 10^8$ UFC/ml) es de $9 \cdot 10^7$ UFC/ml a 28 días de conservación a 10°C.

La población de bifidobacterias para el ensayo que contiene la más baja concentración de L cisteína es de $1 \cdot 10^8$ UFC/ml a T+24h.

30 Algunos productos presentan un falso gusto caracterizado por una señal de azufre no detectable desde 0,002% de cisteína añadida. Por debajo de esta concentración de cisteína los productos son aceptados: una dosis de 0,0015% representa el buen compromiso entre las restricciones organolépticas y las restricciones en términos de población de *Bifidobacterium* > $2 \cdot 10^8$ UFC/ml.

35 Los ensayos de crecimiento en presencia de 0,0015% es decir 15 mg/l de cisteína filtrada han permitido alcanzar una población de *Bifidobacterium* I-2494 de $2,8 \cdot 10^8$ UFC/ml después de 28 días de conservación a 10°C (la evolución de la población en relación al testigo sin cisteína se representa en la figura 2).

Desde un punto de vista de análisis sensorial, los productos realizados no presentan falso gusto detectable en comparación al estándar.

Ejemplo 3: cinética de acidificación

40 Se utiliza el fermento descrito en el ejemplo 2.

Las cinéticas de acidificación de la leche en presencia (15 mg/l) de la dosis óptima de cisteína y en ausencia de cisteína (testigo) muestran la ausencia de efecto de la cisteína sobre la cinética global.

Ejemplo 4: Efecto del tipo de tratamiento del aminoácido sulfurado

45 Se evalúa el impacto de la esterilización por filtración o termización de la cisteína y de la metionina (concentración final utilizada: 50 mg/l).

Las disoluciones se han filtrado a 0,2 µm es decir tratadas en autoclaves durante 5 minutos a 121°C y luego congeladas en forma de bolitas en nitrógeno líquido.

Constitución de la maqueta:

Polvo de leche descremada Milex proveedor Arla food: 120 g

5 Agua: cantidad suficiente para 1 kg

Tratamiento térmico: pasteurización 30 minutos a 95°C en baño-maría burbujeante.

10 Cisteína: proveedor Sigma. La disolución se prepara a 500 g/l, se filtra sobre unidad filtrante Nalgène 0,2 µm o se esteriliza a 121°C durante 5 minutos en autoclave accionada con sonda de temperatura (Fetinge France S.A., referencia KL 60/101). Se inyecta esta disolución de forma estéril en la maqueta pasteurizada para una concentración final de 50 mg/l.

Metionina: proveedor Sigma. La disolución se prepara a 300 g/l; el tratamiento de filtración o de esterilización es idéntico al efectuado para la disolución de cisteína. Esta disolución se inyecta de forma estéril en la maqueta pasteurizada para una concentración final de 50 mg/l.

Las dosis de sembrado se recogen en la siguiente tabla 3.

15 Tabla 3: dosis de sembrado

Volumen para 1 l en µl					
	Testigo	Cisteína filtrada	Cisteína tratada en autoclave	Metionina filtrada	Metionina tratada en autoclave
I-1630	100	100	100	100	100
I-1519 + I-1632	220	220	220	220	220
I-2494	95	95	95	95	95
Cisteína filtrada		100			
Cisteína tratada en autoclave			100		
Metionina filtrada				100	
Metionina tratada en autoclave					100

El sembrado es de $5 \cdot 10^6$ UFC/ml de *Streptococcus thermophilus* y de $5 \cdot 10^6$ UFC/ml de *Lactobacillus bulgaricus*.

El seguimiento de la población de bifidobacterias en la maqueta conservada a 4°C en función de las diferentes condiciones anteriores se representa en la figura 3 así como en la siguiente tabla 4:

20 Tabla 4: evolución de la población de bifidobacterias

	T0 UFC/ml	T10 UFC/ml	T24 UFC/ml	T29 UFC/ml
Cisteína filtrada	$5,1 \cdot 10^8$	$4,3 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$
Cisteína tratada en autoclave	$3,1 \cdot 10^8$	$5,2 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$
Metionina filtrada	$4,0 \cdot 10^8$	$6,2 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$
Metionina tratada en autoclave	$3,4 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$
Testigo	$1,7 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$

El tiempo de referencia T0 corresponde a la colocación en recipientes (envasado). Las medidas a T10, T24, T29 se efectúan respectivamente a 10 días, 24 días, 29 días después de esta colocación en recipientes.

25 En todos los casos la población de bifidobacterias aumenta por el aporte de cisteína o de la metionina. No se observa ningún efecto del tratamiento térmico en las condiciones de ensayo sobre la eficacia de los estimulantes.

El tratamiento térmico aplicado sobre la cisteína a 50 mg/l no degrada más que una parte, la concentración residual (no evaluada) es suficiente para mejorar la población de bifidobacterias.

Ejemplo 5: evolución de la población de bifidobacterias a lo largo de la conservación en caso de incorporación de cisteína antes de la pasteurización

- 5 La dosis de 12 mg/l de cisteína se define como efecto estimulante que responde a la población diana ($2 \cdot 10^8$ UFC/ml) y que responde positivamente en términos de organolepsia (sin diferencia detectable). Esta concentración se ha evaluado en incorporación directa a la composición maqueta y pasteurizada (95°C, 30 min.).

El seguimiento de la población de bifidobacterias en la maqueta producto a lo largo de la conservación a 10°C se representa en la figura 4.

- 10 La población de *Bifidobacterium* es de $2,4 \cdot 10^8$ UFC/ml a T1 (es decir 24 h de almacenamiento) y permanece estable 44 días de conservación a 10°C (por encima de $1,4 \cdot 10^8$ UFC/ml). El efecto estimulante se demuestra claramente en relación al testigo estándar ($1,6 \cdot 10^8$ UFC/ml a T1; $7,65 \cdot 10^7$ UFC/m a T8; $2 \cdot 10^7$ UFC/ml a T28; $1,8 \cdot 10^7$ UFC/ml a T35; $8,5 \cdot 10^5$ UFC/ml a T44) en estas condiciones: la población a T0 es más elevada cuando se utilizan los aminoácidos sulfurados y el mantenimiento de la población a lo largo de la vida del producto está muy mejorado. Este efecto estimulante sigue siendo sin embargo menos eficaz que la adición de cisteína filtrada 0,2 μm a la maqueta ($3 \cdot 10^8$ UFC/ml), provocando el tratamiento térmico una degradación de la cisteína (concentración residual inferior a 15 mg/l). Hay que prever una sobredosis inicial de la cantidad de cisteína en el caso en el que la cisteína se someta a un tratamiento térmico.

Conclusiones relativas a las condiciones de utilización de la cisteína:

- 20 - la utilización de la cisteína en directo filtrada (con el fermento) preserva la cisteína;
- su adición en la composición de la maqueta tratada térmicamente da un resultado un poco menos bueno en términos de población pero hay que tener en cuenta la degradación de la cisteína durante el tratamiento térmico (menos disponible);
- 25 - su adición mediante un ingrediente lácteo (por ejemplo GlycoMacroPeptide correspondiente al fragmento 106-169 de la cisteína kappa) tratado térmicamente da peores resultados (menos disponible);
- su adición en forma congelada con el fermento es posible.

Ejemplo 6: fabricación de un yogur batido graso según la invención a escala de laboratorio (micro-fabricación)

1. Composición de la leche y rehidratación

- 30 El yogur batido está compuesto por los siguientes ingredientes: leche descremada al 0% de materias grasas, crema al 40% de materias grasas y polvo de leche descremada (PLD) al 33% de proteínas.

Al principio, todos los ingredientes se asocian juntos con el fin de estandarizar la leche a un contenido de proteínas (TP) de 4,4%, un contenido de materias grasas (MG) de 3,5% y un contenido de materias secas de 15,8% con agitación del medio durante 60 minutos a aproximadamente 750 vueltas/min con un agitador HEIDOLPH® con el fin de que las proteínas se rehidraten.

- 35 El control de la estandarización se efectúa con el detector infrarrojo MILKOSCAN FT 120® de la sociedad FOSS®. A continuación, un ejemplo de las cantidades necesarias de cada ingrediente para obtener las dianas que caracterizan la leche.

Ingredientes	En %
Leche descremada 0% MG	87,5
Crema al 40% MG	8,7
Proteínas de leche descremada 33% TP	3,8
TOTAL	100

2. Homogeneización

- 40 Se calienta entonces la leche entre 50°C y 60°C con el fin de fundir bien los glóbulos de grasa. Una vez se alcance la temperatura, los 10 litros se homogeneizan en el MICROFLUIDIZER® de la sociedad MICROCORPS®. Esto permite romper los glóbulos grasos pasando la leche en capilares a través de una rejilla y a presión de 350 bares.

3. Pasteurización

Se prepara un baño maría de la sociedad MEMMERT® y se regula a 103°C. La leche se transfiere a 8 botellas de 1 litro, con una pesada precisa de esta cantidad para cada botella.

5 Las botellas se sumergen hasta la altura del cuello en el baño maría a 103°C durante 35 minutos, y luego 10 minutos a 95°C en el mismo baño maría.

4. Enfriamiento y almacenamiento

Las botellas se enfrían en un baño de agua fría en flujo continuo, y luego se almacenan a 4°C en el refrigerador de 12 a 24 horas según la planificación prevista en el ensayo.

5. Ambientación

10 Las botellas de leche salen del refrigerador 45 minutos antes de la inoculación de los fermentos y se colocan al baño maría a la temperatura de fermentación considerada, es decir 37°C.

6. Fermentación

15 Después de la inoculación de los fermentos ($5 \cdot 10^6$ UFC/ml de *Streptococcus thermophilus*; $5 \cdot 10^6$ UFC/ml de *Lactobacillus bulgaricus*; $5 \cdot 10^6$ UFC/ml de bifidobacterias) y de L-cisteína (15 mg/l) a la temperatura de fermentación 37°C, las botellas se vuelven a sumergir en el baño maría, y la acidificación se controla por el CINAC® de la sociedad YSEBAERT® hasta un pH de 4,8.

7. Desuerado y suavizado

20 El desuerado de la botella se hace a mano. El yogur desuerado se vierte en la tolva de la plataforma de suavización. El suavizado se hace por medio de una rejilla metálica de porosidad 500 micras y el producto suavizado se enfría a 20°C por medio de un circuito de intercambio en agua helada.

8. Envasado y almacenamiento

El envasado se hace manualmente en recipientes de 125 ml y el opérculo es termosellado con la termoselladora DNV-100-25-PPV-A® de la sociedad FESTO®. Los productos se almacenan en cámara fría a 10°C durante la duración del ensayo.

25 *Ejemplo 7: evaluación de la dosis de cisteína que se va a añadir para obtener un producto de buena calidad organoléptica y que contenga la población diana de Bifidobacterias*

Se han preparado diferentes productos con dosis crecientes de cisteína (ver la tabla siguiente).

El testigo era el producto lácteo clásico que contiene el fermento.

Intervalo:

Volumen / 1 l	Dosis de cisteína	
3,2 ml	0,0080%	80 mg/l
2 ml	0,0050%	50 mg/l
0,8 ml	0,0020%	20 mg/l
0,4 ml	0,0010%	10 mg/l
0,2 ml	0,0005%	5 mg/l

30

Cada producto ha sido probado por 4 personas que conocen muy bien el producto de referencia desde un punto de vista organoléptico. Estas personas han dado su opinión en términos de presencia de malos gustos (gusto sulfurado, nota ácida), siendo la referencia el producto clásico que no contiene cisteína.

Resultados

35

ES 2 637 372 T3

Ensayo	Poblaciones (UFC/mL)			Evaluación sensorial (n = 4)
	T0	T pH 4,8	Tf 495 min	
1	4,40E+06	/	1,70E+08	Gusto sulfurado y/o nota ácida detectado por todos los catadores
0,008%				
2	4,70E+06	1,90E+08	2,40E+08	Gusto sulfurado y/o nota ácida detectado por todos los catadores
0,005%				
3	3,30E+06	2,50E+08	3,10E+08	Gusto sulfurado y/o nota ácida detectado por al menos un catador
0,002%				
4	/	/	/	Gusto sulfurado y/o nota ácida detectado por al menos un catador
0,0015%				
5	3,10E+06	1,50E+08	2,40E+08	Ninguna detección de mal gusto
0,001%				
6	3,90E+06	1,10E+08	1,20E+08	Ninguna detección de mal gusto
0,0005%				

Se ha ensayado la dosis a 0,00125%, al no ser óptima tampoco la dosis a 0,0015% desde un punto de vista organoléptico. Esta dosis representa un compromiso muy bueno entre la restricción en términos de mantenimiento de la población y la restricción en términos de calidad organoléptica.

- 5 Se ha realizado el perfil sensorial de un producto adicionado de 0,00125% (12,5 mg/l) de cisteína por un jurado de expertos entrenados en este tipo de degustación compuesto por 15 personas.

Se han efectuado dos repeticiones. Los catadores tenían que juzgar los productos con 23 descriptores. Los resultados con estos descriptores (esenciales para definir la calidad organoléptica del producto en relación al producto de referencia) no han mostrado diferencia significativa nefasta con estos descriptores. Estos descriptores eran los siguientes:

10

Aspecto sobre el producto:

- Suero visual (apreciación visual de la cantidad de suero en superficie del producto)

Textura con la cuchara antes de batido

- Huella (indica la estabilidad de la estructura del producto)

15

Textura con la cuchara después de batido del producto

- Espesor (resistencia al desplazamiento de la cuchara)
- Hilo (continuidad del hilo del flujo)
- Cubrimiento (cantidad de producto que cubre el dorso de la cuchara)

Textura en la boca después de batido del producto

- Evasión (velocidad de desaparición del producto en la boca)
 - Tapizado (tapiza la pared bucal)
 - Graso (sensación de grasa en la boca)
 - Dulce (sensación táctil de dulzura en la boca)
- 5 Sabores
- Ácido
 - Dulce
 - Amargo
 - Astringente
- 10 Aromas de la leche
- Gustos desagradables
 - Crema
 - Mantequilla
 - Leche
- 15
- Queso fresco
 - Acetaldehído
 - Lactosuero
 - Lactona
 - Limón
- 20
- Patata

El resultado buscado es una ausencia de diferencia significativa entre el producto testigo y el producto suplementado con la cisteína.

En el presente caso, un producto según la invención, suplementado con 12,5 mg/ de cisteína no presenta diferencia significativa en términos de aspecto, textura, sabores y gustos con relación al producto testigo.

25

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado a partir de una materia de partida, que comprende

- 5 - una etapa de siembra de una materia de partida, eventualmente pasteurizada, por inoculación de fermentos de siembra que contienen bifidobacterias y bacterias del género *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, para obtener una materia sembrada,
- una etapa de fermentación de la materia sembrada obtenida en la etapa anterior de forma que se obtenga una materia fermentada,
- 10 - una etapa de incorporación de al menos un aminoácido sulfurado en forma libre a una concentración de 5 a 30 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a 20 mg/l, en particular de 10 a 15 mg/l, en particular de 12 a 15 mg/l, y principalmente 12,5 mg/l, pudiendo intervenir esta etapa de incorporación
- bien antes de la etapa de siembra,
- bien esencialmente de forma simultánea a la etapa de siembra,
- bien después de la etapa de siembra y antes de la etapa de fermentación,
- 15 siempre que el producto alimentario fermentado no contenga más de 0,5% (p/p) de extracto de levadura y/o de autolisado de levadura.

2. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado a partir de una materia de partida según la reivindicación 1, que comprende

- 20 - una etapa de siembra de una materia de partida, eventualmente pasteurizada, por inoculación de fermentos de siembra que contienen bifidobacterias y bacterias del género *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, y bacterias del género *Lactobacillus casei* y/o *Lactobacillus reuteri* y/o *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus helveticus* y/o *Lactobacillus plantarum*, y/o bacterias del tipo *Lactococcus cremoris* y/o *Streptococcus thermophilus* y/o *Lactococcus lactis* y/o una o varias bacterias del género *Leuconostoc* para obtener una materia sembrada,
- 25 - una etapa de fermentación de la materia sembrada obtenida en la etapa anterior de forma que se obtenga una materia fermentada,
- una etapa de incorporación de al menos un aminoácido sulfurado en forma libre a una concentración de 5 a 30 mg/l, en particular de 5 a 20 mg/l, en particular de 10 a 15 mg/l, en particular de 12 a 15 mg/l, y principalmente 12,5 mg/l, pudiendo intervenir esta etapa de incorporación
- 30 - bien antes de la etapa de siembra,
- bien esencialmente de forma simultánea a la etapa de siembra,
- bien después de la etapa de siembra y antes de la etapa de fermentación,
- siempre que el producto alimentario fermentado no contenga más de 0,5% (p/p) de extracto de levadura y/o de autolisado de levadura.

35 3. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado a partir de una materia de partida según una de las reivindicaciones 1 ó 2, siendo dicho producto lácteo un yogur fermentado, que comprende

- una etapa de siembra de una materia de partida, eventualmente pasteurizada, por inoculación de fermentos de siembra que contienen bifidobacterias, bacterias del género *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, y bacterias del género *Streptococcus thermophilus*, para obtener una materia sembrada,
- 40 - una etapa de fermentación de la materia sembrada obtenida en la etapa anterior de forma que se obtenga una materia fermentada,
- una etapa de incorporación de al menos un aminoácido sulfurado en forma libre a una concentración de 5 a 30 mg/l, en particular de 5 a 20 mg/l, en particular de 10 a 15 mg/l, en particular de 12 a 15 mg/l, y principalmente 12,5 mg/l, pudiendo intervenir esta etapa de incorporación
- 45 - bien antes de la etapa de siembra,
- bien esencialmente de forma simultánea a la etapa de siembra,
- bien después de la etapa de siembra y antes de la etapa de fermentación,

siempre que el producto alimentario fermentado no contenga más de 0,5% (p/p) de extracto de levadura y/o de autolisado de levadura.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, que no comprende una etapa de adición de sustancias suplementarias que contengan uno o varios aminoácidos sulfurados.
- 5 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una etapa de adición de sustancias suplementarias que contienen uno o varios aminoácidos sulfurados en forma libre, siendo la concentración de aminoácidos sulfurados en forma libre en las sustancias suplementarias inferior a 1,7%, preferentemente inferior a 0,5%, y siendo la concentración de dichas sustancias suplementarias en el producto alimentario fermentado inferior a 0,5%.
- 10 6. Procedimiento según la reivindicación 1, 2, 3 ó 5, que comprende una etapa de adición de sustancias suplementarias formadas por un extracto de levadura y/o un autolisado de levadura y/o de un hidrolizado de proteínas de leche, de vegetales, de soja, a una concentración inferior a 0,5% (p/p).
- 15 7. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende también una etapa de pasteurización que tiene lugar antes de la etapa de siembra, permitiendo obtener una materia de partida pasteurizada a partir de la materia de partida.
8. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la etapa de incorporación de al menos un aminoácido sulfurado tiene lugar esencialmente de forma simultánea a la etapa de siembra.
- 20 9. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la etapa de incorporación de al menos un aminoácido sulfurado tiene lugar después de la etapa de siembra y antes de la etapa de fermentación.
- 25 10. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende una etapa de adición de una preparación intermedia simultáneamente a la etapa de siembra o entre la etapa de siembra y la etapa de fermentación, de forma que se obtenga, a partir de la materia sembrada, una materia sembrada completada, o después de la etapa de fermentación, de forma que se obtenga, a partir de la materia fermentada, una materia fermentada completada, comprendiendo dicha preparación intermedia una preparación de frutas y/o de cereales y/o de aditivos tales como aromas y colorantes, y pudiendo tener lugar dicha etapa de adición de una preparación intermedia de forma simultánea a la etapa de incorporación de al menos un aminoácido sulfurado.
- 30 11. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la etapa de siembra comprende la inoculación de fermentos de siembra que contienen de 10^6 a $2 \cdot 10^8$, más particularmente de 10^6 a 10^7 bifidobacterias por ml de materia de partida.
- 35 12. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las bifidobacterias se eligen entre las bacterias de tipo *Bifidobacterium animalis*, principalmente *Bifidobacterium animalis animalis* y/o *Bifidobacterium animalis lactis*, y/o *Bifidobacterium breve* y/o *Bifidobacterium longum* y/o *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium bifidum*.
13. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 12, en el que las bifidobacterias se eligen entre las bacterias de tipo *Bifidobacterium animalis*.
- 40 14. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la proporción de las bifidobacterias en los fermentos de siembra es de 20 a 75%, principalmente de 30 a 50%, principalmente de 35 a 40%, y principalmente de 37,5%.
15. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la materia de partida es a base de producto lácteo y principalmente de leche de vaca y/o de leche de cabra.
- 45 16. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la materia de partida es una materia de partida pasteurizada, ambientada, opcionalmente homogeneizada, y enfriada, obtenida a partir de una materia bruta, comprendiendo dicho procedimiento antes de la etapa de siembra las siguientes etapas sucesivas:
- 50 - una etapa de estandarización en materia grasa de la materia bruta de forma que se obtenga una materia estandarizada,
- una etapa de enriquecimiento en materia seca de la materia estandarizada obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga una materia enriquecida,

- una etapa de precalentamiento de la materia enriquecida obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga una materia de partida,
 - una etapa de pasteurización y de ambientación de la materia de partida obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga una materia pasteurizada y ambientada,
- 5
- una etapa opcional de homogeneización de la materia pasteurizada y ambientada obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga una materia pasteurizada, ambientada y opcionalmente homogeneizada,
 - una etapa de enfriamiento inicial de la materia pasteurizada, ambientada y opcionalmente homogeneizada obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga una materia de partida
- 10
- pasteurizada, ambientada, opcionalmente homogeneizada y enfriada.
17. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende una etapa de envasado entre la etapa de siembra y la etapa de fermentación, permitiendo dicha etapa de envasado la obtención, a partir de la materia sembrada obtenida en la etapa de siembra, una materia sembrada y envasada.
- 15
18. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende:
- una etapa de siembra de una materia de partida, eventualmente pasteurizada, por inoculación de fermentos de siembra que contienen 10^6 a $2 \cdot 10^8$, más particularmente de 10^6 a 10^7 bifidobacterias por ml de materia de partida para obtener una materia sembrada,
- 20
- una etapa de envasado de la materia sembrada obtenida en la etapa anterior, para obtener una materia sembrada envasada,
 - una etapa de fermentación de la materia sembrada envasada obtenida en la etapa anterior, tal que la temperatura de comienzo de la fermentación es de 36 a 43°C, en particular de 37 a 40°C, la temperatura de finalización de la fermentación es de 37 a 44°C, en particular de 38 a 41°C y el tiempo de fermentación es de 6 a 11 horas, para obtener una materia fermentada,
- 25
- una etapa de enfriamiento final de la materia fermentada obtenida en la etapa anterior, tal que la temperatura de comienzo del enfriamiento final es inferior a 22°C y la temperatura de finalización del enfriamiento final es de 4 a 10°C de forma que se obtenga un producto alimentario fermentado.
- 30
19. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende las siguientes etapas sucesivas después de la etapa de fermentación:
- una etapa de enfriamiento intermedio de la materia fermentada obtenida en la etapa de fermentación, de forma que se obtenga una materia pre-enfriada,
 - una etapa de almacenamiento de la materia pre-enfriada obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga una materia almacenada,
- 35
- una etapa de enfriamiento final de la materia almacenada obtenida en la etapa anterior, de forma que se obtenga un producto alimentario fermentado.
- 40
20. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 16 ó 19, en el que la etapa de fermentación es tal que la temperatura de comienzo de la fermentación es de 36 a 43°C y en particular de 37 a 40°C, la temperatura de finalización de la fermentación es de 37 a 44°C y en particular de 38 a 41°C, y el tiempo de fermentación es de 6 a 11 horas.
- 45
21. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 19 ó 20, en el que la etapa de enfriamiento intermedio es tal que el tiempo de enfriamiento intermedio es de 1 hora a 4 horas y en particular de 1 hora 30 minutos a 2 horas y la temperatura de enfriamiento intermedio es de 4 a 22°C.
22. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 19 a 21, en el que la etapa de almacenamiento es tal que el tiempo de almacenamiento es inferior o igual a 40 horas.
23. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 19 a 22, en el que la etapa de enfriamiento final es tal que la temperatura de comienzo del enfriamiento final es inferior a 22°C y la temperatura de finalización del enfriamiento final es de 4 a 10°C.
- 50
24. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 1 a 16 ó 19 a 23, que comprende:

- una etapa de siembra de una materia de partida, eventualmente pasteurizada, por inoculación de fermentos de siembra que contienen 10^6 a $2 \cdot 10^8$, más particularmente de 10^6 a 10^7 bifidobacterias por ml de materia de partida para obtener una materia sembrada,
 - 5 - una etapa de fermentación de la materia sembrada obtenida en la etapa anterior, tal que la temperatura de comienzo de la fermentación es de 36 a 43°C, en particular de 37 a 40°C, la temperatura de fin de la fermentación es de 37 a 44°C, en particular de 38 a 41°C y el tiempo de fermentación es de 6 a 11 horas, para obtener una materia fermentada,
 - 10 - una etapa de enfriamiento intermedio de la materia fermentada obtenida en la etapa anterior, tal que el tiempo de enfriamiento intermedio es de 1 hora a 4 horas, en particular de 1 hora 30 minutos a 2 horas y la temperatura de enfriamiento intermedia es de 4 a 22°C, de forma que se obtenga una materia pre-enfriada,
 - una etapa de almacenamiento de la materia pre-enfriada obtenida en la etapa anterior, de forma que el tiempo de almacenamiento es inferior o igual a 40 horas, de forma que se obtenga una materia almacenada,
 - 15 - una etapa de enfriamiento final de la materia almacenada obtenida en la etapa anterior, tal que la temperatura de comienzo del enfriamiento final es inferior a 22°C y la temperatura de finalización del enfriamiento final es de 4 a 10°C de forma que se obtenga un producto alimentario fermentado.
25. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 19 a 24, que comprende una etapa suplementaria de batido entre la etapa de fermentación y la etapa de enfriamiento intermedio, permitiendo obtener, a partir de la materia fermentada obtenida en la etapa de fermentación, una materia fermentada batida.
- 20
26. Procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado según una de las reivindicaciones 19 a 25, que comprende después de la etapa de enfriamiento final una etapa de conservación del producto alimentario fermentado a una temperatura comprendida entre 4 y 10°C.

25