

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 189**

51 Int. Cl.:

A23C 1/00 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2007 PCT/FR2007/000024**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2007 WO07077401**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2007 E 07717686 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 1971209**

54 Título: **Polvo de leche fermentada o yogur con alta densidad de fermentos lácticos**

30 Prioridad:

06.01.2006 FR 0600130

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

17.01.2018

73 Titular/es:

**INTERCONTINENTAL GREAT BRANDS LLC
(100.0%)
100 Deforest Avenue
East Hanover, NJ 07936, US**

72 Inventor/es:

**MARCHAL, LAURENT;
AYMARD, PIERRE;
GEYSELS, YVO;
DAVAL, CHRISTOPHE;
JESSENNE, PIERRE y
LECROIX, FRANCIS**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 650 189 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

Polvo de leche fermentada o yogur con alta densidad de fermentos lácticos

5 **Campo técnico**

La solicitud y la invención proceden de la industria láctica y de la industria alimentaria.

10 Están relacionadas con un polvo de leche fermentada o yogur que comprende al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* y al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus*, y con una alta concentración de fermentos lácticos vivos o viables.

15 También están relacionadas con medios de producción de dicho polvo y, más especialmente, a un método de producción de yogures o leches fermentadas con alta concentración en fermentos lácticos vivos o viables, a un método de producción de dicho polvo a partir de dichos yogures o leche fermentada, y a productos intermedios y finales utilizados u obtenidos cuando se implementan dichos métodos.

20 Están relacionadas además con aplicaciones del polvo según la solicitud o la invención en el campo de los alimentos y, más especialmente, en el campo de los productos lácteos, las galletas, y los dulces.

Antecedentes técnicos

25 En la técnica anterior se han llevado a cabo muchos experimentos sobre la producción de polvo de leche fermentada o de yogur.

30 Las soluciones de la técnica anterior no utilizan simbiosis de *S. thermophilus* - *L. bulgaricus*, aplicada a un sustrato lácteo para que este sustrato se transforme en un producto en forma de polvo adecuado para el consumo humano, y que satisfice la designación de leche fermentada o yogur, con una población en fermentos lácticos y, en particular, de *S. thermophilus* de, al menos, igual a $5 \cdot 10^8$ ufc/g, y/o con una población de *L. bulgaricus* de al menos $1 \cdot 10^4$ ufc/g.

De hecho, las soluciones de la técnica anterior describen de forma general la pulverización de medios, que son medios de cultivo. Estos medios de cultivo no pueden dar lugar a un producto que satisfaga la designación de leche fermentada o yogur y generalmente no son adecuados para los humanos.

35 Diversas soluciones de la técnica anterior también recomiendan concentrar medios de cultivo antes de pulverizar, incluso mezclando este concentrado de medio de cultivo con otros compuestos antes de pulverizarlo.

40 Este es el caso, por ejemplo, de las soluciones descritas en las patentes EP-0924 993 B1 (*Société des Produits Nestlé S.A.*), que describe un producto alimenticio deshidratado que contiene fermentos lácticos, y en la patente EP-0 818 529 B1, que describe un método de deshidratación por pulverización (*Société des Produits Nestlé S.A.*).

45 En ambos casos, los fermentos lácticos se suministran en forma de un medio de cultivo previamente concentrado. El producto alimenticio obtenido siguiendo las enseñanzas de este tipo de técnica anterior es un alimento distinto de un alimento fermentado.

En Bielecka y col. (*Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 7, núm. 2, 1998, págs. 267-274) se describen conjuntos sinérgicos de fermentos lácticos para deshidratar yogur mediante pulverización.

50 La solicitud y la invención proponen un polvo de leche fermentada o yogur que satisfice la designación de leche fermentada o yogur, es decir, un polvo de leche fermentada o yogur con alto contenido en *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* vivas o viables. El polvo según la solicitud o la invención procede de simbiosis láctica, y logra altos contenidos en *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, sin que sea necesario añadir fermentos lácticos vivos tras la inoculación para la fermentación.

55 El polvo según la solicitud o la invención presenta contenidos en *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* especialmente altos; son de hecho mucho más altos que el umbral establecido legalmente para la designación de leche fermentada o yogur, y presentan propiedades de almacenamiento destacadas.

Sumario

60 La solicitud describe:
 - un método de producción de un yogur o leche fermentada con una concentración en fermento láctico elevada,
 - un método de producción de un polvo de leche fermentada o de yogur, obteniéndose dicho polvo de un yogur o una leche fermentada con una concentración elevada en fermentos lácticos, y teniendo una alta concentración en fermentos lácticos,

- un sustrato lácteo cultivado que se puede obtener como un producto intermedio durante la implementación del método del yogur o de la leche fermentada según la solicitud y/o durante la implementación del método de producción de un polvo según la solicitud,
- un yogur cultivado o leche fermentada que se puede obtener como producto acabado del método de producción de yogur o de leche fermentada según la solicitud y/o como un producto intermedio durante la implementación del método de producción de un polvo según la solicitud,
- un producto acabado obtenido por el método de obtención de un polvo según la solicitud, es decir, un polvo de leche fermentada o de yogur,
- composiciones y, de forma más específica, productos alimenticios, tales como galletas, productos de confitería, que contienen al menos un polvo según la solicitud.

La invención se refiere a:

- un método de producción de una leche fermentada o un yogur que contiene *S. thermophilus* a una concentración de al menos $5 \cdot 10^9$ ufc/g y *L. bulgaricus* a una concentración de al menos $1 \cdot 10^7$ ufc/g,
- un método de producción de un polvo de leche fermentada o un yogur, que permite producir un polvo con una densidad de fermentos lácticos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* alta, sin tener que añadir fermentos lácticos *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* distintos de los que participaron en la fermentación láctica, presentando adicionalmente dicho polvo muy buenas propiedades de almacenamiento para los fermentos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* que contiene,
- un producto intermedio que se puede producir durante la implementación del método de producción de un polvo según la invención, y que está constituido de una leche fermentada o yogur,
- un producto intermedio que se puede producir durante la implementación de un método según la invención, y que está constituido de sustrato lácteo cultivado o en una leche fermentada o yogur, presentando dicho sustrato lácteo cultivado o, según el caso, dicha leche fermentada o yogur, un contenido en materia seca de 25 a 60 %, preferentemente de 28 a 55 %, más preferentemente de 38 a 45 %,
- una leche fermentada o polvo de yogur que se puede obtener mediante el método de producción de un polvo de la invención, y
- productos alimenticios que contienen un polvo según la invención.

El polvo de leche fermentada o de yogur según la solicitud o la invención es altamente concentrado en fermentos lácticos vivos o viables y, más especialmente, en *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*.

Se obtiene a partir de la actividad simbiótica entre *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*; no corresponde a la yuxtaposición de cepas, que se añadirían simplemente a un medio y a continuación se pulverizarían, sino a la pulverización cuidadosa de una leche después de la fermentación láctica simbiótica ejercida por *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*.

El hecho de que el polvo según la solicitud o la invención presente altos contenidos en *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, y que resulte de la simbiosis láctica ejercida entre *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, hace que el polvo según la solicitud o la invención satisfaga en sí la designación de leche fermentada o yogur.

Según sabe el solicitante, los polvos de la técnica anterior no tienen una composición o contenido en fermentos lácticos que les daría la designación de yogur o leche fermentada. De hecho, los polvos de yogur comerciales tienen casi siempre muy poca flora láctica residual que, en la técnica anterior, se considera ventajosa desde el punto de vista técnico porque proporciona una estabilidad organoléptica superior. Algunos polvos comerciales tienen mayores contenidos en fermentos lácticos, pero utilizando un método de enriquecimiento tras la deshidratación (aporte de bacterias exógenas). Otros tienen altos contenidos en *S. thermophilus*, pero contenidos en *L. bulgaricus* apenas medibles. Finalmente, otros polvos de yogur se declaran como polvos que contienen un alto contenido en fermento láctico, incluso con calidad estable durante 6 meses a temperatura ambiente; pero las mediciones realizadas por el solicitante con estos polvos, descritos más adelante en la presente memoria (ver los Ejemplos 12 y 13), muestran que la población real inicial es inferior a la declarada, y que dichos polvos no presentan suficiente estabilidad durante el almacenamiento, lo que da lugar a una reducción significativa en la flora láctica.

En cuanto al polvo según la solicitud o la invención, presenta propiedades de almacenamiento destacadas, tanto a 5 °C como a 20 °C. Por ejemplo, al cabo de 4 meses de almacenamiento a 20 °C no se observa una reducción sustancial en las poblaciones de *S. thermophilus* o *L. bulgaricus* vivos o viables.

A 35 °C, se observa una reducción progresiva de la flora láctica, pero con una velocidad generalmente comparable a la de polvos comerciales mantenidos a 5 °C o 20 °C, que son las condiciones de almacenamiento consideradas ideales por el experto en la técnica.

Según es sabido por el solicitante, ninguno de los polvos de la técnica anterior tiene tanto:

- un contenido en *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, y
 - tan buenas propiedades de almacenamiento,
- como el polvo según la solicitud o la invención (ver los Ejemplos 12 y 13).

En la solicitud y en la invención, ST (o St) significa *Streptococcus thermophilus*, y LB (o Lb) significa *Lactobacillus bulgaricus*.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 presenta los tres tipos principales de curvas de flujo obtenidas por la aplicación en un modelo de leche fermentada con un gradiente de cizalla creciente y luego decreciente: curva superior, medio de alta viscosidad (cepas lácticas filamentosas); curva central, medio de viscosidad media (cepas lácticas texturizantes), curva inferior, medio de baja viscosidad (cepas lácticas quebradizas).

10 La Figura 2 ilustra cómo determinar la viscosidad de un modelo de leche fermentada desde la parte decreciente de una curva de flujo obtenida por aplicación de un gradiente de cizalla creciente y luego decreciente (viscosidad = pendiente de la línea de regresión de la parte decreciente de la curva de flujo, con la raíz cuadrada del gradiente de cizalla en el eje x y la raíz cuadrada del esfuerzo en el eje y).

15 La Figura 3 presenta un dibujo de un dispositivo de atomización suave adecuado para la producción de un polvo conforme a la solicitud y a la invención.

20 La Figura 4 presenta dos cinéticas de acidificación:
 - curva inferior: cinética de acidificación obtenida mediante inoculación de un sustrato lácteo de una cepa de ST con $2,7 \cdot 10^9$ ufc/g y una cepa de LB con $1,4 \cdot 10^7$ ufc/g (la inoculación cumple con la solicitud y la invención, que da lugar a un yogur conforme a la solicitud y a la invención), y
 - curva superior: cinética de acidificación obtenida por inoculación de un sustrato láctico idéntico con las mismas cepas de ST y LB, pero a dosis inferiores a las prescritas por la aplicación y la invención (inoculación de ST a $1 \cdot 10^7$ ufc/g, e inoculación de LB con $5 \cdot 10^4$ ufc/g).

25 La Figura 5 ilustra las diferencias en la población inicial en los fermentos (en esta figura, “Danone 1,” “Danone 2,” “Danone 3,” y “Danone 4” son polvos de la solicitud y de la invención, mientras que “Dr. Süwelack M/A 5.4 Active” y “EPI PY48” son polvos de la técnica anterior).

30 La Figura 6 ilustra la estabilidad de los fermentos en los polvos de la solicitud y de la invención mantenidos a 35 °C durante 2 semanas (en la Figura 6, “DANONE 1,” “DANONE 2,” “DANONE 3” y “DANONE 4” son polvos de la solicitud y de la invención).

35 La Figura 7 muestra cómo cambia la constante de velocidad (producto $k \times C_0$) en función de la temperatura de almacenamiento. En la figura 7, “DANONE 1,” “DANONE 2,” y “DANONE 3” son polvos de la solicitud y de la invención, mientras que “Süwelack” (= “Dr. Süwelack M/A 5.4 Active”) y “EPI PY48” son polvos de la técnica anterior.

40 Las Figuras 8A y 8B muestran cómo la población se normalizó en fermentos lácticos a lo largo del tiempo para los polvos comerciales, y para polvos según la solicitud y la invención. Los polvos de la solicitud y de la invención son “DANONE 1,” “DANONE 2,” y “DANONE 3,” mientras que “Süw. M/A 5.4 Active” (= “Dr. Süwelack M/A 5.4 Active”) y “EPI PY48” son polvos de la técnica anterior.

45 Figura 8A: curva maestra en coordenadas lineales (línea gruesa continua = orden 2; líneas discontinuas = orden 2 más o menos 20 %)

Figura 8B: curva maestra en coordenadas logarítmicas (línea gruesa continua = orden 2; líneas discontinuas = orden 2 más o menos 20 %)

50 Las Figuras 9 y 10 muestran niveles de supervivencia acumulativos de ST (Figura 9) y LB (Figura 10), en porcentaje de la dosis inicial tras el paso al estómago y al intestino delgado.

Figura 9 (ST): polvo de la solicitud y de la invención expuesto o como relleno (las tres curvas superiores), en comparación con un yogur de referencia (curva inferior) obtenido con dosis de inoculación inferiores a las prescritas para la solicitud y la invención.

Figura 10 (ST): polvo de la solicitud y de la invención -polvo expuesto- (curva superior), en comparación con un yogur de referencia (curva inferior) obtenido con dosis de inoculación inferiores a las prescritas para la solicitud y la invención.

60 La Figura 11 muestra la velocidad de supervivencia de ST+LB medida durante el almacenamiento a una temperatura de 20 °C de polvos de la solicitud y de la invención (“Danone 1,” “Danone 2,” y “Danone 3”), y de un polvo comercial (“Dr Süwelack” = “Dr. Süwelack M/A 5.4 Active”).

Descripción detallada

65 La solicitud y la invención proponen una solución técnica para producir:

- una leche fermentada o yogur con una alta concentración en fermentos lácticos, en forma viva o viable, sin que sea necesario añadir fermentos lácticos que no participarían en la fermentación láctica y/o que se añadirían tras la inoculación, y sin que sea necesario concentrar la masa fermentada, y
- un polvo de leche fermentada o yogur con una alta concentración en fermentos lácticos, en forma viva o viable, que se puede obtener a partir de dicha leche fermentada o yogur con una alta concentración en fermentos lácticos, y sin añadir fermentos lácticos al polvo.

El propio polvo según la solicitud o la invención satisface la designación de leche fermentada o yogur.

10 Para este fin, la solicitud propone:

- la implementación de al menos una cepa de *S. thermophilus*, y de al menos una cepa de *L. bulgaricus* para la fermentación de un sustrato lácteo,
- en la inoculación de dichas cepas a un contenido muy superior al generalmente utilizado en la fabricación del yogur,
- 15 - en la selección preferiblemente de cepas de *S. thermophilus* que son cepas quebradizas,
- en la incorporación de al menos una cepa de *L. bulgaricus* a un nivel no despreciable, de modo que se desarrolla una simbiosis de *S. thermophilus* - *L. bulgaricus*,
- en la deshidratación de la leche fermentada o yogur obtenido en condiciones lo suficientemente suaves para mantener una población total de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* de al menos 1.10^7 ufc/l, preferentemente al menos 5.10^8 ufc/l, más preferentemente al menos 1.10^9 ufc/l, y
- 20 - preferiblemente, en la deshidratación de la leche fermentada o el yogur obtenido hasta que el polvo obtenido tiene una baja A_w (actividad de agua), preferentemente inferior o igual a 0,3, muy preferentemente inferior o igual a 0,25, con máxima preferencia inferior o igual a 0,2.

25 Como se describe en más detalle más adelante, y como queda ilustrado por los ejemplos de comparación anexos, el polvo de leche fermentada o yogur presenta propiedades de almacenamiento excepcionales.

Las características metabólicas de los polvos según la solicitud o la invención son al menos equivalentes a las de yogures de referencia.

30 Los polvos según la solicitud o la invención satisfacen la designación de yogur no solo debido a sus altos contenidos en fermentos de ST y LB vivos o viables, y por sus cinéticas de acidificación que se siguieron durante la fermentación láctica (ver Ejemplo 4 y Figura 4; ver Ejemplo 11), sino también debido a sus contenidos en metabolitos secundarios, que son al menos equivalentes a los de un yogur de referencia (ver el Ejemplo 10).

35 Cuando se sigue el método de la solicitud y de la invención, el sustrato lácteo recibe una inoculación masiva. Esta inoculación masiva proporciona un crecimiento muy limitado de la biomasa, en comparación con el crecimiento celular que se observaría durante la fabricación de yogures clásicos (dosis de cultivo clásicas, inferiores a las de la solicitud o la invención).

40 Los inventores demuestran que, a diferencia de lo que se podría haber previsto inicialmente, aunque el crecimiento celular se ve considerablemente reducido, la actividad de fermentación es al menos equivalente, incluso superior, a la que se puede observar durante la fermentación de un yogur clásico.

45 La solicitud y la invención proponen y logran desligar el crecimiento celular de la actividad de fermentación.

Los inventores demuestran que las características metabólicas de yogures, leches fermentadas, así como polvos según la solicitud o la invención son al menos equivalentes, incluso superiores, que lo que se puede observar en un yogur clásico.

50 De hecho, los inventores demuestran que para determinados metabolitos secundarios, tales como, por ejemplo, folatos (vitamina B9), las características de los polvos según la solicitud o la invención son incluso claramente superiores a las de los yogures de referencia (ver Ejemplo 10).

55 Además, las características metabólicas de los polvos según la solicitud o la invención, y en particular sus características de vitamina B9 superiores, se conservan durante el almacenamiento de los polvos según la solicitud o la invención durante varios meses, por ejemplo, durante al menos 4 meses a 20 °C (ver los Ejemplos 12 y 13).

En cambio, un yogur clásico generalmente no se puede mantener durante más de 48 horas a 20 °C sin que deje de ser apto para el consumo.

60 Como queda ilustrado en particular por los Ejemplos 4 y 10, la solicitud y la invención demuestran que el hecho de utilizar una inoculación masiva del sustrato lácteo produce no solo un metabolismo de fermentación conforme a una simbiosis ST+LB real, incluso cuando el crecimiento celular es mucho más limitado de lo que sería a dosis de inoculación clásicas, sino que además demuestran que el metabolismo de fermentación resultante es al menos equivalente, incluso superior a lo que se puede observar durante la fabricación clásica de yogur o leche fermentada.

65

La solicitud y la invención demuestran además que el hecho de combinar esta inoculación masiva con pulverizado suave pero profundo del yogur o leche fermentada obtenido(a) mediante inoculación masiva del sustrato lácteo, produce polvos con una estabilidad durante el almacenamiento excelente, y en particular una estabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

5 En la técnica anterior, existe la idea preconcebida de que un pulverizado profundo y, de forma más específica, un pulverizado a valores de Aw (actividad de agua) muy bajos, no produciría tasas de supervivencia satisfactorias para *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*.

10 Según una realización preferida, la solicitud y la invención proponen precisamente ir en contra de esta idea preconcebida llevando a cabo un pulverizado suave pero muy profundo, y combinar este procedimiento de pulverización con una inoculación masiva del sustrato lácteo.

15 La solicitud y la invención se refieren a un método de producción de un yogur o leche fermentada que produce un yogur o leche fermentada con una alta concentración en fermentos lácteos, sin que sea necesario añadir fermentos lácticos que no participarían en la fermentación láctica y/o que se añadirían tras la inoculación, y sin que sea necesario concentrar la masa fermentada.

20 El método de producción de un yogur o leche fermentada según la solicitud comprende:
 - la inoculación de un sustrato lácteo, sometida de forma opcional a un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización, mediante inoculación de al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* con una concentración alta, de forma ventajosa a una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g, y de al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* con una concentración alta, de forma ventajosa a una concentración de al menos $1 \cdot 10^6$ ufc/g, para producir un sustrato lácteo cultivado,
 25 - la fermentación láctica del sustrato lácteo sembrado resultante, para producir una leche fermentada o un yogur.

El método de producción de una leche fermentada o yogur según la invención comprende:
 - la inoculación de un sustrato lácteo, sometida de forma opcional a un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización, mediante inoculación de al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* y de
 30 al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* para producir un sustrato lácteo cultivado,
 - la fermentación láctica del sustrato lácteo sembrado resultante, para producir una leche fermentada o un yogur que contiene dichas cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en forma viva o viable, caracterizado por que dicha al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* se inocula a una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g, y por que dicha al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* se inocula a una
 35 concentración de al menos $1 \cdot 10^6$ ufc/g.

La solicitud y la invención también se refieren a un método de producción de un polvo de leche fermentada o de yogur que produce un polvo con una alta densidad en fermentos lácticos, sin que sea necesario añadir fermentos lácticos que no participarían en la fermentación láctica y, de forma más específica, sin que sea necesario añadir
 40 fermentos lácticos tras la inoculación inicial del sustrato lácteo líquido.

El método según la solicitud comprende:
 - la inoculación de un sustrato lácteo, sometida de forma opcional a un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización, mediante inoculación de al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* con una
 45 concentración alta, de forma ventajosa a una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g, y de al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* con una concentración alta, de forma ventajosa a una concentración de al menos $1 \cdot 10^6$ ufc/g, para producir un sustrato lácteo cultivado,
 - la fermentación láctica del sustrato lácteo sembrado resultante, para producir una leche fermentada o un yogur,
 50 - el pulverizado de la leche fermentada o yogur resultante.

De forma ventajosa, dicho pulverizado se lleva a cabo a condiciones, y en particular a una temperatura y/o duración y/o condiciones de velocidad y, más especialmente, en condiciones de temperatura que producen tasas de supervivencia de cada una de las cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, tales que el polvo obtenido contiene dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* y dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus*, en forma viva o
 55 viable, a una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g y de al menos $1 \cdot 10^4$ ufc/g, respectivamente.

Según una realización preferida, el pulverizado de la leche fermentada o yogur se lleva a cabo hasta que se produce una leche fermentada o polvo de yogur que presenta una Aw (actividad de agua) inferior o igual a 0,3, muy preferentemente inferior o igual a 0,25, con máxima preferencia inferior o igual a 0,2, intentando que las
 60 condiciones de pulverizado, y especialmente las condiciones de temperatura aplicadas, sean suficientemente favorables a la supervivencia de dichas cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* para producir tasas de supervivencia de cada una de dichas cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, de modo que el polvo obtenido contiene dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* y dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus*, en forma viva o viable, a una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g y de al menos $1 \cdot 10^4$ ufc/g, respectivamente.

65 El método de producción de un polvo según la invención comprende:

- la inoculación de un sustrato lácteo, sometida de forma opcional a un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización, mediante inoculación de al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* con una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g, y de al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* con una concentración de al menos $1 \cdot 10^6$ ufc/g, para producir un sustrato lácteo cultivado,
- 5 - la fermentación láctica del sustrato lácteo sembrado resultante, para producir una leche fermentada o un yogur,
- el pulverizado de la leche fermentada o yogur producido, asegurando que el(los) valor(es) de temperatura aplicados durante el pulverizado sean suficientemente favorables para la supervivencia de dichas cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* para que el polvo obtenido contenga dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* y dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus*, en forma viva o viable, a una concentración de al
- 10 menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g y de al menos $1 \cdot 10^4$ ufc/g, respectivamente, y la deshidratación de gránulos de polvo sobre un lecho vibratorio, a una temperatura de 25 °C a 40 °C, preferentemente de 30 °C, hasta producir una leche fermentada o un polvo de yogur que presente una A_w (actividad de agua) inferior o igual a 0,25.

15 Para conseguir la producción de un polvo con una alta concentración en fermentos lácticos, el método según la solicitud y la invención no requiere la adición de un fermento láctico sin participar en la fermentación láctica.

El método según la solicitud o de la invención no requiere que la leche fermentada o el yogur sea concentrado para lograr los altos contenidos en *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* deseados.

20 El método según la solicitud o la invención utiliza al menos un sustrato lácteo, al menos una cepa de *S. thermophilus*, y al menos una cepa de *L. bulgaricus*.

25 El término “sustrato lácteo”, en la solicitud o en la invención, significa “leche” en el sentido entendido en la industria láctea, es decir, un sustrato que contiene esencialmente leche y/o componentes lácteos, y cuya composición es tal que la fermentación láctica de este sustrato lácteo por cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* da lugar a un producto que se puede destinar a productos alimenticios para humanos, y más especialmente que cumple la designación de leche fermentada o yogur.

30 Por tanto, el término “sustrato lácteo” cubre leche de origen animal en todas sus formas y en todas sus variantes de composición: leche desnatada o no, leche concentrada o no, leche ultrafiltrada o no, leche fresca o no, leche en polvo o no, leche reconstituida o no, leche recombinada o no, leche enriquecida en constituyentes de leche o no, leche que tiene o no agentes añadidos útiles para la producción o para la calidad del producto final, tales como sabores, aromas, azúcares, etc.

35 Sin embargo, el término “sustrato lácteo” no incluye en su ámbito el significado de “medio de cultivo”. De hecho, el término “medio de cultivo” se refiere a un medio destinado a aumentar y/o estimular el crecimiento de fermentos lácteos, y de ese modo, producir un inóculo de fermentos lácteos, en donde el término “sustrato lácteo” se refiere a un medio destinado a ser transformado por fermentación, para producir un alimento previsto para el consumo humano. Por tanto, muchos componentes que se pueden añadir a un medio de cultivo para estimular y/o potenciar el crecimiento de fermentos lácteos no pueden ser añadidos a un sustrato lácteo para producir una leche fermentada o yogur.

40 Este es el caso especialmente de:

- muchos tensioactivos y/o emulsionantes y/o agentes solubilizantes y/o detergentes, tales como polioxietileno-sorbitán-20-monooleato (también conocido con el nombre de polisorbato 80, o Tween 80),
- citrato, ácidos de acetato,
- 45 - extractos cárnicos,
- peptonas de plantas,
- glicerofosfato.

50 Para utilizar el método según la solicitud de la invención, se inocular al menos una cepa de *S. thermophilus* con una alta concentración del sustrato lácteo. De forma ventajosa, se inocular a una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g.

55 Preferiblemente, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* se inocular en el sustrato lácteo a una concentración de al menos $1 \cdot 10^9$ ufc/g, más preferentemente de al menos $2 \cdot 10^9$ ufc/g, más preferentemente de al menos $2,5 \cdot 10^9$ ufc/g, muy preferentemente de al menos $2,6 \cdot 10^9$ ufc/g, aún más preferentemente de al menos $2,7 \cdot 10^9$ ufc/g.

Preferiblemente, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* se inocular en el sustrato lácteo a una concentración de entre $1 \cdot 10^9$ ufc/g y $1 \cdot 10^{10}$ ufc/g (límites incluidos).

60 Para utilizar el método según la solicitud o la invención, se inocular al menos una cepa de *S. thermophilus* en el sustrato lácteo. De forma ventajosa, se inocular en el sustrato lácteo a una concentración de al menos $1 \cdot 10^6$ ufc/g.

65 Preferiblemente, dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* se inocular en el sustrato lácteo a una concentración de al menos $1 \cdot 10^7$ ufc/g, más preferentemente de al menos $1,1 \cdot 10^7$ ufc/g, más preferentemente de al menos $1,2 \cdot 10^7$ ufc/g, muy preferentemente de al menos $1,3 \cdot 10^7$ ufc/g, aún más preferentemente de al menos $1,4 \cdot 10^7$ ufc/g.

Preferiblemente, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* se inocula en el sustrato lácteo a una concentración de entre 1.10^7 ufc/g y 5.10^8 ufc/g (límites incluidos).

5 Una vez cultivado el sustrato lácteo mediante una alta concentración de dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* y mediante una alta concentración de dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus*, se lleva a cabo la fermentación láctica según técnicas conocidas por el experto en la técnica para obtener un producto que satisfaga la designación de leche fermentada o yogur.

10 El sustrato lácteo cultivado se mantiene por lo tanto en condiciones, y especialmente en condiciones de temperatura, favorables para la actividad de fermentación de dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* y de dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus*, hasta que se obtiene una leche fermentada o un yogur. El pH inicial del sustrato lácteo es generalmente de entre 8 y 6, y cae a aproximadamente dos a cuatro unidades de pH y alcanza, al final de la fermentación láctica, un pH final que es generalmente de entre 5 y 4 (generalmente, un pH de 4,7-4,6 para el yogur).

15 En la solicitud o la invención, todos los términos adquieren el ámbito y significado que tienen habitualmente en el ámbito de la industria láctea y/o de la industria alimentaria.

20 Por tanto, cuando se menciona “fermentación láctica” se hace referencia a una fermentación láctica acidificante, que significa una acidificación tras la producción de ácido láctico que puede ir acompañada de la producción de otros ácidos, de dióxido de carbono, y de diversas sustancias tales como exopolisacáridos (EPS) o sustancias aromáticas, por ejemplo, diacetilo y acetaldehído.

25 Del mismo modo, se entiende que “fermento láctico” significa un microorganismo o cepa de microorganismo vivo o viable que puede llevar a cabo dicha fermentación láctica acidificante en un sustrato lácteo.

30 Los términos “leches fermentadas” y “yogur” adquieren sus significados habituales en el ámbito de la industria láctea, es decir, productos previstos para el consumo animal y, de forma más específica, el consumo humano, y que proceden de la fermentación láctica acidificante de un sustrato lácteo. Dichos productos pueden contener ingredientes secundarios, tales como fruta, verduras, azúcares, sabores, etc.

35 La designación de “leche fermentada” y “yogur” satisface estrictas normativas oficiales. Puede consultarse el Codex Alimentarius (elaborado por la Comisión del Codex Alimentarius, bajo el control de la FAO y la OMS, y publicado por la División de Información de la FAO, disponible *online* en <http://codexalimentarius.net>; ver, concretamente, el volumen 12 del Codex Alimentarius “Code Standards for Milk and Milk Products”, y la normativa “CODEX STAN A-11(a)-1975”, ahora con la referencia CODEX STAN 243-2003).

Se puede consultar de forma más específica el Decreto Francés núm. 88-1203, del 30 de diciembre de 1988 sobre leches fermentadas y yogur o yogur, publicado en el Boletín Oficial de la República Francesa el 31 de diciembre de 1988.

40 Por tanto, un yogur no contiene fermentos lácticos distintos de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, mientras que una leche fermentada puede contener otras bacterias además de dichas dos especies.

45 Por tanto, el término “leche fermentada” se reserva en la solicitud o la invención al producto lácteo preparado con un sustrato lácteo sometido a un tratamiento al menos equivalente a la pasteurización, cultivado con microorganismos pertenecientes a las especies o especies características de cada producto. La coagulación de “leches fermentadas” no debe obtenerse por métodos distintos de los que derivan de la actividad de los microorganismos utilizados.

50 El término “yogur” (o “yogur”) se reserva para leche fermentada obtenida, según procedimientos leales y tradicionales, mediante el desarrollo de fermentos lácticos termófilos específicos denominados *Lactobacillus bulgaricus* (también llamados *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) y *Streptococcus thermophilus*, que se pueden encontrar vivos en el producto acabado, con un contenido de al menos 1.10^7 ufc de bacterias *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* por gramo de producto, referido a la parte láctea de este producto. Un producto que satisface la designación de yogur contendrá por lo tanto al menos una cepa de *S. thermophilus* y al menos una cepa de *L. bulgaricus* en forma viva, a un nivel de al menos 1.10^7 ufc de parte láctea.

55 La coagulación de “yogur” no debe obtenerse por métodos distintos de los que se derivan de la actividad de los microorganismos utilizados.

60 Una “leche fermentada” o un “yogur” no se ha sometido a un tratamiento que retira un elemento constituyente del sustrato lácteo utilizado y, en particular, no se ha sometido a ningún drenado del coágulo.

Una “leche fermentada” o un “yogur” puede tener uno o más extractos de sabor, uno o más sabores naturales y, dentro del límite del 30 al 100 en peso del producto acabado, uno o más azúcares y otros productos alimenticios que proporcionan un sabor específico, o cereales.

65 La incorporación como productos de sustitución de grasa y/o proteína no láctea está prohibida.

La cantidad de ácido láctico libre contenido en una leche fermentada no debe ser inferior a 0,6 gramos por 100 gramos cuando se vende al consumidor, y el contenido en proteína referido a la parte láctea no debe ser inferior al de una leche normal.

5 La cantidad de ácido láctico libre contenido en un yogur no debe ser inferior a 0,7 gramos por 100 gramos cuando se vende al consumidor.

10 Según la solicitud o la invención, la leche fermentada o el yogur que se obtiene por inoculación de dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* y dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* contendrá dichas cepas a una concentración ligeramente superior a la de su inoculación.

Una leche fermentada o yogur producido según la solicitud o la invención podría por lo tanto contener:

- 15 - dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* a una concentración de al menos ufc/g, preferentemente de al menos $1 \cdot 10^9$ ufc/g, más preferentemente de al menos $2 \cdot 10^9$ ufc/g, más preferentemente de al menos $2,5 \cdot 10^9$ ufc/g, muy preferentemente de al menos $2,6 \cdot 10^9$ ufc/g, aún más preferentemente de al menos $2,7 \cdot 10^9$ ufc/g, y
- 20 - dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* a una concentración de al menos $1 \cdot 10^7$ ufc/g, más preferentemente de al menos $1,1 \cdot 10^7$ ufc/g, más preferentemente de al menos $1,2 \cdot 10^7$ ufc/g, muy preferentemente de al menos $1,3 \cdot 10^7$ ufc/g, aún más preferentemente de al menos $1,4 \cdot 10^7$ ufc/g.

Preferiblemente, un producto de leche fermentada o yogur según la solicitud o la invención contendrá:

- 25 - dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* a una concentración de entre $1 \cdot 10^9$ ufc/g y $1 \cdot 10^{10}$ ufc/g (límites incluidos), y
- dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* a una concentración de entre $1 \cdot 10^7$ ufc/g y $5 \cdot 10^8$ ufc/g (límites incluidos).

30 Un yogur o leche fermentada conforme a la solicitud o la invención comprende una alta densidad en ST y LB en forma viva o viable (contenidos en ST y LB en forma viva como se describe en la solicitud o para la invención, respectivamente, por ejemplo, un contenido en ST vivo superior o igual a $5 \cdot 10^9$ ufc/g y un contenido en LB vivo superior o igual a $1 \cdot 10^7$ ufc/g).

Según una realización específica de la solicitud o la invención, el yogur o leche fermentada producido adicionalmente presenta un alto contenido en materia seca.

35 En la solicitud o la invención, el contenido en materia seca, o el contenido en MS, corresponde a la masa de material residual medida después de poner el producto a 105 °C durante 17 horas, con respecto al volumen inicial o masa inicial del producto.

40 Un contenido en MS se puede medir directamente, es decir, colocando el producto cuyo contenido en MS queremos saber durante 17 horas a 105 °C, y midiendo la masa de material residual que contenía el volumen inicial del producto tratado de este modo.

45 Un contenido en MS se puede medir directamente, es decir, midiendo un parámetro del producto a partir del cual se puede deducir o estimar el contenido en MS. Por ejemplo, el experto en la técnica puede medir la densidad del producto a una temperatura dada (por ejemplo, a 45 °C), y deducir de ahí el contenido en MS correspondiente, por ejemplo utilizando una tabla o una curva de correspondencia que habrá sido establecida previamente por el experto en la técnica, para deducir a partir de la medición de densidad a una temperatura dada, el valor de MS correspondiente para el producto considerado. En productos tales como el sustrato lácteo de partida, se prefieren de forma más general mediciones indirectas porque son más rápidas de usar que el método directo.

50 Un sustrato lácteo clásico presenta un contenido en MS del orden de 10-20 %, por ejemplo, de 11-13 %. Un yogur o leche fermentada obtenida por fermentación láctica de dicha clase de sustrato lácteo presenta contenidos en MS que no difieren de forma apreciable de los correspondientes al sustrato lácteo inicial, es decir, un contenido en MS convencional del orden de 10-20 %.

55 Para implementar la solicitud o la invención, se puede utilizar un sustrato con un contenido en MS convencional.

60 Según una realización específica de la solicitud o la invención, se produce yogur o leches fermentadas que, además de presentar un alto contenido en ST y LB como se indica para la invención o la solicitud, presentan un contenido en MS superior al contenido en MS convencional y, de forma más específica, un contenido en MS superior o igual a 25 %, por ejemplo de 25-60 %, preferentemente superior o igual a 28 %, por ejemplo, de 28-55 %, más preferentemente superior o igual a 30 %, por ejemplo de 30-45 %, muy preferentemente de 36-40 %.

65 Para producir dicho yogur o leches fermentadas, es adecuado inocular ST y LB a niveles de contenido conforme a la solicitud o la invención en un sustrato lácteo cuyo contenido en MS no sea apreciablemente distinto o sea similar al deseado para el yogur o leche fermentada que se obtendrá de la fermentación láctica de dicho sustrato. Para que el producto obtenido por la fermentación láctica satisfaga siempre la designación de yogur o leche

fermentada, es obviamente adecuado no utilizar un sustrato lácteo cuyo contenido en MS sea tan alto que el producto fermentado obtenido no cumpliría la definición de un yogur o leche fermentada, sino que pertenecería a otros productos lácteos tales como, por ejemplo, los quesos. Se recomienda por lo tanto seleccionar un sustrato lácteo cuyo contenido en MS no supere 60 %, preferiblemente 55 %, más preferentemente 45 %.

5 Por tanto, según una realización específica de la solicitud o de la invención, el sustrato lácteo utilizado puede presentar un contenido en MS de 25-60 %, preferentemente de 28-55 %, más preferentemente de 28-45 %, aún más preferentemente del orden de 30-45 %, muy preferentemente de 36-40 %.

10 Para aumentar el contenido en MS del yogur o la leche fermentada, sin hacer que el producto pierda su designación de yogur o leche fermentada, el sustrato lácteo sobre el cual se prevé llevar a cabo la fermentación de ST+LB conforme a la solicitud o la invención puede ser concentrado.

15 Por tanto, antes de la inoculación del ST y del LB, el sustrato lácteo se puede concentrar, por ejemplo, retirando una parte del agua contenida en el sustrato lácteo. Esta retirada de agua puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante evaporación; por ejemplo, calentando el sustrato lácteo hasta obtener el contenido en MS deseado. El sustrato lácteo puede ponerse por tanto a una o más temperatura(s) del orden de 40-90 °C, por ejemplo sometiendo el sustrato lácteo a un gradiente de temperatura que oscila de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 50 °C o 40 °C, como sucede, por ejemplo, cuando se utilizan evaporadores industriales.

20 Por seguridad, al menos un tratamiento sanitario del sustrato lácteo puede preceder a esta etapa de concentración, y/o se puede llevar a cabo después de la etapa de concentración pero antes de la inoculación de las bacterias ST y LB. Un tratamiento sanitario como este es un tratamiento del sustrato lácteo destinado a higienizarlo o estabilizarlo, destruyendo o inhibiendo todos o parte de los agentes microbianos que el sustrato lácteo pueda contener, y más especialmente todos los agentes microbianos que pueden causar problemas de salud en los consumidores, y preferiblemente todos o parte de los agentes microbianos que pueden degradar el propio alimento. Ejemplos de dichos tratamientos sanitarios comprenden, por ejemplo, un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización (por ejemplo, tratamiento al menos equivalente a aplicar una temperatura de al menos 72 °C durante al menos 15 segundos, por ejemplo, una temperatura de 90 °C durante 30 segundos antes de concentrar el sustrato y/o una temperatura de 75 °C durante 15 segundos tras la concentración del sustrato).

25 Para aumentar el contenido en MS del yogur o leche fermentada, sin hacer que el producto pierda su designación de yogur o leche fermentada, el sustrato lácteo que se prevé fermentar puede tener al menos un componente añadido que constituya un aporte de MS.

30 Como el producto a fabricar debe satisfacer la designación de yogur o leche fermentada, se hará referencia a la normativa CODEX STAN A-11(a)-1975 (denominada ahora CODEX STAN 243-2003) y/o al decreto núm. 88-1203 de la República Francesa, para confirmar que el componente o componentes previstos para constituir un aporte de MS sean compatibles con la definición de yogur o leche fermentada. Por tanto, se evitará escoger un componente que pueda modificar la textura y/o la estructura del sustrato lácteo de forma demasiado significativa, de modo el que producto fermentado resultante tiene de hecho la estructura y la textura de un yogur o una leche fermentada.

Dicho componente es por lo tanto preferiblemente un producto derivado de leche.

35 Dicho componente será preferiblemente bajo en proteína, para limitar los problemas de coagulación.

De forma ventajosa, se escoge un compuesto que contiene lactosa, preferiblemente un componente rico en lactosa, tal como el lactosuero, desmineralizado de forma ventajosa o lactosuero ligero (pH de aproximadamente 6,5), cuya lactosa no se ha retirado.

40 Si dicho al menos un componente añadido como aporte de MS está en forma sólida, supone un aporte directo de MS.

45 Sin embargo, si dicho al menos un componente añadido como aporte de MS está en forma líquida, es adecuado tener en cuenta que, además de la adición a la MS, este componente también aporta agua, de modo que el contenido en MS resultante puede no ser muy superior al del sustrato lácteo inicial. Es lo que sucede, por ejemplo, cuando se escoge para añadir lactosuero en forma líquida al sustrato lácteo inicial. En tales casos, la operación de adición de componentes que aportan MS irá a una operación de concentración del sustrato lácteo retirando una parte del agua contenida, como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, de una operación de evaporación.

50 Se garantizará que dicho al menos un componente añadido como aporte de MS se trate, o se haya tratado, de modo que esté exento de agentes microbianos que puedan causar problemas de salud a los consumidores y, preferiblemente, de cualquier agente microbiano que pueda causar la degradación del propio alimento. Dichos tratamientos sanitarios incluyen especialmente un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización (por ejemplo, tratamiento al menos equivalente a aplicar una temperatura de al menos 72 °C durante al menos 15 segundos, por ejemplo, una temperatura de 90 °C durante 30 segundos antes de concentrar el sustrato y/o una temperatura de 75 °C durante 15 segundos después de concentrar el sustrato).

Un ejemplo de implementación de la realización específica de la solicitud o de la invención comprende:

- a)** el tratamiento de un sustrato lácteo (cuya composición es tal que permite que este sustrato satisfaga, tras la fermentación láctica, la designación de yogur o leche fermentada), para lograr un contenido en MS superior o igual a 25 % e inferior o igual a 60 %, preferentemente superior o igual a 28 % y/o inferior o igual a 55 %, más preferentemente superior o igual a 30 % y/o inferior o igual a 45 %, muy preferentemente de 36-40 %, sin hacer que pierda su capacidad de satisfacer, una vez fermentado, la designación de yogur o leche fermentada, siendo el sustrato lácteo tratado de este modo un sustrato lácteo con un alto contenido en MS, en donde este tratamiento de dicho sustrato lácteo podría obtenerse, por ejemplo:
- 5 **i.** concentrando la MS del sustrato lácteo, por ejemplo, retirando una parte del agua que contiene, por ejemplo, por evaporación, y/o
- 10 **ii.** añadiendo al sustrato lácteo al menos un componente previsto para aportar MS al sustrato lácteo a fermentar, y cuya naturaleza es tal que no impide que dicho sustrato lácteo satisfaga, una vez fermentado, la designación de yogur o leche fermentada,
- 15 **b)** de forma opcional, el tratamiento sanitario del sustrato lácteo con un alto contenido en MS, para higienizarlo o estabilizarlo, destruyendo o inhibiendo todos o parte de los agentes microbianos que pueda contener, y más especialmente todos los agentes microbianos que pueden ocasionar problemas de salud en los consumidores, y preferiblemente todos o parte de los agentes microbianos que pueden causar la degradación del propio alimento, por ejemplo, tratando dicho sustrato mediante un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización (por ejemplo, tratamiento al menos equivalente a aplicar una temperatura de al menos 72 °C durante al menos 15 segundos, por ejemplo, una temperatura de 90 °C durante 30 segundos),
- 20 **c)** inoculación de dicho sustrato lácteo con un alto contenido en MS, sometido de forma opcional al tratamiento higienizante de la etapa b), por al menos una cepa de ST y al menos una cepa de LB a altos contenidos, conforme a la solicitud o la invención, como se describe en la presente memoria,
- 25 **d)** el proceso de fermentación láctica hasta que se produce yogur o leches fermentadas (en el caso de un yogur, el pH que marca el final de la fermentación es generalmente 4,8 +0,5/-0,3 unidades de pH, por ejemplo, pH = 4,8 +0,4/-0,3, por ejemplo, pH = 4,8 +/- 0,3 unidades de pH, por ejemplo, pH 4,8 +/- 0,2 unidades de pH, preferentemente pH 4,8 +0,5/-0,1; para una leche fermentada distinta del yogur, el pH que marca el final de la fermentación es generalmente 4,6 +/- 0,2 unidades de pH),
- 30 **e)** el yogur o las leches fermentadas obtenidas son entonces yogur o leches fermentadas con altos contenidos en ST y LB y con un alto contenido en MS, conforme a la solicitud o la invención, respectivamente,
- f)** si se desea, la pulverización del yogur o las leches fermentadas obtenidas, para producir un polvo cuyas poblaciones de ST y LB en forma viva o viable sean conforme a la solicitud o la invención, como se describe para la invención o la solicitud, respectivamente.

35 El método puede también comprender uno o más tratamientos sanitarios del producto en cuestión (es decir, de la leche, aportando dicho al menos un componente MS y/o de dicho sustrato o “mezcla” láctea), en cualquier momento que el experto en la técnica considere adecuado, por ejemplo, antes y/o después de la etapa b), y/o antes de la etapa c).

40 Dicho tratamiento sanitario se lleva a cabo con el fin de destruir o inhibir todo o parte de los agentes microbianos que pueda contener y, más especialmente, todos los agentes microbianos que pueden ocasionar problemas de salud en los consumidores, y preferiblemente todos o parte de los agentes microbianos que pueden causar la degradación del propio alimento, por ejemplo mediante tratamiento del propio alimento, por ejemplo mediante un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización (por ejemplo, tratamiento al menos equivalente a la aplicación de una temperatura de al menos 72 °C durante al menos 15 segundos, por ejemplo, una temperatura de 90 °C durante 30 segundos),

45

En el Ejemplo 12, se presenta un ejemplo concreto de implementación de la característica de “yogur con un alto contenido en MS” de la solicitud o de la invención.

50 Una vez obtenido, el yogur o la leche fermentada con un alto contenido en ST y LC y con un alto contenido en MS conforme a la solicitud se puede pulverizar como se describe en la solicitud, hasta obtenerse un valor de Aw (actividad de agua) bajo, preferiblemente hasta que se obtiene un valor de Aw inferior o igual a 0,3, preferentemente inferior o igual a 0,25, preferentemente inferior o igual a 0,2, como se describe más adelante en la presente memoria. La deshidratación debe ser lo suficientemente eficaz como para lograr el valor de Aw deseado, y lo suficientemente suave para conservar el máximo de bacterias ST y LB en forma viva o viable.

55

Para lograr esta pulverización, el proceso es como se describe en la solicitud para yogur con un contenido en MS convencional, por ejemplo utilizando un dispositivo de atomización correspondiente al diagrama presentado en la Figura 3, y/o como se describe en el Ejemplo 3. Otro ejemplo de deshidratación se presenta también en el Ejemplo 9.

60

Una vez se ha obtenido, se pulveriza la leche fermentada o el yogur con altos contenidos en ST y LB conforme a la invención, asegurando que el(los) valor(es) de temperatura aplicados durante el pulverizado sean suficientemente favorables para la supervivencia de dichas cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* para que el polvo obtenido contenga dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* y dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus*, en forma viva o viable, a una concentración de al menos $5 \cdot 10^3$ ufc/g y de al menos $1 \cdot 10^4$ ufc/g, respectivamente, y la deshidratación de gránulos de polvo sobre un lecho vibratorio, a una temperatura de 25 °C a 40 °C, preferentemente de 30 °C,

65

hasta obtenerse una leche fermentada o un polvo de yogur que presenta una Aw (actividad de agua) inferior o igual a 0,25, preferentemente inferior o igual a 0,2, de forma ventajosa de 0,09 a 0,19.

5 La leche fermentada o el yogur obtenidos por fermentación láctica se pulverizan entonces en condiciones que permiten la producción de una determinada tasa de supervivencia de cada una de las cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*.

La pulverización de una leche fermentada o de un yogur destruye la integridad de la membrana y, de forma más general, mata parte de los fermentos lácticos presentes en la leche fermentada o el yogur.

10 Al mismo tiempo, la pulverización da lugar a una concentración del contenido en fermento láctico, en la medida en que un polvo está constituido de 95 a 99 % de materia seca, mientras que la leche fermentada o el yogur es una masa húmeda, cuya masa seca representa generalmente solo de 15 a 20 % de su masa total.

15 Preferiblemente, dicha pulverización se lleva a cabo de modo que dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* está contenida en el polvo según la solicitud o la invención en forma viva o viable a un contenido de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g, más preferentemente de al menos $1 \cdot 10^9$ ufc/g, aún más preferentemente de al menos $2 \cdot 10^9$ ufc/g, muy preferentemente de al menos $3 \cdot 10^9$ ufc/g.

20 Preferiblemente, dicha pulverización se lleva a cabo de modo que dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* está contenida en el polvo según la solicitud o la invención en forma viva o viable a un contenido de entre $1 \cdot 10^9$ ufc/g y $1 \cdot 10^{10}$ ufc/g (incluidos los límites).

25 Preferiblemente, dicha pulverización se lleva a cabo de modo que dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* está contenida en el polvo según la solicitud o la invención en forma viva o viable a un contenido de al menos $1 \cdot 10^4$ ufc/g, preferentemente de al menos $2 \cdot 10^4$ ufc/g, preferentemente de al menos $3 \cdot 10^4$ ufc/g, más preferentemente de al menos $4 \cdot 10^4$ ufc/g, muy preferentemente de al menos $8 \cdot 10^4$ ufc/g, muy preferentemente de al menos $1 \cdot 10^5$ ufc/g, aún más preferentemente al menos $3 \cdot 10^5$ ufc/g.

30 Preferiblemente, dicha pulverización se lleva a cabo de modo que dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* está contenida en el polvo según la solicitud o la invención en forma viva o viable a un contenido de entre $1 \cdot 10^4$ ufc/g y $1 \cdot 10^5$ ufc/g.

35 Todas las combinaciones del contenido en *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* están incluidas en el contenido de la solicitud de patente.

40 Por ejemplo, y de forma ventajosa, la leche fermentada o yogur obtenido se puede pulverizar en condiciones que producen una tasa de supervivencia de cada una de dichas cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, de modo que el polvo obtenido contiene dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* a una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g, preferentemente de al menos $1 \cdot 10^9$ ufc/g, y dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus*, en forma viva o viable a una concentración de al menos $1 \cdot 10^4$ ufc/g, preferentemente de al menos $4 \cdot 10^4$ ufc/g, respectivamente.

45 La tasa de supervivencia de dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* y dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* depende de la naturaleza de dichas cepas, el tipo del método de pulverización utilizado, y condiciones de suavidad variables, en las que se aplica este método.

La pulverización de la leche fermentada o del yogur será suficientemente suave para asegurar en el mejor de los casos el almacenamiento de cada uno de los fermentos lácticos inoculados en forma viva o viable.

50 Se puede procesar de forma ventajosa mediante atomización con una temperatura de flujo de gas (aire) tal que la temperatura del producto (polvo) no supere 80 °C, por ejemplo, una temperatura de flujo de gas (aire) de 190-210 °C. De forma ventajosa, esta atomización se asocia con la deshidratación complementaria de gránulos sobre un lecho fluidizado; por ejemplo, un lecho fluidizado dentro del fondo de la torre de atomización. De forma ventajosa, la temperatura del flujo de gas (aire) para el lecho fluidizado (= temperatura de salida, si este lecho está dentro de la torre y está en el fondo de la torre) es inferior o igual a 100 °C, preferiblemente inferior o igual a 80 °C, más preferentemente de 60 °C a 80 °C, de forma ventajosa de aproximadamente 70 °C (ver Ejemplo 3 y la Figura 3).

55 En el ámbito de la solicitud o de la invención, la pulverización presenta preferiblemente un rendimiento:
 - de al menos aproximadamente 20 % para dicha al menos una cepa de *S. thermophilus*, preferentemente de al menos 25 %, más preferentemente de al menos 30 %, y
 60 - de al menos $2 \cdot 10^{-5}$ % para dicha cepa de *L. bulgaricus*, preferentemente al menos $5 \cdot 10^{-5}$ %, más preferentemente al menos 0,1 %, muy preferentemente de al menos 0,5 %.

La pulverización de la leche fermentada o del yogur se lleva a cabo en condiciones de deshidratación suficientemente profunda para dar lugar a un polvo de leche fermentada o de yogur que presenta una baja Aw (actividad de agua).

65

- De forma ventajosa, la pulverización de la leche fermentada o del yogur según la solicitud se lleva a cabo bajo condiciones de deshidratación que dan lugar a un polvo de leche fermentada o de yogur que, después de la pulverización, presenta una A_w (actividad de agua) medida a temperatura ambiente (temperatura de 20-26 °C, por ejemplo de 25 °C), que es inferior o igual a 0,3, preferentemente inferior o igual a 0,25, muy preferiblemente inferior a 0,25, de forma ventajosa inferior o igual a 0,2. Preferiblemente, esta A_w será superior o igual a 0,05, preferentemente superior o igual a 0,09. Según una realización preferida de la solicitud o de la invención, esta A_w será de 0,05-0,25, preferentemente de 0,05-0,20, muy preferentemente de 0,09-0,19, por ejemplo, de 0,10-0,19.
- La pulverización de la leche fermentada o del yogur según la invención se lleva a cabo bajo condiciones de deshidratación que dan lugar a un polvo de leche fermentada o de yogur que, después de la pulverización, presenta una A_w (actividad de agua) medida a temperatura ambiente (temperatura de 20-26 °C, por ejemplo de 25 °C), que es inferior o igual a 0,25, preferentemente inferior o igual a 0,20, de forma ventajosa de 0,09 a 0,19.
- La pulverización de la leche fermentada o del yogur se lleva a cabo mediante deshidratación y transformación física en forma de gránulo (= granulación).
- Las condiciones de pulverización son por lo tanto los parámetros físicos que se aplican a la leche fermentada o al yogur para producir la deshidratación y la granulación deseadas.
- Los parámetros aplicados durante la pulverización pueden ser ajustados por el experto en la técnica para lograr la tasa de supervivencia deseada y el valor de A_w deseado. Se trata de ajustes que se pueden hacer por ensayo y error utilizando el conocimiento general del experto en la técnica.
- Dichos parámetros deben tener un efecto suficientemente suave en las células de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* para tener la tasa de supervivencia deseada, y al mismo tiempo tener un efecto suficientemente profundo para lograr el valor de A_w deseado.
- Un parámetro esencial para la supervivencia de las células de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* es la temperatura (o el gradiente de temperatura) que se aplica para deshidratar la leche fermentada o el yogur.
- Si la pulverización comprende evaporación de agua, el experto en la técnica puede escoger una temperatura lo suficientemente baja (o un gradiente de temperatura suficientemente bajo o suave) para lograr la tasa de supervivencia deseada.
- Si la pulverización comprende sublimación de agua, el experto en la técnica puede escoger una temperatura lo suficientemente alta (o un gradiente de temperatura suficientemente bajo o suave) para lograr la tasa de supervivencia deseada. Será adecuado entonces aplicar esta temperatura (o este gradiente de temperatura) durante un tiempo lo suficientemente largo para lograr el valor de A_w deseado.
- El experto en la técnica puede por lo tanto ajustar estos parámetros de temperatura y duración para lograr el objetivo de supervivencia y el valor de A_w deseado.
- Si la pulverización se lleva a cabo mediante atomización, la deshidratación y la granulación se llevan a cabo conjuntamente en la torre de atomización.
- Si la pulverización se lleva a cabo mediante liofilización, primero se produce deshidratación por liofilización, pulverizando a continuación la torta resultante de la liofilización, para transformar dicha torta en gránulos de polvo.
- Si se desea o se requiere, la pulverización según la solicitud puede comprender una o más deshidrataciones extra, por ejemplo realizando la deshidratación sobre un lecho fluidizado y/o un lecho vibratorio. Preferiblemente, esta o estas deshidrataciones extra se llevan a cabo a una temperatura de 25-80 °C. La invención comprende la deshidratación extra de gránulos de polvo sobre un lecho vibratorio a una temperatura de 25 °C a 40 °C, preferentemente a 30 °C.
- Dichas deshidrataciones extra pueden ser requeridas especialmente cuando los gránulos obtenidos por la atomización o, si es necesario, tras la liofilización-granulación, presentan la tasa de supervivencia requerida, pero no han alcanzado el valor de A_w deseado. Los gránulos de polvo se pueden poner a una o más temperaturas muy suaves, que completarán la deshidratación de los gránulos hasta que se alcance el valor de A_w deseado, sin hacer que los contenidos de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* caigan por debajo de los contenidos mínimos requeridos. Dado que en esta etapa los gránulos ya están formados, las temperaturas aplicadas como deshidratación extra deben ser muy suaves, por ejemplo, de 25 °C-90 °C.
- Por ejemplo, la pulverización se puede llevar a cabo mediante liofilización y granulación de la torta de liofilización, y puede también comprender una deshidratación extra sobre un lecho externo, por ejemplo un lecho vibratorio externo.
- Por ejemplo, la pulverización se puede realizar mediante atomización (preferiblemente, con cuidado de que la temperatura del producto no supere 80 °C), y comprende además una deshidratación sobre un lecho fluidizado de

gránulos de polvo obtenidos mediante atomización. Este lecho fluidizado es preferentemente un lecho fluidizado interno, en el fondo de la torre de atomización. Esta deshidratación extra sobre un lecho fluidizado puede de forma ventajosa ir seguida de una deshidratación sobre un lecho externo, por ejemplo un lecho vibratorio externo (preferentemente, a una temperatura próxima a la temperatura ambiente, por ejemplo, de 25-40 °C).

5 Este tipo de deshidratación extra es una realización preferida de la solicitud. Según una realización preferida de la solicitud, la pulverización por lo tanto comprende, además de la deshidratación aplicada para formar los gránulos de polvo, una o más deshidrataciones que se aplican a los gránulos de polvo ya formados.

10 De hecho, los inventores han observado que es más eficaz formar gránulos de polvo que comprenden la tasa de supervivencia deseada, pero sin completar la retirada del agua contenida, es decir, aproximándose al valor de A_w deseado pero sin alcanzarlo, para estabilizar los fermentos de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* contenidos sin someterlos a demasiado estrés, y para aplicar después de esta deshidratación de granulación una deshidratación extra de gránulos, preferentemente a temperaturas de 25 a 85 °C, por ejemplo sobre un lecho fluidizado (de forma ventajosa, con una temperatura de aire de 60 a 80 °C) y/o sobre un lecho vibratorio (de forma ventajosa, a una temperatura de 25-40 °C).

15 Según una realización preferida de la solicitud, la granulación se produce por atomización, y la deshidratación es una deshidratación en tres puntos, de forma que:

- 20 - pulverización por atomización (preferiblemente, con cuidado de que la temperatura del producto no supere 80 °C), y
- secando los gránulos de polvo que se han obtenido por atomización sobre un lecho fluidizado, siendo este lecho fluidizado preferentemente un lecho fluidizado interno, en el fondo de la torre de atomización, estando seguido esta primera deshidratación extra de
- 25 - deshidratación sobre un lecho externo, por ejemplo un lecho vibratorio externo (preferentemente, a una temperatura próxima a la temperatura ambiente, por ejemplo, de 25-40 °C).

Según una realización preferida de la invención, la granulación se produce por atomización, y la deshidratación es una deshidratación en tres puntos, de forma que:

- 30 - pulverización por atomización (preferiblemente, con cuidado de que la temperatura del producto no supere 80 °C), y
- deshidratación de los gránulos de polvo que se han obtenido por atomización sobre un lecho fluidizado, siendo este lecho fluidizado preferentemente un lecho fluidizado interno, en el fondo de la torre de atomización, estando seguido esta primera deshidratación extra de
- 35 - deshidratación de un lecho vibratorio externo a una temperatura de 25 a 40 °C.

En el Ejemplo 1 se describen ejemplos de producción de un polvo conforme a la solicitud o la invención, y en los Ejemplos 3 y 9 se describen ejemplos ventajosos de pulverización.

40 La torre según la solicitud o la invención presenta muy buenas propiedades de almacenamiento: el polvo según la solicitud o la invención mantiene su característica inicial relativa al nivel de color y textura, y sus características de sabor, cuando se almacena el polvo durante al menos 4 meses a 20 °C. Además, el contenido en *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* contenido en el polvo en forma viva o viable permanece alto a lo largo del tiempo.

45 El polvo de leche fermentada o de yogur según la solicitud o la invención mantiene al menos 1.10^7 ufc/g de fermentos lácticos vivos o viables (población total de fermentos de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*), tras el almacenamiento de este polvo durante seis meses a 20 °C, sin que se haya añadido nada de *S. thermophilus* o *L. bulgaricus*.

50 De forma ventajosa, el polvo según la solicitud o la invención no experimenta pérdidas detectables de *S. thermophilus* con respecto a la leche fermentada o al yogur del que procede tras 4 meses o más de almacenamiento a una temperatura de 20 °C.

El polvo de leche fermentada o de yogur según la solicitud o la invención mantiene de forma ventajosa:

- 55 - al menos 5.10^8 ufc/g, más preferentemente al menos 1.10^9 ufc/g, de dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* en forma viva o viable, y
- al menos 1.10^4 ufc/g de dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* en forma viva o viable, preferentemente al menos 2.10^4 ufc/g, preferentemente al menos 3.10^4 ufc/g, más preferentemente al menos 4.10^4 ufc/g, muy preferentemente al menos 8.10^4 ufc/g, muy preferentemente al menos 1.10^5 ufc/g, aún más preferentemente al menos 3.10^5 ufc/g de dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* en forma viva o viable, después de almacenar este polvo a 20 °C durante cuatro meses, incluso más, sin haber añadido *S. thermophilus* o *L. bulgaricus* exógenas.

60 De forma ventajosa, tras 4 meses a 20 °C, los polvos de la solicitud o de la invención constituyen al menos 2.10^8 ufc/g de la población total de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* en forma viva o viable. Más generalmente, esta población total es de al menos $3,5.10^8$ ufc/g, muy frecuentemente al menos 4.10^8 ufc/g. Esto se da especialmente cuando el sustrato lácteo utilizado para producir el yogur o la leche fermentada tiene un contenido en MS convencional, es decir, un contenido en MS de 10 a 20 %, por ejemplo, de 11-13 %.

65

De un modo especialmente destacable, según una realización de la solicitud o de la invención, la tasa de supervivencia de la población total de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* contenida en un polvo de la solicitud o de la invención es de al menos 80 % tras 4 meses de almacenamiento del polvo a una temperatura de 20 °C.

5 Esto se da especialmente cuando el sustrato lácteo utilizado para producir el yogur o la leche fermentada tiene un contenido en MS convencional, es decir, un contenido en MS de 10 a 20 %, por ejemplo, de 11-13 %.

De forma muy ventajosa, tras 6 meses a 20 °C, los polvos de la solicitud o de la invención comprenden más de $1,0 \cdot 10^7$ ufc/g de la población total de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* en forma viva o viable, más generalmente al menos $5 \cdot 10^7$ ufc/g. Frecuentemente, esta población total es de al menos $1,10^8$ ufc/g, muy frecuentemente al menos $4 \cdot 10^8$ ufc/g. Esto se da especialmente cuando el sustrato lácteo utilizado para producir el yogur o la leche fermentada tiene un contenido en MS convencional, es decir, un contenido en MS de 10 a 20 %, por ejemplo, de 11-13 %.

De forma especialmente destacable, según una realización de la solicitud o de la invención, la tasa de supervivencia de la población total de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* contenidas en un polvo de la solicitud o de la invención es de al menos 75 %, más generalmente de al menos 85 %, tras 6 meses de almacenamiento del polvo a una temperatura de 20 °C. Esto se da especialmente cuando el sustrato lácteo utilizado para producir el yogur o la leche fermentada del cual procede el polvo es un sustrato lácteo con un contenido en MS convencional (10-20 %).

20 El término significativo se entiende en la presente memoria en su sentido estadístico, y como la medida entendida en la industria láctea.

El término “significativo” arriba empleado tiene su significado habitual en el ámbito de la estadística (por ejemplo, test t, test z, valor de chi cuadrado, cociente F, etc.), es decir, para comparar un valor medido con otro, y para determinar si dichos valores medidos difieren entre sí. El término “significativamente” cubre por consiguiente el hecho de que el experto en la técnica tiene en cuenta la desviación estándar (si la hay), que mide la dispersión de los datos en una distribución de frecuencia. El valor p deseado se sitúa en un nivel alfa de 5 %, o a un nivel alfa más riguroso de 1 %.

Según entiende el solicitante, los polvos de la técnica anterior no tienen propiedades de almacenamiento tan buenas (ver Ejemplos 12 y 13).

El experto en la técnica conoce modos de medir los niveles de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* contenidos en forma viva o viable en el polvo. Comprenden en particular el método oficial FIL 117B: 1997, Yogur: conteo de microorganismos característicos, técnica de conteo para colonias a 37 °C. El polvo, o según el caso, el relleno a analizar se puede preparar para el conteo como se describe más adelante en el Ejemplo 5.

Dichas cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* se pueden escoger entre las conocidas por el experto en la técnica como capaces de llevar a cabo la fermentación láctica sobre un sustrato láctico, para producir una leche fermentada o un yogur.

40 Un ejemplo de cepa de *S. thermophilus* es la cepa disponible en C.N.C.M. con el número de depósito I-2130 (fecha de depósito en la C.N.C.M. = 24 de febrero de 1999; empresa depositante = Gervais-Danone company).

Un ejemplo de cepa de *L. bulgaricus* es la cepa disponible en C.N.C.M. con el número de depósito I-1519 (fecha de solicitud en la C.N.C.M. = viernes, 30 de diciembre de 1994; empresa depositante = Gervais-Danone company).

Preferiblemente, al menos una cepa de *S. thermophilus* y/o al menos una cepa de *L. bulgaricus* se seleccionan de modo que tengan la capacidad de propagarse en sustratos lácteos de modo que produzcan fermentos de inoculación con una densidad elevada y, de forma más específica, fermentos cuya población de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* es:
 - superior a o igual a $3 \cdot 10^{10}$ ufc/g para *S. thermophilus*, superior a o igual a $1 \cdot 10^9$ ufc/g para *L. bulgaricus*, para fermentos en forma congelada, o
 - superior a o igual a $1 \cdot 10^{11}$ ufc/g para *S. thermophilus*, superior a o igual a $4 \cdot 10^9$ ufc/g para *L. bulgaricus*, para fermentos en forma liofilizada.

Las poblaciones de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* se pueden preparar y/o envasar por separado, o mezclar. Pueden estar contenidas en gránulos distintos, o en un solo gránulo que proporciona ambos tipos de poblaciones.

De forma ventajosa, y a diferencia de lo que se hace de forma habitual para fabricar una leche fermentada o un yogur, se escogerá preferiblemente al menos una cepa de *S. thermophilus* que produzca poco o nada de exopolisacáridos EPS (una cepa quebradiza).

Preferiblemente, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* es por lo tanto una cepa quebradiza, que no produce exopolisacáridos (EPS), o que solo los produce a niveles tan bajos que un medio basado en leche, después de cultivar esta cepa a una temperatura de 40 °C hasta que se alcanza un pH de 4,7, presenta una viscosidad de Casson de 4 °C que es inferior a o igual a 500 mPa.s, preferentemente inferior a o igual a 400 mPa.s.

65

Un medio basado en leche adecuado para dicha medición de la viscosidad puede ser simplemente leche, o un medio modelo para leche fermentada, tal como, por ejemplo, un medio compuesto de 120 gramos de polvo de leche desnatada, 1 gramo de péptido N3 (Vitalarmor 950, Armor proteins), y agua desionizada QSP 1 L. El Ejemplo 6 presenta un ejemplo detallado de este protocolo. Se pueden utilizar dosis de inoculación clásicas de *S. thermophilus* (por ejemplo, cultivo a 1 % en volumen), por ejemplo, las presentadas en el Ejemplo 6.

Un ejemplo de dicha cepa de *S. thermophilus* (*S. thermophilus* quebradiza) es la cepa de *S. thermophilus* que se puede consultar en la C.N.C.M. con el número de depósito I-2130.

Para seleccionar una cepa de fermento láctico que no produce o produce pocos exopolisacáridos (EPS), se puede utilizar cualquier método conocido por el experto en la técnica. Un procedimiento metodológico adecuado comprende la medición de la viscosidad de la leche fermentada obtenida por fermentación de un sustrato lácteo utilizando la cepa o cepas candidatas, como, por ejemplo, un yogur producido utilizando la cepa o cepas candidatas.

Un método permite la determinación de si la cepa o cepas utilizadas para la fermentación de la leche proporcionan una leche fermentada con una textura filamentososa (alta viscosidad), si son texturizadas (viscosidad promedio), o si proporcionan una leche fermentada con una textura quebradiza (baja viscosidad).

En el ámbito de la solicitud o de la invención, y a diferencia de lo que se hace en el ámbito de la fabricación de leche fermentada y yogur no previstos para ser pulverizados, las cepas lácticas preferidas son las que proporcionan una leche fermentada con textura quebradiza (baja viscosidad).

El método de medición de la viscosidad de una leche fermentada comprende el uso de un viscosímetro refrigerado equipado con un sistema que permite aplicar un gradiente de cizalla creciente y decreciente a la leche fermentada, tal como el viscosímetro refrigerado Mettler RM® 260 equipado con un sistema coaxial DIN 145. Este sistema rotatorio permite la observación de la pérdida de estructura del producto en función de un gradiente de cizalla lineal, o un esfuerzo a un gradiente dado.

De forma resumida, este método comprende:

- el cultivo de la cepa o cepas lácticas candidatas sobre un medio de cultivo adecuado, que de un medio basado en leche (leche, medio modelo para leche fermentada; ver el Ejemplo 6), después de cultivar esta cepa a una temperatura de 40 °C hasta que se alcanza un pH de 4,7, presenta una viscosidad de Casson a 4 °C que es inferior a o igual a 500 mPa.s, preferentemente inferior a o igual a 400 mPa.s, [si se desea, se pueden preparar varios lotes de leches fermentadas en condiciones idénticas para tener varias muestras comparables],
- si la leche o leches fermentadas modelo obtenidas son productos de granja, dichas leches fermentadas se agitan preferentemente de forma manual utilizando una espátula durante un minuto,
- la incubación a 4 °C durante 30 min del medio o medios fermentados, o de al menos una muestra tomada de este medio o medios fermentados,
- las mediciones de viscosidad se hacen a 4 °C, utilizando un viscosímetro Mettler RM® 260 refrigerado equipado con un sistema coaxial DIN 145.

Un medio basado en leche adecuado para dicha medición de la viscosidad puede ser simplemente leche, o un medio modelo para leche fermentada, tal como, por ejemplo, un medio compuesto de 120 gramos de polvo de leche desnatada, 1 gramo de péptido N3 (Vitalarmor 950, Armor proteins), y agua desionizada QSP 1 L. El Ejemplo 6 presenta un ejemplo detallado de este protocolo. Se pueden utilizar dosis de inoculación clásicas de *S. thermophilus* (por ejemplo, cultivo a 1 % en volumen), por ejemplo, las presentadas en el Ejemplo 6.

El producto es sometido a un gradiente de cizalla creciente de 0 a 20 s⁻¹ durante un minuto. Esta fase corresponde a la rampa creciente. A continuación se somete a un gradiente de cizalla decreciente de 20 a 0 s⁻¹ durante 1 minuto, correspondiente a la rampa decreciente. Los resultados se obtienen en forma de una curva de flujo continuo, con una rampa creciente y una rampa decreciente entre 0 y 20 s⁻¹.

La Figura 1 presenta tres tipos principales de curvas de flujo:

- el tipo de curva obtenido utilizando cepa de *S. thermophilus* 001 010 corresponde a una cepa que proporciona una leche fermentada con textura filamentososa (alta viscosidad, curva superior),
- el tipo de curva obtenido utilizando cepa de *S. thermophilus* 001 098 corresponde a una cepa que es el tipo texturizante (viscosidad promedio, curva central),
- el tipo de curva obtenida utilizando cepa *S. thermophilus* TS 10B (compañía DSM Food specialties Dairy Ingredients; BP 1; 2600 MA Delft; NETHERLANDS) corresponde a la cepa que proporciona una leche fermentada con una textura quebradiza (baja viscosidad, curva inferior).

La tangente en cualquier punto de la curva de flujo en la rampa decreciente representa la viscosidad aparente del medio fermentado. Esta viscosidad aparente varía en función del gradiente de cizalla considerado y es, por lo tanto, preferible para ajustar la curva mediante un modelo matemático. El experto en la técnica conoce diversos modelos matemáticos adecuados. El modelo Casson es un ejemplo de modelo adecuado.

La viscosidad de la leche fermentada (η) se deduce a partir de la pendiente de la curva de regresión de la parte decreciente (gradiente de cizalla decreciente) de la curva de flujo obtenida, modificada para representar la raíz cuadrada del esfuerzo en función de la raíz cuadrada del gradiente de cizalla.

5 Debido a la heterogeneidad de algunas leches fermentadas (el caso, especialmente, de productos cerrados, que deben ser agitados manualmente), y del diseño de algunos viscosímetros, a veces es necesario retirar algunos de los puntos de medición periféricos antes de aplicar el modelo matemático, por ejemplo, puntos periféricos que se pueden obtener durante algún cambio en el vástago previsto para aumentar la velocidad de cizallamiento.

10 A veces es necesario retirar una parte de la curva de aumento correspondiente al régimen de flujo laminar transitorio del producto en la separación de aire. El ajuste se realiza por lo tanto sobre la curva decreciente, donde los efectos introducidos debidos a las propiedades tixotrópicas del producto y a la entrada del régimen de flujo son menos importantes.

15 El modelo Casson se formula mediante la siguiente ecuación (Ecuación 1):

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + \sqrt{\eta \times D} \quad (1)$$

τ : Esfuerzo (Pa)

20 τ_0 : Umbral de flujo del producto (Pa)

η : Viscosidad del producto (Pa.s)

D : Gradiente de cizalla (s⁻¹)

25 Esta modelización va seguida de la representación de una pendiente de regresión lineal sobre la parte creciente de la curva; lo que muestra dos parámetros importantes:

- el umbral de flujo del producto τ_0 , correspondiente al lugar de intersección de la línea con el eje Y,
- la viscosidad de Casson η del producto, correspondiente a la pendiente de la línea de regresión.

30 La Figura 2 ilustra la determinación del umbral de flujo τ_0 y de la viscosidad η de una leche fermentada utilizando la cepa 001 098, sobre la curva de flujo decreciente modelizada mediante el método de Casson.

Por encima de 500 mPa.s, se considera que la viscosidad de Casson de la leche fermentada es media o alta, es decir, que la cepa o cepas sometidas a ensayo son del tipo claramente texturizante, o dan una textura filamentosa.

35 Cuando la viscosidad de Casson medida es inferior o igual a 500 mPa.s, se considera que la viscosidad de Casson es baja, es decir, que la cepa o cepas sometidas a ensayo dan una textura quebradiza. Preferiblemente, se escogerán las cepas cuya viscosidad de Casson de 4 °C es inferior o igual a 400 mPa.s.

40 En la técnica anterior, para producir un yogur de calidad alimentaria real, se seleccionan preferiblemente cepas de *S. thermophilus* texturizantes (muy productoras de EPS), para obtener un yogur que tiene una textura y sabor satisfactorios para el consumidor.

La presencia de cepas de *S. thermophilus* quebradizas será generalmente también necesaria, en la medida en que las pautas de seguridad alimentaria recomiendan producir la acidificación del sustrato lácteo tan rápido como sea posible.

45 Por lo tanto, la obtención de un yogur de calidad alimentaria real pasa por escoger una combinación adecuada de cepas de *S. thermophilus* quebradizas y cepas de *S. thermophilus* texturizantes, tanto en términos de textura como de sabor, y en aras de la seguridad alimentaria.

50 En la solicitud o en la invención, por el contrario, se seleccionarán preferiblemente cepas de *S. thermophilus* quebradizas, evitando el uso de cepas texturizantes.

Además, según la solicitud o la invención, no es necesario producir un producto acabado de calidad (producto en polvo), para usar una combinación de cepas de *S. thermophilus*; en cambio, es posible limitar el número de cepas de *S. thermophilus* diferentes (una, dos o tres cepas de *S. thermophilus*), y el número de cepas de *L. bulgaricus* (una, dos o tres cepas de *L. bulgaricus*). Por tanto, el método según la solicitud o la invención produce un polvo de alta calidad utilizando solamente una sola cepa de *S. thermophilus* (y, por supuesto, al menos, una cepa de *L. bulgaricus*). Esta cepa de *S. thermophilus* es preferiblemente quebradiza. Según la solicitud o la invención (método de producción de un yogur o leche fermentada, método de producción de un polvo, fermentos, sustrato lácteo cultivado, leche fermentada o yogur obtenido, polvo de leche fermentada o de yogur obtenido, productos alimenticios, tales como rellenos, galletas, productos de confitería), se puede utilizar una sola cepa de *S. thermophilus*, que es preferiblemente una cepa quebradiza, y preferiblemente se utiliza una sola cepa de *L. bulgaricus*.

60

El polvo según la solicitud o la invención puede presentar cualquier tamaño de partículas adecuado para su fin previsto. Se escoge preferiblemente una distribución de tamaño de partículas de entre 10 y 300 micrómetros para una aplicación en las industrias láctea o de la repostería o de la confitería.

5 La solicitud o la invención se refiere también a productos iniciales, productos intermedios y productos finales que se pueden utilizar u obtener implementando un método según la solicitud o la invención.

10 Cada una de las características indicadas en la solicitud descrita del método según la solicitud se puede aplicar, modificando lo que corresponda, a los materiales de partida, los productos intermedios, y los productos acabados de la invención.

Cada una de las características indicadas para describir el método según la invención se puede aplicar, modificando lo que corresponda, a los materiales de partida, los productos intermedios, y los productos acabados de la invención.

15 Un material de partida que se puede utilizar en un método según la solicitud consiste en uno o más fermentos lácticos concentrados. El fermento o fermentos concentrados pueden proporcionar fácilmente las dosis significativas de inóculo que requiere el método de la solicitud.

20 Los fermentos concentrados según la solicitud comprenden al menos una cepa de *S. thermophilus*, y/o al menos una cepa de *L. bulgaricus*.

Los fermentos concentrados según la solicitud pueden ser en forma de concentrados congelados, por ejemplo, en forma de gránulos congelados, y/o en forma de concentrados liofilizados.

25 Los concentrados congelados según la solicitud comprenden al menos una cepa de *S. thermophilus* (viva o viable) a una concentración de al menos $3 \cdot 10^{10}$ ufc/g, y/o al menos una cepa de *L. bulgaricus* (viva o viable) a una concentración de al menos $1 \cdot 10^9$ ufc/g.

30 Los concentrados liofilizados según la solicitud comprenden al menos una cepa de *S. thermophilus* (viva o viable) a una concentración de al menos $1 \cdot 10^{11}$ ufc/g, y/o al menos una cepa de *L. bulgaricus* (viva o viable) a una concentración de al menos $4 \cdot 10^9$ ufc/g.

35 Los fermentos concentrados según la solicitud se obtienen mediante inoculación masiva de un sustrato que es un medio de cultivo (previsto para la propagación celular). En el Ejemplo 2 se describe una realización de concentrados congelados (en forma de gránulos).

40 Este medio de cultivo generalmente comprende leche y/o componentes de leche, pero generalmente comprenderá también uno o más agentes o sustancias previstas para reforzar y/o estimular el crecimiento en la cepa o cepas inoculadas.

Por lo tanto, en un medio de cultivo previsto para la producción de fermentos concentrados según la solicitud, se encontrará generalmente lo siguiente: extracto de levadura y/o levaduras lisadas, y/o sulfato de manganeso, y/o sulfato de magnesio, y/o peptonas.

45 Un medio de cultivo previsto para la producción de fermentos concentrados según la solicitud puede comprender uno o más tensioactivos y/o emulsionantes y/o agentes solubilizantes y/o detergentes, tales como polioxietileno-sorbitán-20-monooleato (también conocido con el nombre polisorbato 80, o Tween® 80).

50 Un medio de cultivo previsto para la producción de fermentos concentrados según la solicitud puede comprender compuestos que no son de origen lácteo como, por ejemplo, extractos cárnicos.

55 Preferiblemente, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* contenida en un fermento concentrado de la solicitud es una cepa de *S. thermophilus* quebradiza que no produce exopolisacáridos (EPS), o que solo los produce a niveles tan bajos que un medio basado en leche (leche, o medio modelo para leche fermentada; ver el Ejemplo 6), después de cultivar esta cepa a una temperatura de 40 °C hasta que se alcanza un pH de 4,7, presenta una viscosidad de Casson de 4 °C que es inferior a o igual a 500 mPa.s, preferentemente inferior a o igual a 400 mPa.s.

60 Un medio basado en leche adecuado para dicha medición de la viscosidad puede ser simplemente leche, o un medio modelo para leche fermentada, tal como, por ejemplo, un medio compuesto de 120 gramos de polvo de leche desnatada, 1 gramo de péptido N3 (Vitalarmor 950, Armor proteins), y agua desionizada QSP 1 L. El Ejemplo 6 presenta un ejemplo detallado de este protocolo. Se pueden utilizar dosis de inoculación clásicas de *S. thermophilus* (por ejemplo, cultivo a 1 % en volumen), por ejemplo, las presentadas en el Ejemplo 6.

65 De forma ventajosa, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* es la cepa de *S. thermophilus* que se puede consultar en la C.N.C.M. con el número de depósito I-2130.

Se puede utilizar cualquier cepa de *L. bulgaricus* que el experto en la técnica considere adecuada. Por ejemplo, la cepa que puede consultarse en la CNCM con el número de depósito I-1519.

La solicitud de patente también se refiere al sustrato lácteo cultivado que se puede obtener como un producto intermedio durante la implementación del método del yogur o de la leche fermentada según la solicitud y/o durante la implementación del método de producción de un polvo según la solicitud. La invención se refiere a un sustrato lácteo cultivado por al menos una cepa de *S. thermophilus* a una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g, y por al menos una cepa de *L. bulgaricus* a una concentración de al menos $1 \cdot 10^6$ ufc/g, para poder producir mediante fermentación láctica un producto que satisface la designación de leche fermentada o de yogur, previsto para la alimentación humana, en el que dicho sustrato lácteo cultivado presenta un contenido en materia seca de 25 a 60 %, preferentemente de 28 a 55 %, más preferentemente de 38 a 45 %.

Recuérdese que el término “sustrato diario” se entiende, en la solicitud y en la invención, como leche en el sentido entendido en la industria láctea, es decir, leche de origen animal en todas sus formas y en todas sus variantes de composición. Un sustrato lácteo conforme a la solicitud o la invención está compuesto por lo tanto esencialmente de leche, para poder producir mediante fermentación láctica un producto que satisface la designación de leche fermentada o yogur, previsto para la alimentación humana. El término “sustrato lácteo” no incluye el significado de “medio de cultivo”.

El yogur o la leche fermentada que se puede obtener como un producto acabado del método de producción de un yogur o leche fermentada según la solicitud, y/o como un producto intermedio del método de preparación de polvo según la solicitud, es también un objeto descrito en la solicitud de patente. Esta leche fermentada o yogur se puede producir mediante fermentación láctica del sustrato cultivado objeto de la solicitud.

Más especialmente, la solicitud de patente se refiere a un sustrato lácteo cultivado con al menos una cepa de *S. thermophilus* a una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g, y por al menos una cepa de *L. bulgaricus* a una concentración de al menos $1 \cdot 10^6$ ufc/g. Naturalmente, todos los contenidos en *S. thermophilus* y/o *L. bulgaricus* descritos en la solicitud en el ámbito de la descripción del método según la solicitud son de aplicación al producto intermedio, un sustrato lácteo cultivado, como producto; y todas las combinaciones de contenidos están comprendidas en el ámbito de la solicitud.

Preferentemente, el sustrato lácteo comprende dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* a una concentración de al menos $1 \cdot 10^9$ ufc/g.

Preferiblemente, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* contenida en un sustrato lácteo cultivado de la solicitud o de la invención es una cepa de *S. thermophilus* quebradiza que no produce exopolisacáridos (EPS), o que solo los produce a niveles tan bajos que un medio basado en leche (leche, o un medio modelo para leche fermentada; ver el Ejemplo 6), después de cultivar esta cepa a una temperatura de 40 °C hasta que se alcanza un pH de 4,7, presenta una viscosidad de Casson de 4 °C que es inferior a o igual a 500 mPa.s, preferentemente inferior a o igual a 400 mPa.s.

Un medio basado en leche adecuado para dicha medición de la viscosidad puede ser simplemente leche, o un medio modelo para leche fermentada, como, por ejemplo, un medio compuesto de 120 gramos de polvo de leche desnatada, 1 gramo de péptido N3 (Vitalarmor 950, Armor proteins), y agua desionizada QSP 1 L. El Ejemplo 6 presenta un ejemplo detallado de este protocolo. Se pueden utilizar dosis de inoculación clásicas de *S. thermophilus* (por ejemplo, cultivo a 1 % en volumen), por ejemplo, las presentadas en el Ejemplo 6.

De forma ventajosa, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* es la cepa de *S. thermophilus* que se puede consultar en la C.N.C.M. con el número de depósito I-2130.

Se puede utilizar cualquier cepa de *L. bulgaricus* que el experto en la técnica considere adecuada. Por ejemplo, la cepa que se puede consultar en CNCM con el número de depósito I-1519.

Según una realización específica de la solicitud o de la invención, dicho sustrato lácteo cultivado de la solicitud o de la invención es un sustrato lácteo cultivado que presenta un alto contenido en MS como se ha descrito anteriormente (ver también el Ejemplo 8), es decir, un sustrato lácteo cultivado que presenta un contenido en MS del orden de 25 a 60 %, como se ha descrito anteriormente.

De forma ventajosa, un sustrato lácteo cultivado de la solicitud o de la invención tiene una composición tal que, tras la fermentación láctica con al menos una cepa de *S. thermophilus* y al menos una cepa de *L. bulgaricus*, el sustrato lácteo cultivado da lugar a un producto lácteo que satisface la designación de yogur o leche fermentada.

Otro producto que se puede obtener durante la implementación de un método según la solicitud o la invención es una leche fermentada o yogur que se obtiene por fermentación láctica del sustrato lácteo cultivado.

Presenta en general las mismas características que el sustrato cultivado en términos de contenido y naturaleza de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*.

- 5 Naturalmente, la leche fermentada o el yogur que se puede obtener durante la implementación del método según la solicitud o la invención presenta un contenido en *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* ligeramente superior a los del sustrato lácteo cultivado del que proceden; y, una vez que se produce la coagulación de la caseína durante la fermentación láctica simbiótica, se transformará en un gel, como sucede con el yogur clásico. La excepcional concentración de fermento láctico observada en la fermentación final no se habría podido obtener con los niveles de cultivo clásicos utilizados para el yogur de la técnica anterior.
- 10 Más especialmente, una leche fermentada o yogur que se puede obtener como producto intermedio durante la implementación de un método de obtención de un polvo según la solicitud o la invención (producto final del método de obtención de un yogur o leche fermentada según la solicitud o la invención) comprende al menos una cepa de *S. thermophilus* a una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g, y al menos una cepa de *L. bulgaricus* a una concentración de al menos $1 \cdot 10^7$ ufc/g. Naturalmente, todos los contenidos de *S. thermophilus* y/o *L. bulgaricus* y combinaciones de contenidos descritas en la solicitud en el ámbito de la descripción del método según la solicitud son de aplicación al producto intermedio, leche fermentada o yogur, como producto. Preferentemente, la leche fermentada o yogur comprende dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* a una concentración de al menos $1 \cdot 10^9$ ufc/g.
- 15 La invención se refiere a una leche fermentada o yogur que contiene al menos una cepa de *S. thermophilus* a una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g, en forma viva o viable, y al menos una cepa de *L. bulgaricus* a una concentración de al menos $1 \cdot 10^7$ ufc/g, en forma viva o viable, y en la que al menos una cepa de *L. bulgaricus* está contenida con una relación de 1 ufc por 40 a 60 ufc de dicha cepa de *S. thermophilus*.
- 20 La invención también se refiere a una leche fermentada o yogur que contiene al menos una cepa de *S. thermophilus* a una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g, en forma viva o viable, y al menos una cepa de *L. bulgaricus* a una concentración de al menos $1 \cdot 10^7$ ufc/g, en forma viva o viable, en la que dicho sustrato lácteo cultivado o, cuando corresponda, dicha leche fermentada o yogur, presenta un contenido en materia seca de 25 a 60 %, preferentemente de 28 a 55 %, más preferentemente de 38 a 45 %.
- 25 Preferiblemente, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* contenida en una leche fermentada o yogur que se puede obtener como producto intermedio del método de obtención de un polvo según la solicitud o la invención es una cepa de *S. thermophilus* quebradiza que no produce exopolisacáridos (EPS), o que solo los produce a niveles tan bajos que un medio basado en leche (leche, o un medio modelo para leche fermentada; ver el Ejemplo 6), después de cultivar esta cepa a una temperatura de 40 °C hasta que se alcanza un pH de 4,7, presenta una viscosidad de Casson de 4 °C que es inferior a o igual a 500 mPa.s, preferentemente inferior a o igual a 400 mPa.s.
- 30 Un medio basado en leche adecuado para dicha medición de la viscosidad puede ser simplemente leche, o un medio modelo para leche fermentada, tal como, por ejemplo, un medio compuesto de 120 gramos de polvo de leche desnatada, 1 gramo de péptido N3 (Vitalarmor 950, Armor proteins), y agua desionizada QSP 1 L. El Ejemplo 6 presenta un ejemplo detallado de este protocolo. Se pueden utilizar dosis de inoculación clásicas de *S. thermophilus* (por ejemplo, cultivo a 1 % en volumen), por ejemplo, las presentadas en el Ejemplo 6.
- 35 De forma ventajosa, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* es la cepa de *S. thermophilus* que se puede consultar en la C.N.C.M. con el número de depósito I-2130.
- 40 Se puede utilizar cualquier cepa de *L. bulgaricus* que el experto en la técnica considere adecuada. Por ejemplo, la cepa que se puede consultar en CNCM con el número de depósito I-1519.
- 45 De forma ventajosa, un sustrato lácteo cultivado o una leche fermentada o yogur según la solicitud o la invención comprende una sola cepa de *S. thermophilus*, que es preferiblemente quebradiza, y una sola cepa de *L. bulgaricus*.
- 50 Según una realización específica de la solicitud o de la invención, dicho yogur o leche fermentada es un yogur o leche fermentada que presenta un alto contenido en MS como se ha descrito anteriormente (ver también el Ejemplo 8), es decir, un yogur o leche fermentada que presenta un contenido en MS del orden de 25 a 60 %, como se ha descrito anteriormente.
- 55 Debido al cultivo masivo recomendado por la solicitud o la invención, el yogur o leches fermentadas de la solicitud o de la invención presentan una relación *L. bulgaricus*/*S. Thermophilus* que es más favorable para *L. bulgaricus* que la observada utilizando dosis de inoculación inferiores como sucede en la técnica anterior.
- 60 Un yogur o leche fermentada de la solicitud o de la invención difiere por lo tanto de un yogur clásico al menos en el valor de la relación *L. bulgaricus*/*S. thermophilus*.
- 65 Según otra realización específica, un yogur o leche fermentada de la solicitud de la invención contiene dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* en una relación de 1 ufc por 40 a 60 ufc de dicha al menos una cepa de *S. thermophilus*, preferentemente en una relación de 1 ufc por 45 a 55 ufc de dicha cepa de *S. thermophilus*, más preferentemente en una relación de 1 ufc por 47 a 53 ufc de dicha cepa de *S. thermophilus*, muy preferentemente

en una relación de 1 ufc por 48 a 52 ufc de dicha cepa de *S. thermophilus*, con máxima preferencia en una relación de 1 ufc por 48 a 51 ufc de dicha cepa de *S. thermophilus*.

5 Esto se da especialmente cuando partimos de dosis de inoculación de *L. bulgaricus* (LB) y de *S. thermophilus* (ST) en una proporción de como máximo 1 LB por cada 50 ST, de forma ventajosa como máximo 1 LB por cada 100 ST, preferentemente como máximo 1 LB por cada 500 ST, muy preferentemente 1 LB por cada 100-300 ST, con máxima preferencia 1 LB por aproximadamente 200 ST.

10 En comparación, partiendo de la misma relación de inoculación ST/LB, un yogur clásico de la técnica anterior (obtenido con dosis de inoculación inferiores a las prescritas por la solicitud o la invención) presenta una relación de aproximadamente 1 ufc de *L. bulgaricus* por cada 100 ufc de *S. thermophilus*.

15 Como se ilustra en el Ejemplo 10, un yogur o leche fermentada de la solicitud o de la invención presenta determinadas características metabólicas, especialmente un contenido en foliato, superiores a las de un yogur clásico.

Según una realización específica de la solicitud o de la invención, dicho yogur o leche fermentada presenta tanto un alto contenido en MS como una relación de LB/ST alta, como se ha descrito anteriormente.

20 Un producto acabado obtenido según la solicitud o la invención es el polvo de leche fermentada o de yogur.

Preferiblemente, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* está contenida en el polvo según la solicitud o la invención en forma viva o viable con un contenido de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g, preferentemente de al menos $1 \cdot 10^9$ ufc/g, más preferentemente de al menos $2 \cdot 10^9$ ufc/g, muy preferentemente de al menos $3 \cdot 10^9$ ufc/g.

25 Preferiblemente, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* está contenida en el polvo según la solicitud o la invención en forma viva o viable a un contenido de entre $1 \cdot 10^9$ ufc/g, y $1 \cdot 10^{10}$ ufc/g (incluidos los límites).

30 Preferiblemente, dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* está contenida en el polvo según la solicitud o la invención en forma viva o viable a un contenido de al menos $1 \cdot 10^4$ ufc/g, preferentemente de al menos $2 \cdot 10^4$ ufc/g, preferentemente de al menos $3 \cdot 10^4$ ufc/g, más preferentemente de al menos $4 \cdot 10^4$ ufc/g, muy preferentemente de al menos $8 \cdot 10^4$ ufc/g, muy preferentemente de al menos $1 \cdot 10^5$ ufc/g, aún más preferentemente al menos $3 \cdot 10^5$ ufc/g.

35 Preferiblemente, dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* está contenida en el polvo según la solicitud o la invención en forma viva o viable con un contenido de entre $1 \cdot 10^4$, y $1 \cdot 10^5$ ufc/g.

Todas las combinaciones del contenido en *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* están incluidas en el contenido de la solicitud de patente.

40 Más especialmente, un polvo de leche según la solicitud o la invención comprende de forma ventajosa al menos una cepa de *S. thermophilus* en forma viva o viable a una concentración de al menos $5 \cdot 10^8$ ufc/g, preferentemente de al menos $1 \cdot 10^9$ ufc/g, y al menos una cepa de *L. bulgaricus* en forma viva o viable a una concentración de al menos $1 \cdot 10^4$ ufc/g.

45 Esta alta concentración de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* se obtiene sin que haya sido necesario enriquecer el yogur o la leche fermentada a pulverizar. De hecho, el método de la solicitud o la invención propone la producción de un yogur o leche fermentada que ya está altamente concentrado en *S. thermophilus* y en *L. bulgaricus*.

El polvo conforme a la solicitud o la invención presenta la ventaja de que satisface la designación de yogur o leche fermentada:

- 50 - contiene mucho más que el nivel legalmente mínimo o contenido en fermento láctico viable (este contenido legalmente mínimo es de $1 \cdot 10^7$ ufc/g), y
- resulta de la simbiosis entre *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* (ver el Ejemplo 3).

55 Además de la ventaja de constituir en sí mismo una fuente especialmente rica de *L. thermophilus* y *L. bulgaricus* vivos, el polvo según la solicitud o la invención tiene la ventaja de presentar propiedades de almacenamiento especialmente destacadas.

En el polvo según la solicitud o la invención, no se observa ninguna reducción sustancial de la población de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* en forma viva o viable tras 4 meses de almacenamiento a 5 °C o a 20 °C.

60 Un polvo según la solicitud o la invención no experimenta pérdidas detectables de *S. thermophilus* en forma viva o viable con respecto a la leche fermentada o yogur de la que procede, después de almacenarlo durante 4 meses, incluso más, a una temperatura de 20 °C.

65 De forma ventajosa, tras 4 meses a 20 °C, los polvos de la solicitud o de la invención son al menos $2 \cdot 10^8$ ufc/g de la población total de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* en forma viva o viable. Más generalmente, esta población total es de al menos $3,5 \cdot 10^8$ ufc/g, muy frecuentemente al menos $4 \cdot 10^8$ ufc/g. Esto se da especialmente cuando el

sustrato lácteo utilizado para producir el yogur o la leche fermentada tiene un contenido en MS convencional, es decir, un contenido en MS de 10 a 20 %, por ejemplo, de 11-13 %.

5 De un modo especialmente destacable, según una realización de la solicitud o de la invención, la tasa de supervivencia de la población total de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* contenida en un polvo de la solicitud o de la invención es de al menos 80 % tras 4 meses de almacenamiento del polvo a una temperatura de 20 °C.

Esto se da especialmente cuando el sustrato lácteo utilizado para producir el yogur o la leche fermentada tiene un contenido en MS convencional, es decir, un contenido en MS de 10 a 20 %, por ejemplo, de 11-13 %.

10 De forma muy ventajosa, tras 6 meses a 20 °C, los polvos de la solicitud o de la invención comprenden más de $1,0 \cdot 10^7$ ufc/g de la población total de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* en forma viva o viable, más generalmente al menos $5 \cdot 10^7$ ufc/g. Frecuentemente, esta población total es de al menos $1,10^8$ ufc/g, muy frecuentemente al menos $4 \cdot 10^8$ ufc/g. Esto se da especialmente cuando el sustrato lácteo utilizado para producir el yogur o la leche fermentada tiene un contenido en MS convencional, es decir, un contenido en MS de 10 a 20 %, por ejemplo, de 11-13 %.

20 De forma especialmente destacable, según una realización de la solicitud o de la invención, la tasa de supervivencia de la población total de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* contenidas en un polvo de la solicitud o de la invención es de al menos 75 %, más generalmente de al menos 85 %, tras 6 meses de almacenamiento del polvo a una temperatura de 20 °C. Esto se da especialmente cuando el sustrato lácteo utilizado para producir el yogur o la leche fermentada del cual procede el polvo es un sustrato lácteo con un contenido en MS convencional (10-20 %).

25 En comparación, los polvos comerciales sometidos a ensayo por los inventores presentan, en las mismas condiciones experimentales, una disminución de población detectable en un intervalo de meses. A modo de ejemplo, la tasa de supervivencia de polvos comerciales es de entre 47 % (Dr Süwelack M/A 5.4 Active) y 74 % (EPI PY 48) tras 1 mes a 20 °C.

30 Estas propiedades y ventajas inesperadas del polvo según la solicitud o la invención quedan ilustradas más adelante en los Ejemplos 12 y 13.

35 Cuando el polvo según la solicitud o la invención se mantiene a 5 °C o a 20 °C durante 6 meses, su contenido en *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* vivo o viable (contenido total) no es inferior al contenido legalmente mínimo de $1 \cdot 10^7$ ufc/g. De hecho, en un polvo según la solicitud o la invención, el contenido en *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* vivo o viable (contenido total) no puede descender por debajo de $5 \cdot 10^8$ ufc/g tras 6 meses de almacenamiento a 20 °C.

El polvo según la solicitud o la invención presenta características microbiológicas tales que el propio polvo satisface la designación de yogur o leche fermentada.

40 Preferiblemente, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* contenida en el polvo de la solicitud o de la invención es una cepa de *S. thermophilus* quebradiza que no produce exopolisacáridos (EPS), o que solo los produce a niveles tan bajos que un medio basado en leche (leche, o un medio modelo para leche fermentada; ver el Ejemplo 6), después de cultivar esta cepa a una temperatura de 40 °C hasta que se alcanza un pH de 4,7, presenta una viscosidad de Casson de 4 °C que es inferior a o igual a 500 mPa.s, preferentemente inferior a o igual a 400 mPa.s.

45 Un medio basado en leche adecuado para dicha medición de la viscosidad puede ser simplemente leche, o un medio modelo para leche fermentada, tal como, por ejemplo, un medio compuesto de 120 gramos de polvo de leche desnatada, 1 gramo de péptido N3 (Vitalarmor 950, Armor proteins), y agua desionizada QSP 1 L. El Ejemplo 6 presenta un ejemplo detallado de este protocolo. Se pueden utilizar dosis de inoculación clásicas de *S. thermophilus* (por ejemplo, cultivo a 1 % en volumen), por ejemplo, las presentadas en el Ejemplo 6.

50 De forma ventajosa, dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* es la cepa de *S. thermophilus* que se puede consultar en la C.N.C.M. con el número de depósito I-2130.

55 Se puede utilizar cualquier cepa de *L. bulgaricus* que el experto en la técnica considere adecuada. Por ejemplo, la cepa que se puede consultar en CNCM con el número de depósito I-1519.

Como se indica en la sección de los métodos según la solicitud o la invención, el número de cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* comprendido en el polvo según la solicitud o la invención puede limitarse, si se desea, a un valor mínimo.

60 Un polvo según la solicitud o la invención puede comprender una sola cepa de *S. thermophilus*, que es preferiblemente quebradiza, y una sola cepa de *L. bulgaricus*.

65 De forma ventajosa, el polvo de leche fermentada o de yogur según la solicitud o la invención presenta una A_w (actividad de agua) a temperatura ambiente (temperatura de aproximadamente 20-26 °C, por ejemplo de aproximadamente 25 °C), que es inferior o igual a 0,3, preferentemente inferior o igual a 0,25, muy preferentemente inferior a 0,25, de forma ventajosa inferior o igual a 0,2. Preferiblemente, esta A_w será superior o igual a 0,05,

preferentemente superior o igual a 0,09. Según una realización preferida de la solicitud o de la invención, esta Aw será de 0,05-0,25, preferentemente de 0,05-0,20, muy preferentemente de 0,09-0,19, por ejemplo, de 0,10-0,19.

5 La Aw de un polvo según la solicitud o la invención o de un alimento que comprende un polvo según la solicitud o la invención, tal como un relleno según la solicitud o la invención, se puede medir utilizando un higrómetro de punto de rocío, tal como un higrómetro de la marca Aqualab® comercializado por la compañía DECAGON DEVICES, Pullman, Washington, EE. UU.

10 Un objeto descrito en la solicitud o parte de la invención es también cualquier composición o producto que contenga al menos un polvo según la solicitud o la invención, respectivamente.

Un objeto descrito en la solicitud o parte de la invención es más especialmente cualquier producto alimenticio que contenga al menos un polvo según la solicitud o la invención, respectivamente.

15 El polvo de yogur obtenido según la solicitud o la invención se puede incorporar fácilmente en una formulación de relleno anhidra.

20 Como producto alimenticio, la solicitud y la invención tienen por objeto más especialmente un relleno alimenticio que contiene al menos un polvo según la solicitud o la invención, respectivamente.

Los inventores han descubierto que cuando se dispersa el polvo según la solicitud o la invención y/o se incorpora en un relleno alimenticio graso y esencialmente anhidro, la tasa de supervivencia de las cepas de fermento láctico presentes no difiere significativamente de la observada cuando el polvo se mantiene solo (polvo puro, fuera de cualquier mezcla).

25 El relleno alimenticio de la solicitud o de la invención es por lo tanto preferentemente un relleno esencialmente anhidro.

Se entiende que relleno esencialmente anhidro significa una suspensión concentrada de polvos y partículas sólidas en una fase continua compuesta de sustancias grasas cristalizadas en grados diversos. El término "relleno" cubre en particular los diferentes tipos de chocolate (negro, blanco y con leche) y recubrimientos.

30 Un ejemplo ventajoso de un relleno esencialmente anhidro es un relleno graso. Un relleno graso y esencialmente anhidro está constituido por polvos hidrófilos dispersados en una fase continua compuesta de una mezcla de grasas cristalizadas en grados diversos. La cantidad de agua en un relleno anhidro es solamente la asociada con los polvos hidrófilos utilizados. Dicho contenido es inferior a aproximadamente 2-3 %, pero no es cero; de ahí la expresión relleno graso y esencialmente anhidro.

35 Un relleno conforme a la solicitud o la invención puede estar contenido en y/o sobre un producto alimenticio, por ejemplo una galleta, un producto de confitería.

40 La textura de un relleno depende:

- 1) del estado físico de la fase continua (sustancias grasas fundidas o cristalizadas),
 - 2) de la fracción en volumen ocupada por las partículas,
 - 3) de la distribución de tamaño de partículas y
 - 4) de la presencia opcional de emulsionantes, moléculas de tensioactivo que lubrican las interacciones
- 45 entre las partículas sólidas.

50 Cuando el contenido de grasa es superior a 40 % y el tamaño de partículas de los polvos es apreciablemente superior a un micrómetro, predomina el primer factor. El estado físico de la fase continua es función de la naturaleza de las sustancias grasas (y, en particular, su contenido en triglicéridos saturados) y de la temperatura. Por tanto, es posible formular un relleno presentado en forma de un líquido fluido a 40 °C y un sólido duro y quebradizo a 20 °C.

Este cambio de estado del relleno ocasionado por la temperatura produce una gran diversidad en las aplicaciones, que se pueden describir en 3 categorías generales:

- 55 1. Aplicación de "sándwich", es decir, en forma de una capa depositada entre dos bases de cereal en sentido amplio, tales como:
 - 1.1. Galletas secas, que pueden ser redondas como "Príncipe" de Lu, de tipo rectangular como "Petit Écolier" de Lu o incluso cuadradas
 - 1.2. Barquillos, en cuyo caso se superponen varias capas finas de relleno y de base de cereal para obtener el
- 60 producto final.

Una formulación típica para este tipo de aplicación es la siguiente:

Tabla 1:

Ingrediente	% utilizado en el relleno (%peso)
Grasa vegetal (copra hidrogenada 32)	43,9 %
Dextrosa	7,2 %
Azúcar en polvo	37,2 %
Lactosuero suave	1,5 %
Polvo de yogur según la solicitud o la invención	10,2 %
TOTAL	100 %

5 Las grasas vegetales son una mezcla de grasa de palma, copra hidrogenada y grasa de palma hidrogenada en proporciones que varían entre 0 y 100 %.

Un método típico es el siguiente:

10 El relleno se prepara dispersando en un mezclador Hobbart polvos de sustancias grasas parcialmente cristalizadas a una temperatura de aproximadamente 30 °C. Un tiempo de mezclado de 5 minutos a alta velocidad es suficiente para producir una mezcla homogénea con una consistencia relativamente fluida. Este relleno se transporta a continuación utilizando tuberías termoselladas a un dosificador colector. Un volumen dado de relleno se deposita sobre la superficie de una galleta, a continuación se coloca una segunda galleta en la superficie del relleno. El sándwich pasa entonces a través de un túnel de refrigeración en donde se refrigera a aproximadamente 1 °C/min hasta que la temperatura es del orden de 18 °C: el sándwich está entonces suficientemente unido y cohesionado para ser envasado.

2. Aplicación en forma de capa uniforme a la superficie de un producto de cereal:

20 2.1. el relleno puede depositarse, por ejemplo, en el centro del producto de cereal, que puede adoptar la forma de una tartaleta redonda como “Mini Rollos” de Lu, o una galleta cuadrada como “Milk Break” de Lu, o una genovesa como “Barquette” de Lu. Como en el caso anterior, se obtiene un depósito central de relleno, pero más visible.

25 2.2. De forma alternativa, al producto de cereal se le puede “dar un fondo”, es decir, cubrir su superficie interior con una capa de relleno, mediante un método de inmersión en estado líquido seguido de refrigeración para conseguir la fijación a la capa de relleno.

30 2.3. Otra posible aplicación consiste en recubrir por completo el producto de cereal con una capa de relleno. La capa uniforme se obtiene haciendo pasar el producto de cereal bajo una “cortina” de relleno líquido que cubre la parte superior y las caras del producto con una capa de relleno, asegurándose el recubrimiento de la cara inferior “dando fondo” como se describe en 2.2.

35 2.4. La capa uniforme de relleno puede ser también moldeada: el relleno líquido se deposita en un molde, se enfría a continuación para obtener una envoltura sólida, que se puede combinar entonces con una barra de cereales, lo que permite la producción de un producto con un estado de superficie excelente (liso) y hace posible marcar la superficie.

La fórmula de relleno dada en la aplicación 1 es adecuada para estas aplicaciones. Otra posible fórmula se da a continuación en la Tabla 2. En este segundo ejemplo de una formulación de relleno, el polvo de relleno se añade directamente a un recubrimiento comercial (“Blanche” referencia G-PR3040-105 de Barry-Callebaut).

40 Tabla 2:

INGREDIENTE	% utilizado en el relleno (%peso)
Grasa vegetal	30 %
Azúcar en polvo	40 %
Polvo de yogur según la solicitud o la invención	30 %
TOTAL	100 %

3. Aplicación en forma de “decoración” sobre una superficie o en la masa del producto:

45 El relleno se puede depositar en forma de líneas o aristas sobre la superficie del producto. La tecnología de depósito es muy similar a la del caso 2.3, con la excepción de que el depósito de “laminado” o “cola de pez” que genera una cortina continua es sustituido por boquillas que producen hebras de relleno.

50 Las diferentes aplicaciones de relleno y, de forma más general, galletas, productos de confitería, del polvo según la solicitud o la invención tienen en particular los siguientes puntos en común:

• Preferiblemente, el polvo se dispersa en un medio anhidro, cuyo contenido en agua es muy bajo (solamente agua añadida por los polvos). Las evaluaciones de viabilidad descritas en el Ejemplo 13 confirman que la supervivencia de los fermentos es comparable en un medio de este tipo al observado para el polvo inicial.

• Preferiblemente, el relleno se combina con un producto de cereales tras el cocinado. El aumento de temperatura al que se someten los fermentos no supera una temperatura del orden de 35 °C a 40 °C durante una duración del orden de unas pocas horas, como mucho. Se comprobó la buena estabilidad térmica de los polvos de la solicitud o de la invención tras más de dos semanas (es decir, 340 h) a 35 °C. El impacto del método de incorporación del polvo en el relleno en la viabilidad de los fermentos es por lo tanto insignificante.

• Preferiblemente, el relleno se combina con un producto de cereales con baja humedad residual, tal como galletas secas, barquillos o copos/partículas de cereales. Los intercambios de agua entre el relleno anhidro y el producto de cereales son por lo tanto limitados, lo que garantiza una buena supervivencia del fermento.

• Puesto que los polvos son ricos en fermentos, la galleta o el producto de confitería obtenida al final tiene un “equivalente en yogur” (en términos de flora láctica) de entre 1 y 10:

- por ejemplo, el producto acabado puede contener 35 % de relleno a una concentración de 10 % de polvo de yogur, es decir, 3,5 % de polvo de yogur con $3 \cdot 10^9$ fermentos, lo que supone 10^8 fermentos/g. Para un producto acabado de 15 g, esto supone $1,5 \cdot 10^9$ fermentos, es decir, el equivalente de la cantidad de fermentos contenida en un yogur (= $1,25 \cdot 10^9$ fermentos).

- por ejemplo, el producto acabado puede contener 67 % de relleno a una concentración de 30 % de polvo de yogur, es decir, $6 \cdot 10^8$ fermentos. Para una barra de 22 g, el mismo cálculo da 10 “equivalentes de yogur”, es decir, 10 veces la cantidad de fermentos contenida en un yogur clásico.

La solicitud y la invención se refieren más especialmente a una galleta que comprende al menos un polvo según la solicitud o la invención, respectivamente, y/o al menos un relleno según la solicitud o la invención, respectivamente.

En la solicitud y en la invención se entiende por galleta los productos de la cocción de cereales que comprenden una pasta obtenida a partir de una mezcla que comprende en proporciones variables una o más harinas de cereales o legumbres, o fracciones de cereales o legumbres, de la grasa y uno o más azúcares, en donde estos últimos pueden no obstante estar presentes en cantidades insignificantes o nulas para algunas variedades de productos, tales como las “galletas saladas” o *rusk*s.

La invención se refiere también al uso del polvo según la solicitud o la invención para la preparación de un producto alimenticio, preferentemente un relleno alimenticio, o una galleta que comprende dicho polvo en un relleno.

El polvo según la solicitud o la invención se puede utilizar también en la producción de un producto de confitería. La solicitud y la invención se refieren por lo tanto a un polvo según la solicitud o la invención, respectivamente, y/o al menos un relleno según la solicitud o la invención, respectivamente.

En la solicitud y la invención, todo el contenido en fermentos lácticos que se da es contenido de dichos fermentos lácticos en forma viva o viable.

En la solicitud y en la invención, el término “que comprende”, del que es sinónimo “incluido(s)” o “que contiene”, es un término abierto, y no excluye la presencia de uno o más elementos, ingredientes o etapas adicionales del método, que no se indicarían de forma explícita, mientras que el término “que consiste” o “constituido” es un término cerrado, que excluye la presencia de cualquier otro elemento, etapa, o ingrediente adicional que no se podría exponer de forma explícita. El término “que consiste esencialmente” o “esencialmente constituido” es un término parcialmente abierto que no excluye la presencia de uno o más elementos, ingredientes o etapas adicionales, en la medida en que dichos elementos, ingredientes o etapas adicionales no afectan de forma sustancial a las propiedades de base de la invención.

Por consiguiente, el término “que comprende” (o “comprende(n)”) incluye los términos “que consiste”, “constituido”, así como los términos “que consiste esencialmente” y “constituido esencialmente”.

En la solicitud y en la invención, “CNCM” y “C.N.C.M.” es la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos; Institut Pasteur; 25 rue du Docteur Roux; F-75724 PARIS Cedex 15; Francia.

Ejemplos

En los ejemplos siguientes, “ST” significa *Streptococcus thermophilus*, y “LB” significa *Lactococcus bulgaricus*.

Ejemplo 1: producción de un polvo de yogur conforme a la invención

1. Preparación del sustrato lácteo para la obtención de la masa de yogur o leche fermentada con una alta concentración celular:

Se prepara un sustrato lácteo cuya fermentación permitirá la obtención de la masa de yogur o leche fermentada deseada.

Por ejemplo, para obtener un yogur, se puede preparar una mezcla láctea (= sustrato lácteo) del siguiente modo:

- incorporación de polvo de leche desnatada en leche con 0 % en grasa para obtener un extracto seco de 20 % (por ejemplo, para una leche desnatada con un extracto seco a 8,8 %, incorporar 12,8 % del polvo con un extracto seco a 96,2 %);
- dejar mezclar para rehidratar durante 30 minutos a 4 °C con agitación suave;
- 5 - pasteurizar la mezcla a 95 °C y mantener durante 10 minutos;
- enfriar la masa a 38 °C.

2. Preparar el fermento necesario para la obtención de la masa de yogur o leche fermentada, con una alta concentración en fermento:

10 Para preparar un producto que satisfaga la designación de yogur, es necesario seleccionar al menos una cepa de ST, y al menos una cepa de LB, como fermentos lácticos.

15 Preferiblemente, se selecciona entonces al menos una cepa de ST y al menos una cepa de LB que tengan la capacidad de propagarse en sustratos lácteos de modo que produzcan uno o más fermentos de inoculación con una densidad elevada y, de forma más específica, fermentos cuya población de ST y LB sea:

- superior a o igual a $3 \cdot 10^{10}$ ufc/g para *S. thermophilus*, superior a o igual a $1 \cdot 10^9$ ufc/g para *L. bulgaricus*, para fermentos en forma congelada, o
- 20 - superior a o igual a $1 \cdot 10^{11}$ ufc/g para *S. thermophilus*, superior a o igual a $4 \cdot 10^9$ ufc/g para *L. bulgaricus*, para fermentos en forma liofilizada.

25 Para preparar la masa de yogur o leche fermentada que, según la invención, está prevista para pulverizar, las células que preferiblemente no producen o producen pocos exopolisacáridos (EPS) se seleccionan de las cepas de fermentos lácticos adecuadas para la producción del yogur deseado o leche fermentada.

Un criterio de selección complementario o alternativo puede consistir en seleccionar al menos una cepa de ST y/o al menos una cepa de LB que no produzca o apenas produzca exopolisacáridos (EPS). Este criterio de baja producción de EPS corresponde más especialmente a las cepas de ST.

30 Ejemplos de cepas de ST y LB adecuadas comprenden, por ejemplo:

- para ST, la cepa que se puede consultar en CNCM con el número de depósito I-2130,
- para LB, la cepa que se puede consultar en CNCM con el número de depósito I-1519.

35 Si es necesario y/o si se desea, la cepa o cepas de fermentos lácticos seleccionadas se reavivan volviendo a sembrar un medio de cultivo.

40 Para la producción industrial, la cepa o cepas lácticas seleccionadas se envasan entonces preferiblemente en forma de fermento liofilizado, o en forma de fermento congelado (por ejemplo, siguiendo el protocolo de preparación de gránulos congelados descrito en el Ejemplo 2).

45 Para seleccionar una cepa o fermento láctico que no produzca o apenas produzca exopolisacáridos (EPS), un procedimiento metodológico adecuado comprende la medición de la viscosidad de la leche fermentada obtenida por fermentación de un sustrato lácteo utilizando la cepa o cepas candidatas, como, por ejemplo, un yogur producido utilizando la cepa o cepas candidatas.

El método de medición de la viscosidad para la industria láctea permite determinar si la cepa o cepas utilizadas para la fermentación de la leche proporcionan una leche fermentada con una textura filamentosa (alta viscosidad), si son texturizadas (viscosidad promedio), o si proporcionan una leche fermentada con una textura quebradiza (baja viscosidad).

50 El método de medición de la viscosidad de una leche fermentada comprende el uso de un viscosímetro refrigerado equipado con un sistema que permite aplicar un gradiente de cizalla creciente y decreciente a la leche fermentada, tal como el viscosímetro refrigerado Mettler RM® 260 equipado con un sistema coaxial DIN 145. Este sistema rotatorio permite la observación de la pérdida de estructura del producto en función de un gradiente de cizalla lineal, o un esfuerzo a un gradiente dado.

55 De forma resumida, este método comprende:

- cultivar la cepa o cepas lácticas candidatas a una temperatura de 40 °C hasta que se alcanza un pH de 4,7 sobre un medio de cultivo adecuado como, por ejemplo, el medio modelo para leche fermentada compuesta de 120 gramos de polvo de leche desnatada, 1 gramo de péptido N3 (Vitalarmor 950, Armor proteins), y agua desionizada QSP 1 L, [si se desea, se pueden producir varios lotes de leches fermentadas en idénticas condiciones para obtener varias copias comparables], [se pueden utilizar dosis de inoculación clásicas de *S. thermophilus* (por ejemplo, cultivo a 1 % en volumen)], como las presentadas en el Ejemplo 6],
- si la leche o leches fermentadas modelo obtenidas son productos de granja, dichas leches fermentadas se agitan preferiblemente de forma manual utilizando una espátula durante un minuto,
- 65 - la incubación a 4 °C durante 30 min del medio o medios fermentados, o de al menos una muestra tomada de este medio o medios fermentados,

- las mediciones de viscosidad se hacen a 4 °C, utilizando un viscosímetro Mettler RM® 260 refrigerado equipado con un sistema coaxial DIN 145.

5 El producto es sometido a un gradiente de cizalla creciente de 0 a 20 s⁻¹ durante un minuto. Esta fase corresponde a la rampa de aumento. A continuación se somete a un gradiente de cizalla decreciente de 20 a 0 s⁻¹ durante 1 minuto, correspondiente a la rampa decreciente. Los resultados se obtienen en forma de una curva de flujo continuo, con una rampa creciente y una rampa decreciente entre 0 y 20 s⁻¹.

La Figura 1 presenta tres tipos principales de curvas de flujo:

- 10 - el tipo de curva obtenido utilizando la cepa de *S. thermophilus* 001 010 corresponde a una cepa que proporciona una leche fermentada con textura filamentosa (alta viscosidad),
 - el tipo de curva obtenido utilizando cepa de *S. thermophilus* 001 098 corresponde a una cepa que es el tipo texturizante (viscosidad promedio),
 15 - el tipo de curva obtenida utilizando cepa *S. thermophilus* TS 10B (compañía DSM Food specialties Dairy Ingredients; BP 1; 2600 MA Delft; NETHERLANDS) corresponde a la cepa que proporciona una leche fermentada con una textura quebradiza (baja viscosidad).

Las mediciones obtenidas se ajustaron aplicando el modelo matemático de Casson, para obtener la viscosidad de Casson.

20 El modelo Casson se formula mediante la siguiente ecuación (Ecuación 1):

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + \sqrt{\eta \times D} \quad (1)$$

τ : Esfuerzo (Pa)

25 τ_0 : Umbral de flujo del producto (Pa)

η : Viscosidad del producto (Pa.s)

D : Gradiente de cizalla (s⁻¹)

30 Esta modelización va seguida de la representación de una pendiente de regresión lineal sobre la parte creciente de la curva; lo que muestra dos parámetros importantes:

- el umbral de flujo del producto τ_0 , correspondiente al lugar de intersección de la línea con el eje Y,
 - la η del producto, correspondiente a la pendiente de la línea de regresión.

35 La Figura 2 ilustra la determinación del umbral de flujo τ_0 y de la viscosidad η de una leche fermentada utilizando la cepa 001 098, sobre la curva de flujo decreciente modelizada mediante la viscosidad de Casson.

3. Producción de la masa de yogur con una alta concentración en fermento:

40 La masa de yogur o de leche fermentada se fabrica inoculando el sustrato preparado en 1., utilizando la cepa o cepas de fermentos lácticos seleccionada(s) en 2., y se lleva a cabo a partir de la fermentación láctica.

Por ejemplo, para producir una masa de yogur:

- cultivar la mezcla desarrollada en 1. con 20 g/l de fermentos concentrados preparados en 2. siguiendo la
 45 composición siguiente: 95 % de concentrados congelados que presentan una población de ST de al menos $3 \cdot 10^{10}$ ufc/g, más 5 % de concentrado de LB de al menos $1 \cdot 10^9$ ufc/g;
 - fermentar a 38 °C durante un intervalo de 3 a 4 h para que la fermentación cese a un valor de pH = 4,8 +0,5/-0,3 unidades de pH (en el caso de un yogur), por ejemplo pH = 4,8 +0,4/-0,3, por ejemplo pH = 4,8 +/- 0,3 unidades de pH, por ejemplo pH 4,8 +/- 0,2 unidades de pH, preferentemente pH +0,5/-0,1, (para una leche fermentada, pH = 4,6 +/- 0,2, generalmente);
 50 - parar la fermentación enfriando y alisando sobre una plataforma como SR10;
 - almacenar la masa a 4 °C durante 10 días.

4. Producción del polvo de leche fermentada o de yogur:

- 55 La masa de yogur o la leche fermentada obtenida en el punto 3. anterior se seca en condiciones suaves, para:
 - lograr una A_w (medida a temperatura ambiente, es decir a una temperatura de entre aproximadamente 20 y 26 °C, por ejemplo, de aproximadamente 25 °C) inferior o igual a 0.3, preferentemente inferior o igual a 0,25, muy preferentemente inferior a 0,25, de forma ventajosa inferior o igual a 0,2. Preferiblemente, esta A_w será superior o igual a 0,05, preferentemente superior o igual a 0,09. Según una realización preferida de la invención, esta A_w será
 60 de 0,05-0,25, preferentemente de 0,05-0,20, muy preferentemente de 0,09-0,19, por ejemplo, de 0,10-0,19,
 - manteniendo la máxima cantidad de células ST y LB vivas o viables (es decir, para limitar la pérdida de células vivas o viables tanto como sea posible).

Las mediciones de *Aw* (“*actividad de agua*”) se hacen según las prácticas del experto en la técnica de los productos alimenticios. La *Aw* se puede medir, por ejemplo, utilizando un higrómetro de punto de rocío, tal como el higrómetro Aqualab®, comercializado por DECAGON DEVICES, Pullman, Washington, EE. UU.

5 Se añade una muestra de unos pocos gramos de polvo (o, si resulta adecuado, de relleno que comprende un polvo según la invención) a una placa de mediciones. La placa se coloca a continuación en una cámara de mediciones dotada de un termostato. Se analiza la humedad del aire sobre el polvo (o, si es aplicable, el relleno) en unos pocos minutos, y se compara automáticamente con la humedad sobre agua pura a la temperatura de medición. La relación de las dos humedades relativas, llamada actividad de agua (*Aw*), es indicada entonces por el dispositivo tras los pocos minutos necesarios para que el sistema se equilibre.

Los ejemplos de métodos de deshidratación suave adecuados comprenden deshidratación por liofilización, tratamiento sobre un lecho fluidizado, y deshidratación mediante atomización suave, por ejemplo, atomización con una temperatura de salida inferior o igual a 100 °C, preferiblemente inferior o igual a 80 °C, más preferentemente inferior o igual a 60 °C.

En el Ejemplo 3 se describe un ejemplo de un método de deshidratación mediante atomización suave.

El método de deshidratación utilizado no debe aportar al polvo productos que no se puedan utilizar en alimento para humanos, y/o que no se puedan usar para una designación de yogur. La lista de dichos productos no deseables puede variar dependiendo de la legislación de los países correspondientes. En el caso de un polvo previsto para el consumo en Francia o en España con la designación de yogur, el método no debe aportar maltodextrinas al polvo obtenido.

Se obtiene un polvo según la invención que tiene un contenido muy alto en fermentos lácticos vivos o viables y, más especialmente, en el caso de la masa de yogur descrita, un contenido muy alto en ST y LB vivos o viables y que no está contaminado por gérmenes no deseables en alimentos para humanos. El propio polvo obtenido según la invención a partir de una masa de yogur satisface la designación de yogur.

El polvo resultante presenta una excelente capacidad de almacenamiento durante varios meses a temperatura ambiente sin pérdida significativa de fermentos lácticos vivos o viables, o al menos sin pérdida significativa en ST y LB vivos o viables.

Más especialmente, el polvo según la invención presenta la capacidad excepcional de poder ser almacenado durante varios meses a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), sin que su contenido en LB y/o ST vivo o viable disminuya por debajo del umbral de ST+LB mínimo requerido por la designación de yogur, es decir, sin que la población de ST+LB viva o viable sea inferior a $10 \cdot 10^7$ ufc/g.

A 35 °C, se observa una disminución lenta y progresiva en la flora láctica a lo largo del tiempo: al cabo de 2 semanas a esta temperatura, las tasas de supervivencia son de entre 25 % y 60 % en el caso de *S. thermophilus*, es decir, al final de este almacenamiento se obtienen entre $1,5 \cdot 10^8$ ufc/g y $1,5 \cdot 10^9$ ufc/g, lo que sigue siendo elevado. La tasa de supervivencia es inferior en el caso de *L. bulgaricus*, del orden de 2 a 5 %, dando lugar a contenidos de $2 \cdot 10^2$ ufc/g y $2 \cdot 10^3$ ufc/g. Se observa también que la tasa de mortalidad a 35 °C de la flora total de los polvos de la invención es generalmente equivalente a la de polvos de la técnica anterior a 5 °C o 20 °C, condiciones de almacenamiento consideradas ideales por el experto en la técnica.

El polvo producido presenta un tamaño de partículas adecuado para su fin (reconstitución de yogur que satisface la designación de yogur, uso como ingrediente para producir un relleno alimenticio o, de forma más general, para producir un producto alimenticio). Puede, por ejemplo, presentar un tamaño de partículas de 10 a 500 micrómetros, preferiblemente de entre 10 y 300 micrómetros.

Ejemplo 2: producción de concentrados congelados con alta densidad en fermentos lácticos (ST y/o LB cada uno al menos a $5 \cdot 10^{10}$ ufc/g)

1. Preparar el inóculo:

- seleccionar al menos una cepa de LB y/o al menos una cepa de ST que no produce o produce bajas cantidades de EPS, por ejemplo, la cepa C.N.C.M. ST I-2130 y/o la cepa LB I-1519,
- Revitalizar la cepa o las cepas seleccionadas mediante tres subcultivos sucesivos sobre un medio de cultivo adecuado para fermentos lácticos, por ejemplo leche más extracto de levadura (polvo de leche desnatada de 90 a 140 g más extracto de levadura en polvo de 0,5 a 3 g QSP 1 kg con agua destilada, esterilización a 121 °C durante 15 minutos):
- Cultivo a 1 %, incubación a 40 °C para la cepa o cepas de ST, a 44 °C para la cepa o cepas de LB,
- Parar el subcultivo enfriando (4 °C) tras la solidificación (gelificación de la leche);
- Sembrar utilizando el último subcultivo (1 %), 200 ml de M17 (caldo comercializado por Biokar Diagnostics, referencia BK 0888HA) a 40 °C (para ST), 200 ml de MRS (caldo comercializado por Serlabo, referencia BD-288130 (0881-17)) a 44 °C (para LB);
- Observar la densidad óptica en un espectrofotómetro a 660 nanómetros;

- Parar el crecimiento bacteriano del inóculo con frío (4 °C) una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial (aproximadamente de 4 h a 4,5 h en buenas condiciones).

2. Preparar el fermentador (Ejemplo: BIOSTAT ED):

5

Escoger la concentración de la base de regulación

- ST: solución de NaOH 6 N,
- LB: solución de NaOH 2 N,

10 Esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 minutos:

- sistema para alimentar en una base e inoculación,
- solución de base,
- rotor de centrífuga y tazón,
- conexiones del fermentador a la centrífuga,

15 - conexiones para recuperar el sobrenadante estéril en un matraz,
- conexión de la botella de concentrado estéril a nitrógeno (tubos + aguja).

Calibrar la sonda de pH;

20 Esterilizar el fermentador:

- llenarlo con agua ultrapura,
- programar en un ciclo de esterilización *in situ* (121 °C, 20 minutos).

3. Preparar el medio de cultivo:

25

- Utilizar agua destilada,
- Pesar los diferentes compuestos del medio (ver los recipientes, más adelante),
- Hidratación durante 30 min con agitación,
- Esterilización en autoclave (121 °C durante 15 minutos),

30 - Enfriamiento a 4 °C: 40 °C (ST), 44 °C (LB),
- transferencia aséptica del medio de cultivo al fermentador.

Medio de propagación de ST

- Agua destilada
- Fracción permeada de ultrafiltración 50 g/l
- Extracto de levadura 10 g/l
- Sulfato de manganeso 0,1 g/l
- Polvo de leche desnatada 10 g/l
- pH inicial 6,5

Medio de propagación de LB

- Agua destilada
- Fracción permeada de ultrafiltración 50 g/l
- Extracto de levadura 15 g/l
- Sulfato de manganeso 0,1 g/l
- Tween 80
- pH inicial 6,5

4. Comenzar propagación:

35

- cultivar el fermentador con inóculo a 100 ml para 6 litros
- aplicar el programa del fermentador que regula la temperatura y regula el pH mediante soluciones de hidróxido sódico, agitar el medio de cultivo, registrar el pH, la temperatura y el volumen del hidróxido sódico suministrado.

5. Parar la propagación:

40

Los datos del volumen de hidróxido sódico suministrado durante la fermentación para regular el pH se procesan para obtener una curva del volumen de hidróxido sódico total consumido en función del tiempo, para producir a continuación una curva de velocidad de consumo de hidróxido sódico en función del tiempo. El punto máximo de esta última curva corresponde al momento en el que se debe parar la propagación enfriando el producto fermentado.

45

6. Centrifugación en frío (ejemplo: Rotor de flujo continuo 8575):

50

- Hacer pasar el producto fermentado a través de una bomba peristáltica, y alimentar al tazón de la centrífuga,
- velocidad: 13.000 rpm (ST), 10.000 rpm (LB),
- recuperar parte del sobrenadante en un matraz estéril,
- tras la centrifugación, diluir el residuo obtenido con el sobrenadante, hasta que se pueda pipetear, transferirlo a una botella estéril, previamente enfriada (trabajar en una campana de flujo laminar, mantener el concentrado a temperaturas inferiores a 10 °C),

55

7. Congelar (trabajar en una campana de flujo laminar, manejo aséptico, mantener el concentrado a temperaturas inferiores a 10 °C):

- conectar la botella de residuo diluido a una bomba peristáltica utilizando un tubo flexible con una sección transversal pequeña cuyo otro extremo está conectado a un sistema que conecta varias agujas de jeringa,
- llenar un baño isotérmico con nitrógeno líquido bajo las agujas,
- iniciar la bomba peristáltica y regular el caudal para producir un goteo regular del producto concentrado en el nitrógeno líquido,
- recuperar y envasar los gránulos de forma estéril y almacenarlos a continuación a -80 °C;

7. Análisis de los gránulos concentrados congelados:

Después de haber fundido los gránulos rápidamente, llevar a cabo un conteo (ST o LB: Método FIL117A:1988).

Un gránulo de *S. thermophilus* y/o *L. bulgaricus* congelado presenta una población superior o igual a $3 \cdot 10^{10}$ ufc/g para ST, con $1 \cdot 10^9$ ufc/g para LB, respectivamente.

Ejemplo 3: ejemplo de método de deshidratación profunda pero suave

La Figura 3 presenta un dibujo de un dispositivo de atomización suave adecuado para obtener un polvo conforme a la invención.

Mediante una bomba 1 de alta presión se transfiere el producto concentrado a las boquillas de atomización. Puesto que el diámetro por el que pasan es pequeño, generan la pulverización del producto en una nube de gotículas finas. También se aporta aire caliente (cuya temperatura será preferiblemente de entre 190 y 210 °C) a la parte superior de la cámara 2 de deshidratación. El producto y el aire caen de ese modo en la misma corriente en el sistema y la principal transferencia de aire del producto al agua se produce durante este paso. Para esas temperaturas del aire, la temperatura del producto preferiblemente no superará 80 °C durante la deshidratación. Debido a la forma de la cámara de deshidratación, el aire asciende de nuevo por las paredes, arrastrando partículas de producto de diámetro pequeño, llamadas *finos*. El aire resultante cargado en el agua y los finos se extraen a la parte superior de la cámara (su temperatura es entonces de entre 80 y 90 °C), atraviesa entonces una serie de ciclones 3 que, debido a su tamaño y forma, separan el aire y los finos. El aire resultante sin finos se extrae y es enviado al exterior mediante un ventilador. Un filtro final garantiza a menudo la purificación final del aire para limitar en la medida de lo posible los materiales orgánicos enviados al medio ambiente.

Los finos se recuperan y se reincorporan al producto 4, ya sea en la cámara de deshidratación, en la parte superior de la cámara, o en la parte exterior del lecho vibratorio. Esta elección de nivel de reinyección vendrá guiada por el tamaño de partículas deseado por el productor.

En el fondo de la cámara de deshidratación, los gránulos alcanzan el aire 5 a una temperatura promedio (de entre 60 y 80 °C) que garantiza dos funciones: la constitución de un lecho fluidizado y la deshidratación continua. Los gránulos, a la temperatura del aire en el lecho fluidizado, se extraen de la cámara y se alimentan a un lecho 6 vibratorio externo, lo que completa la deshidratación y enfriamiento del polvo (a una temperatura de aproximadamente 30 °C) antes de su envasado.

Generalmente, se coloca un tamiz 7 a la salida de este lecho vibratorio para recoger los pequeños bloques formados durante la deshidratación. El producto puede almacenarse y envasarse entonces ahí.

Ejemplo 4: comparación de las cinéticas de fermentación obtenidas mediante cultivo masivo conforme a la invención, con los obtenidos con dosis de inoculación más bajas

Se inocula una mezcla láctea con una cepa de ST (cepa CNCM 1-2130) y una cepa de LB (CNCM I-1519) conforme a la invención, como se describe en el punto 1. del Ejemplo 1.

Las cepas de ST y LB se cultivan en forma de gránulos congelados preparados como se describe en el Ejemplo 2. Cada gránulo congelado contiene al menos $3 \cdot 10^{10}$ ufc/g de ST, y/o, al menos, $1 \cdot 10^9$ ufc/g de LB.

Los gránulos congelados de ST y LB se añaden a la mezcla láctea, para aportar $2,7 \cdot 10^9$ ufc/g de ST y $1,4 \cdot 10^7$ ufc/g de LB.

Estas dosis de cultivo son de 10 a 1000 veces superiores a las que se utilizarían de forma convencional durante la fabricación tradicional de un yogur o leche fermentada (de 0,01 g/l a 1 g/l).

De forma paralela, se obtuvo yogur en las mismas condiciones, pero utilizando dosis de inoculación de ST y LB inferiores a las prescritas por la invención (ver el Ejemplo 4 y la Figura 4), es decir, una dosis de inoculación de ST de $1 \cdot 10^7$ ufc/g y una dosis de inoculación de LB de $5 \cdot 10^4$ ufc/g. Se llevó a cabo la fermentación de este sustrato lácteo cultivado a dosis inferiores a las de la invención hasta la obtención de un yogur que presenta contenidos en

ST y LB en forma viva de $5 \cdot 10^8$ ufc/g en el caso de ST y de $5 \cdot 10^6$ ufc/g en el caso de LB. Dichos contenidos en ST y LB corresponden al límite superior que se puede obtener siguiendo el método de la técnica anterior.

Estos yogures se denominan en la presente memoria “yogur de referencia”.

Se mide el pH a lo largo del tiempo.

La Figura 4 presenta la cinética de acidificación obtenida (curva inferior: inoculación conforme a la invención, que da lugar a un yogur conforme a la invención; curva superior: inoculación a dosis inferiores a las prescritas por la invención).

Con la inoculación de dosis conformes a la invención, se produce la acidificación de la leche en un período más corto que el observado con la inoculación de dosis inferiores, pero la cinética de acidificación de la invención sí que corresponde a la cinética de producción para yogur o leches fermentadas tradicionales (cinética de la simbiosis ST+LB).

En el ámbito de la invención, el crecimiento de fermentos lácticos es inferior al que se observaría en el ámbito de un método de obtención de yogur o leche fermentada tradicional, pero la población de fermento láctico final es mucho mayor.

La población inoculada en el ámbito de la invención es incluso superior a la población que se puede obtener al final de la fermentación durante la producción de un yogur o leche fermentada obtenida a partir de la inoculación de ST y LB a dosis inferiores a las prescritas por la invención.

En el ámbito de la invención, se observa que al comienzo de la fermentación, la fase de latencia se reduce de forma considerable, con respecto a la fermentación obtenida con dosis de inoculación inferiores, pero que las dos cinéticas de acidificación convergen al final de la fermentación (flechas verticales a pH 4,75 = momento en el que se para la fermentación mediante enfriamiento).

Al final de la fermentación, las dos biomasas aparecen en la fase estacionaria de crecimiento, la fase en la que se producen los metabolitos secundarios (ver Ejemplo 10).

Ejemplo 5: ejemplo de preparación de muestra para el conteo microbiológico (% de ST y LB vivos o viables).

El polvo según la invención o, cuando resulte adecuado, el relleno según la invención, se puede preparar del siguiente modo, para usar el método de conteo de cepas lácticas presentes.

Este método se ha desarrollado para optimizar la técnica de rehidratación de polvos de yogur teniendo en cuenta un conteo de fermentos lácticos presentes.

También es posible utilizar este método para aplicarlo a los rellenos grasos.

Principio

Rehidratación de un polvo de yogur en sus gránulos o forma de polvo fino para reforzar la homogeneización, tiempo de contacto con el diluyente, la temperatura de incubación, para asegurar condiciones óptimas para rehidratar el polvo sin que cambie la población de fermentos lácticos inicial contenida en el polvo de yogur.

Reactivos

Diluyente

Se usa la sal Triptona para hacer diluciones.

Equipo

- Bolsa estéril Stomacher® con pinzas de cierre
- Soporte de pesado
- Balanza de precisión de 0,01 g
- Cuchara estéril
- Stomacher® u homogeneizador
- Baño de agua con termostato y agitación
- Pipeta estéril de 1 ml

Procedimiento

Pesar la muestra

Utilizar una bolsa Stomacher® estéril sobre un soporte de pesado y una balanza de precisión de 0,01 g.

Pesar aproximadamente 5 gramos de polvo, anotar la cantidad exacta.

Añadir 45 gramos de diluyente de sal Triptona, anotar la cantidad exacta.

5

Cerrar la bolsa Stomacher con pinzas.

Homogeneización preliminar

10 Homogeneizar la bolsa en la Stomacher durante 10 segundos.

Esta etapa suspende el polvo en el diluyente.

Incubación

15

Colocar las bolsas en un baño de agua con agitación y calentado a 37 °C, durante exactamente 30 minutos.

Esta etapa permite calentar ligeramente el polvo, que se disolverá de forma natural en el líquido.

20 Homogeneización

Homogeneizar la bolsa Stomacher® de nuevo durante 2 minutos.

Esta etapa rompe las últimas partículas que permanecen en suspensión y mezcla bien la dilución.

25

Se puede obtener una dilución 1/10 de la muestra.

Contar los fermentos lácticos del polvo de yogur rehidratado.

30 Aplicar la normativa oficial para el conteo de fermento láctico: FIL 117B: 1997, Yogur: Conteo de microorganismos característicos, Técnica de conteo de colonias a 37 °C

Expresión de resultados

35 Consultar la norma FIL 117B: 1997 (párrafo 9) para la expresión de los resultados.

Tener en cuenta la dilución inicial de la muestra en la bolsa Stomacher®.

Ejemplo 6: ejemplo de preparación de medio para la medición de la viscosidad (selección de cepas quebradizas)

40

Producción de leches fermentadas para mediciones de viscosidad:

1. Preparar la mezcla láctea:

45

- 120 g de polvo de leche desnatada
- 1 g de péptido N3 (Vitalarmor 950, Armor proteins) para 1 litro de mezcla
- 930 ml de agua desionizada

Dejar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente, el tiempo necesario para la rehidratación del polvo de leche.

50

Distribuir la mezcla en porciones de un litro en botellas, incubarlas a continuación en un baño de agua una vez que el agua esté hirviendo. Mantener durante 35 minutos, que es el tiempo necesario para que el núcleo de las botellas alcance 95 °C.

Fijar la temperatura a 95 °C y mantener durante 10 minutos, correspondiendo este tiempo a la pasteurización de la leche.

55

Enfriar las botellas, dejándolas en agua fría durante 30 minutos, colocarlas a continuación a 4 °C durante una noche.

2. Preparar el inóculo

60 Cepas de subcultivo TS10B (de la compañía DSM Food specialties Dairy ingredients; BP 1; 2600 MA Delft; NETHERLANDS) al menos 2 veces en leche esterilizada, seguido de extracto de levadura:

- Medio de subcultivo: 135 g de polvo de leche desnatada + 2 g extracto de levadura (BIOSPRINGER código 180) + 930 ml de agua desionizada, autoclave a 115 °C durante 20 min.
- Cultivo a 1 %
- 65 - Fermentación a 44 °C durante 3 horas

3. Fermentación

- Incubar las 4 botellas de un litro de mezcla a 43 °C durante 45 minutos.
- Cultivo:
- 5 - Distribuir los 4 litros de mezcla en dos botellas de 2 litros + 0,02 ml de formiato/L de mezcla
- Cultivar los 2 l de mezcla a 1 % (volumen/volumen) con el fermento (ver Ejemplo 2 para la preparación de fermentos concentrados)
- Homogeneizar bien
- Poner en frascos: 16 frascos por producto y colocarlos en un horno a 40 °C para la fermentación
- 10 · Parar la fermentación a pH 4,70 (utilizar 3 frascos si es necesario), y ponerlos a 4 °C durante una noche.
- Los frascos de leche fermentada se almacenan a 10 °C durante una semana.
- Se llevan a cabo mediciones de textura el octavo día (D8).

15 Ejemplo 7: un polvo según la invención presenta una tasa de supervivencia de fermentos lácticos tras el paso por un entorno similar al estómago humano, que es equivalente, incluso superior, al que presentaría un yogur.

20 Se obtuvo un polvo según la invención como se describe en el Ejemplo 1 (inoculación utilizando concentrados congelados obtenidos como se describe en el Ejemplo 2; método de deshidratación del Ejemplo 3). Este polvo contenía 5.10^9 ufc/g de ST CNCM I-2130 y 1.10^6 ufc/g de LB CNCM I-1519 en forma viva.

Este polvo de la invención se formuló también en forma de un relleno graso (composición del relleno como se describe en la Tabla 1 – ver sección de descripción –).

25 Este polvo de la invención se analizó en forma expuesta y en forma de un relleno graso.

Se obtuvo otro polvo según la invención como se describe en el Ejemplo 8 (sustrato lácteo con un contenido en MS alto como se describe en el Ejemplo 8 – contenido en MS de 30 % -; Inoculación utilizando concentrados congelados obtenidos como se describe en el Ejemplo 2; método de deshidratación del Ejemplo 9). Este otro polvo de la invención se formuló en forma de un relleno graso (composición del relleno como se describe en la Tabla 1 – ver sección de descripción –).

30 Este otro polvo de la invención se analizó solo en forma de relleno graso.

De forma paralela, se obtuvo yogur en las mismas condiciones que los yogures obtenidos para producir el polvo 1, pero utilizando dosis de inoculación de ST y LB inferiores a las prescritas por la invención (ver el Ejemplo 4 y la Figura 4), es decir, una dosis de inoculación de ST de 1.10^7 ufc/g y una dosis de inoculación de LB de 5.10^4 ufc/g.

40 Se llevó a cabo la fermentación de este sustrato lácteo cultivado a dosis inferiores a las de la invención hasta la obtención de un yogur que presenta contenidos en ST y LB en forma viva de 5.10^8 ufc/g en el caso de ST y de 5.10^6 ufc/g en el caso de LB. Dichos contenidos en ST y LB corresponden al límite superior que se puede obtener siguiendo el método de la técnica anterior.

Estos yogures se denominan en la presente memoria “yogur de referencia”.

45 Estos polvos y rellenos se han sometido a una prueba que simula el paso del polvo por un estómago humano, y la tasa de supervivencia de los fermentos lácticos de ST y LB se midió según el modelo TNO (Organización neerlandesa para la investigación científica aplicada; Utrechtseweg 48; 3704 HE Zeist; P.O. Box 360; 3700 AJ Zeist; Países Bajos) Gastrointestinal T.I.M (solicitud internacional WO 94/09895 y sus homólogos estadounidenses, tales como US-5.525.305).

50 Los resultados se ilustran en las Figuras 9 y 10 (niveles de supervivencia acumulativos en porcentaje de la dosis inicial tras el paso por el estómago y el intestino delgado, para ST - Figura 9 - y LB - Figura 10 -).

55 Los resultados de supervivencia en el modelo gastrointestinal muestran que el polvo de yogur de la invención presenta tasas de supervivencia superiores a las observadas en el yogur de referencia para las dos especies *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*. Dichos resultados muestran que el polvo de yogur según la invención es una matriz muy poderosa para proporcionar bacterias viables a partir del yogur en el intestino grueso.

Cuanto mayor sea la tasa de supervivencia, más marcadas serán las propiedades alimentarias funcionales del polvo.

60 Si el polvo de la invención se incorpora en un medio graso, tal como un relleno graso, la tasa de supervivencia será aún mayor.

Ejemplo 8: ejemplo de obtención de un yogur o leche fermentada conforme a la invención, que presenta un alto contenido en ST y LB, y que presenta además un alto contenido en MS

5 Un yogur o leche fermentada conforme a la invención comprende una alta densidad en ST y LB en forma viva o viable (contenidos en ST y LB en forma viva como se describe en la solicitud, por ejemplo, un contenido en ST vivo superior o igual a $5 \cdot 10^8$ ufc/g y un contenido en LB vivo superior o igual a $1 \cdot 10^7$ ufc/g).

10 Según una realización específica de la invención, el yogur o leche fermentada producido adicionalmente presente un alto contenido en materia seca. Según la invención, dicho yogur o leche fermentada se puede producir a partir de un sustrato lácteo cuyo contenido en MS es alto (el contenido convencional en MS de un sustrato lácteo clásico es del orden de aproximadamente 10-20 %, generalmente de 11-13 %). El contenido en MS del sustrato lácteo se puede obtener concentrando esta MS, por ejemplo, retirando una parte del agua contenida en este sustrato lácteo.

15 Para esta realización específica, los valores deseados de alto contenido en MS son de al menos 25 %, por ejemplo, de 25-60 %.

Un ejemplo específico de implementación es el siguiente:

20 Se pasteurizó leche de vaca cruda, se homogeneizó (14/2 MPa (140/20 bar)), se enfrió y se transfirió a un tanque de almacenamiento, donde se almacenó hasta su uso (tiempo de almacenamiento = 24 horas). La leche almacenada contenía 39,5 g/l de sustancias grasas; 35,23 g/l de proteínas; 129,5 g/l de materia seca (MS de 12-13 %). Su densidad a 20 °C fue de 1,0299.

25 Mediante recirculación, se incorporó polvo de lactosuero desmineralizado (pH de aproximadamente 6,5) pero cuya lactosa no se había retirado (90 % de polvo de lactosuero desmineralizado comercializado por, por ejemplo, por LSF; se incorporó a un volumen de agua caliente tratado mediante ósmosis inversa, preferentemente a una temperatura de entre 50 y 60 °C, por ejemplo, de 55 °C (0,295 kg de polvo de lactosuero desmineralizado para 1 l de agua tratada por ósmosis inversa a 55 °C). El lactosuero reconstituido resultante se sometió a un tratamiento al menos equivalente a la pasteurización (por ejemplo, a una temperatura de 75 °C durante 15 segundos), se enfrió a continuación, por ejemplo a 3 °C. El lactosuero se trató a continuación para incorporarlo a la leche.

30 El lactosuero se incorporó a la leche para formar una mezcla de 69 % de leche y 31 % de lactosuero reconstituido. A continuación se añade agua pasteurizada tratada mediante ósmosis inversa para producir una mezcla de 42 % de leche, 19 % de lactosuero reconstituido y 38 % de agua pasteurizada tratada mediante ósmosis inversa.

35 La solución resultante constituye la "mezcla" láctea de partida (= sustrato lácteo).

40 Esta "mezcla" se sometió a un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización (por ejemplo, temperatura de 75 °C durante 15 segundos), se homogeneizó, enfrió (por ejemplo, a 3 °C), y se almacenó en frío en un tanque de almacenamiento. La "mezcla" almacenada presentaba un contenido de grasa de 16,5 g/l, un contenido de proteína de 22,3 g/l, un contenido en MS de 110,81 g/l (MS de 11-12 %). Su densidad a 20 °C era de 1,0308.

45 La "mezcla" se destina entonces a la inyección en evaporadores, para concentrar su contenido en MS. Antes de inyectarla a los evaporadores, la "mezcla" láctea mantenida en el tanque de almacenamiento, por motivos de seguridad, fue de nuevo sometida a un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización (por ejemplo, a 90 °C durante 20 segundos). La temperatura aplicada a la "mezcla" láctea en los evaporadores era de aproximadamente 85 °C a la entrada y de aproximadamente 55 °C a la salida.

50 El contenido en MS de la "mezcla" láctea se controló a las salidas de los evaporadores, bien mediante medición directa (medición de su materia residual tras 17 horas a 105 °C), o bien mediante medición indirecta midiendo de forma continua la densidad de la "mezcla" que salía de los evaporadores (el contenido en MS se puede deducir a partir de las tablas preestablecidas que dan la correspondencia entre la densidad y la MS).

55 Cuando el contenido en MS medido no se corresponde con el valor deseado de MS (por ejemplo, un contenido en MS de, al menos, 36 %, por ejemplo de 36-48 %), la "mezcla" láctea se puede reciclar en el tanque de almacenamiento, para inyectarla de nuevo a los evaporadores.

60 En el ejemplo descrito en la presente memoria (leche con lactosuero reconstituido añadido), fue necesario un tiempo de circulación y recirculación en los evaporadores para que la "mezcla" láctea alcanzase, por evaporación, un contenido en MS que se corresponde con el valor deseado de 36-48 %.

65 Cuando se alcanzó el valor de MS deseado, se sacó la "mezcla" láctea concentrada de los evaporadores. A continuación se destina a inoculación con ST y LB según la invención, es decir, a un alto contenido en ST y LB, para la fermentación láctica. Por razones de seguridad, la "mezcla" láctea concentrada, antes de la inoculación, se volvió a pasteurizar (por ejemplo, a 75 °C durante 15 segundos). La "mezcla" láctea concentrada y pasteurizada se enfrió a una temperatura cercana a la temperatura de fermentación. Si la inoculación de ST y LB

se hace utilizando concentrados congelados, la “mezcla” láctea pasteurizada concentrada se enfría a una temperatura ligeramente superior a la temperatura de fermentación (por ejemplo, a aproximadamente 47 °C), para compensar la bajada de temperatura ocasionada por la consiguiente inoculación de concentrados congelados.

5 En el ejemplo descrito en la presente memoria, la “mezcla” láctea concentrada se enfrió a una temperatura de aproximadamente 47 °C; presentaría un contenido en sustancia grasa de 6,0 g/100 g, un contenido en proteínas de 7,5 g/100 g, un contenido en MS de 37,5 g/100 g (MS de 37,5 %); su densidad a 47 °C era de 1,117.

10 La “mezcla” láctea se inoculó a 20 g/l con fermentos de ST (gránulos de concentrado de *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2130, que contenía de $3,2 \cdot 10^{11}$ ufc de ST por gramo de concentrado congelado, preparado como se describe en los Ejemplos 2) y fermentos LB (gránulos de concentrado de *Lactobacillus bulgaricus* CNCM I-1519, que contenía $7,9 \cdot 10^9$ ufc de LB por gramo de concentrado congelado, preparado como se describe en el Ejemplo 2).

15 La inoculación y fermentación láctica se llevó a cabo según prácticas leales y tradicionales, según el método CODEX STAN A-11(a)-1975 (denominado ahora Codex Stan 243-2003) y el Decreto de la República Francesa núm. 88-1203, para producir yogur. La fermentación láctica se llevó a cabo a una temperatura de 38 °C, y se paró cuando se alcanzó un pH de 4,8 +0,5/-0,3 (en el caso de un yogur), por ejemplo pH = 4,8 +0,4/-0,3, por ejemplo pH = 4,8 +/- 0,3 unidades de pH, por ejemplo pH 4,8 +/- 0,2 unidades de pH (para una leche fermentada, pH = 4,6 +/- 0,2, generalmente).

20 El producto fermentado resultante es entonces un yogur o una leche fermentada:
 - que contiene un alto contenido en ST+LB en forma viva, y
 - que contiene de forma adicional un alto contenido en MS, especialmente un contenido en MS de 36-48 % (aproximadamente 37 %).

25 El hecho de utilizar un sustrato lácteo con un alto contenido en MS como el aquí descrito presenta, en comparación con un sustrato lácteo clásico, especialmente la ventaja de que es más fácil de controlar y, más especialmente, más fácil de limitar, la disminución del pH durante la fermentación. El sustrato lácteo con un alto contenido en MS de hecho presenta una mayor capacidad de amortiguamiento que el sustrato lácteo con un contenido en MS convencional.

30 Es, por lo tanto, más fácil de producir un yogur y leches fermentadas de baja acidez (por ejemplo, con un pH de aproximadamente 5,0-5,2), lo que corresponde al gusto del consumidor en la actualidad, presentando al mismo tiempo altos contenidos en ST y LB.

35 Con respecto al yogur y las leches fermentadas con un contenido en MS convencional, el yogur o las leches fermentadas con un contenido en MS superior presentan especialmente la ventaja de que son más fácilmente transformables en forma de polvo, especialmente vía deshidratación (por ejemplo, atomización). El método de transformación es más simple de implementar y de llevar a cabo, y es menos caro.

40 El proceso de transformación del yogur o las leches fermentadas con un alto contenido en MS en forma de polvo hace posible también la limitación del problema relacionado con los finos.

Ejemplo 9: otros ejemplos de deshidratación suave y muy suave, conforme a la invención

45 Según la invención, la leche fermentada o el yogur se pulveriza preferentemente en condiciones suaves, para conservar al máximo las bacterias ST y LB en forma viva o viable.

50 Un dispositivo de deshidratación suave conforme a la invención puede, por ejemplo, comprender una torre de deshidratación, conectada con, al menos, un ciclón. Dicho dispositivo generalmente se corresponde con el dibujo mostrado en la Figura 3 y la descripción dada en el Ejemplo 3.

El producto a deshidratar se lleva a la parte superior de la torre, hasta las boquillas de atomización. También se aporta aire caliente a la parte superior de la torre. El producto y el aire seco caen por lo tanto en la misma corriente en la torre, lo que da lugar a la transferencia de agua del producto al aire.

55 El aire resultante introducido con el agua asciende de nuevo a lo largo de las paredes del sistema, arrastrando partículas de producto con diámetros muy pequeños, llamadas finos. El aire resultante cargado con agua y finos se extrae en la parte superior de la torre, y se dirige a las series de ciclones, que separan el aire de los finos. El aire sin los finos se extrae de los ciclones, y se envía al exterior. Los finos se recuperan y se reincorporan al producto en el sistema de deshidratación.

60 En el fondo de la torre, los gránulos formados se topan con aire a temperatura ambiente que tiene el efecto de constituir un lecho fluidizado y de continuar la deshidratación.

Los gránulos se extraen a continuación de la torre y se alimentan a un lecho fluidizado, sobre el cual sopla aire (temperatura cercana a la temperatura ambiente).

65

En este tipo de dispositivo, se introduce aire en al menos dos puntos, es decir, a la entrada de la torre (temperatura alta), en el fondo de la torre (temperatura media). Si el dispositivo se asocia con un lecho vibratorio externo, se puede aportar aire a este tercer punto (temperatura inferior o igual a la temperatura en el fondo de la torre, preferentemente una temperatura cercana a la temperatura ambiente). El aire aportado a la parte inferior de la torre debe estar a una temperatura suficiente para permitir la transferencia de agua del producto al aire. Este aire está por lo tanto a alta temperatura, generalmente a una temperatura inferior a o igual a 210 °C, por ejemplo del orden de 190-210 °C. La temperatura del aire en el fondo de la torre es, de forma ventajosa, inferior a la temperatura del aire a la entrada de la torre, para dar lugar a un enfriamiento progresivo de los gránulos a medida que se forman. Este tipo de torre de deshidratación puede estar asociada además con un lecho vibratorio externo, para recoger los gránulos formados. Puede insuflarse aire a este lecho vibratorio externo; este aire permite terminar suavemente la deshidratación, y está a una temperatura inferior o igual a la del aire en el fondo de la torre. El aire insuflado sobre el lecho vibratorio externo estará preferentemente a una temperatura próxima a la temperatura ambiente. De este modo, los gránulos formados por contacto con el aire a alta temperatura dentro de la torre adquieren progresivamente, a través del fondo de la torre y del lecho vibratorio externo, una temperatura próxima a la temperatura ambiente.

Según una realización de la invención, la temperatura del aire que entra en la torre es del orden de 160-190 °C, de forma ventajosa del orden de 170 °C.

Según una realización de la invención, la temperatura del aire en el fondo de la torre es, de forma ventajosa, inferior o igual a 80 °C, preferentemente una temperatura de 60-80 °C, muy preferentemente del orden de 70 °C.

Según una realización de la invención, la temperatura del aire en el lecho vibratorio externo, alrededor del cual se puede montar la torre de deshidratación, está a una temperatura de 25-40 °C, de forma ventajosa del orden de 30 °C.

Una realización específica de la invención permite una deshidratación muy suave.

Según esta realización específica de la invención, la temperatura del aire a la entrada de la torre es del orden de 160-190 °C, de forma ventajosa del orden de 170 °C, y la temperatura del aire en el fondo de la torre es del orden de 60-80 °C, de forma ventajosa del orden de 70 °C. De forma ventajosa, la temperatura del aire a la entrada de la torre es del orden de 170 °C, y la temperatura del aire en el fondo de la torre es del orden de 70 °C.

Preferentemente, según esta realización específica de la invención, la torre de deshidratación (más especialmente, la torre de atomización) está asociada con un lecho vibratorio externo, sobre el cual se insufla el aire a una temperatura inferior o igual a la temperatura del aire en el fondo de la torre. Muy preferentemente, el aire insuflado al nivel del lecho vibratorio externo es de 25-40 °C, más preferentemente del orden de 30 °C.

Según la invención, la combinación del uso:

- de temperatura del aire que entra en la torre del orden de 160-190 °C, de forma ventajosa del orden de 170 °C,
- de una temperatura del aire que sale de la torre del orden de 60-80 °C, de forma ventajosa del orden de 70 °C, y
- de un lecho vibratorio externo con aire insuflado a aproximadamente 25-40 °C, de forma ventajosa del orden de 30 °C,

da lugar a un triple efecto de deshidratación, que es muy eficaz (los gránulos de polvo obtenidos tienen un contenido en MS de aproximadamente 97 %), y que es especialmente muy suave.

Estos métodos de deshidratación suave y muy suave conformes a la invención se pueden usar con cualquier yogur o leche fermentada conforme a la invención y, de forma más particular, con yogur y leches fermentadas con alto contenido en MS de la invención (tales como los ilustrados en el ejemplo 8).

A continuación se obtienen gránulos de yogur en polvo o leche fermentada conforme a la invención. Dichos gránulos de polvos contienen un alto contenido en ST y LB vivas o viables (contenido como se describe en la presente solicitud, por ejemplo, un contenido en ST superior o igual a $5 \cdot 10^8$ ufc/g y un contenido en LB superior o igual a $1 \cdot 10^4$ ufc/g), y satisfacen la designación de yogur o leche fermentada. Estos gránulos de polvo tienen, preferiblemente, una Aw inferior o igual a 0,3, preferiblemente inferior o igual a 0,2.

Estos gránulos de polvo de yogur presentan la ventaja de que se pueden almacenar a una temperatura de 20 °C durante al menos cuatro meses, sin que se observe ninguna reducción en las poblaciones de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* vivas o viables. De hecho, en dichos gránulos, el contenido en *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* vivas o viables (contenido total) no desciende por debajo de $5 \cdot 10^8$ ufc/g al cabo de un almacenamiento de 6 meses a 20 °C.

Ejemplo 10: un polvo según la invención tiene características metabólicas equivalentes, o mejores, que las de un yogur de referencia obtenido a partir de dosis de inoculación de ST y LB inferiores a las prescritas por la invención

Se obtuvieron dos polvos según la invención como se describe en el Ejemplo 1 (inoculación utilizando concentrados congelados obtenidos como se describe en el Ejemplo 2; proceso de deshidratación del Ejemplo 3).

El Polvo 1 (obtenido como se describe en el Ejemplo 1 - contenido en MS convencional) comprendía $8 \cdot 10^9$ ufc de fermentos ST (CNCM I-2130) y LB (CNCM I-1518) en forma viva por gramo de polvo, y el Polvo 2 (obtenido como se describe en el Ejemplo 8 – alto contenido en MS) contenía $2,6 \cdot 10^9$ ufc/g de estos.

5 De forma paralela, se obtuvo yogur en las mismas condiciones que los yogures obtenidos para producir el polvo 1, pero utilizando dosis de inoculación de ST y LB inferiores a las prescritas por la invención (ver el Ejemplo 4 y la Figura 4), es decir, una dosis de inoculación de ST de $1 \cdot 10^7$ ufc/g y una dosis de inoculación de LB de $5 \cdot 10^4$ ufc/g.

10 Se llevó a cabo la fermentación de este sustrato lácteo cultivado a dosis inferiores a las de la invención hasta la obtención de un yogur que presenta contenidos en ST y LB en forma viva de $5 \cdot 10^8$ ufc/g en el caso de ST y de $5 \cdot 10^6$ ufc/g en el caso de LB. Dichos contenidos en ST y LB corresponden al límite superior que se puede obtener siguiendo el método de la técnica anterior.

15 Estos yogures se denominan en la presente memoria “yogur de referencia”.

Las características metabólicas de los polvos de la invención se midieron y compararon con los de yogur de referencia:

Actividad de beta-galactosidasa:

20 La actividad de beta-galactosidasa se midió mediante un ensayo enzimático (T = 37 °C, pH = 7,3; $A_{401\text{ nm}}$; camino óptico = 1 cm; determinación continua de nivel espectrofotométrico) como se describe en Craven, Steers and Anfinsen (Journal of Biological Chemistry, 1965, 240:2468-2477), o en la página web de SIGMA-CHIMIE (<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/enzyme%20assay/g2513enz.pdf>). Los resultados son los siguientes:

25 *Tabla 3:*

Actividad de beta-galactosidasa	Yogur de referencia (D+7)	Polvo 1 de la invención	Polvo 2 de la invención
Actividad total promedio /g	7,5	66,1	40,2
Contenido en sólidos contante: Actividad total promedio /g	52,5	66,1	40,2

Proteolisis:

30 Se midió el contenido de nitrógeno:
 - para las proteínas, midiendo la cantidad total de nitrógeno y multiplicando este contenido total por 6,38 (método Kjeldahl, método NF EN ISO 8968-1, mayo de 2002 - índice de clasificación V04-221-1),
 - para el nitrógeno no proteico (es decir, aminoácidos), midiendo el NPN (método Kjeldahl, método NF EN ISO 8968-4, mayo 2002 - índice de clasificación V04-221-4),
 35 - para el nitrógeno no procedente de la caseína, siguiendo el método descrito en el método Kjeldahl, método NF EN ISO 8968-2, mayo 2002 - índice de clasificación V04-221-2.

40 Los métodos de NF se pueden consultar especialmente en AFNOR (Asociación Francesa de Normalización; 11, rue Francis de Pressensé 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex; Francia).

Además de los dos polvos según la invención y del yogur de referencia, la proteolisis se midió en la leche inicial antes de la inoculación (mezcla láctea como se describe en el Ejemplo 1).

45 Los resultados son los siguientes:

Tabla 4:

	Leche	Yogur de referencia (D+7)	Polvo 1 de la invención	Polvo 2 de la invención
Proteínas (N*6,38)	3,45 g/l	3,79 g / 100 g	36,55 g / 100 g	35,92 g / 100 g
Nitrógeno no proteico frente a nitrógeno total	2,5 % (1)	7,9 %	4,7 %	6,9 %
Nitrógeno no procedente de caseína (ANC*6,38)	20 %	10,7 %	8,9 %	9,2 %

(1) Sin urea, que ya no está presente tras la fermentación

50 Formiato:

El contenido en formiato se midió como se describe en el método del DMDA.

El DMDA es el Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (edición de 2001, traducción al francés de 2002, revisión de 2004); se puede consultar en la Office Fédéral of the Santé Publique of the Confédération suisse (<http://www.bag.admin.ch/index.html?lang=en>); ver, más especialmente, el capítulo 61B “Ensayos enzimáticos” en este método del DMDA, método 3.5 (este capítulo se puede consultar especialmente en la página web http://www.bag-anw.admin.ch/SLMB_Online_PDF/Data%20SLMB_MSDA/Version%20F/44_Agents%20conservateurs.pdf).

Los resultados son los siguientes:

Tabla 5:

	Yogur de referencia	Polvo 1 de la invención	Polvo 2 de la invención
Ácido fórmico (mg/100 g)	56	127	138
Contenido en sólidos constante	392	127	138

Foliatos (Vitamina B9):

El contenido en foliatos se midió como se describe en el método NF EN 14131 (febrero de 2004 – índice de clasificación V03-137).

Los métodos de NF se pueden consultar especialmente en AFNOR (Asociación Francesa de Normalización; 11, rue Francis de Pressensé 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex; Francia).

Los resultados son los siguientes:

Tabla 6:

	Yogur de referencia	Polvo 1 de la invención	Polvo 2 de la invención
Foliatos de los cuales ácido fólico libre (microgramos/100 g)	12,95	187	185
Contenido en sólidos constante	90,65	187	185

Comentarios:

Se observa que los polvos según la invención presentan actividad de beta-galactosidasa y contenidos en nitrógeno completamente comparables con los del yogur de referencia.

Los polvos según la invención contienen formiato, lo que demuestra que se produjo la actividad de fermentación real por la inoculación de ST y LB, según la invención.

En los ejemplos de polvo según la invención aquí presentados, el contenido en formiato es aproximadamente la mitad del nivel medido en el yogur de referencia. El formiato es producido por *S. thermophilus*, y es consumido por *L. bulgaricus*. Por lo tanto, en los polvos de la invención, la relación ST/LB es más favorable para *L. bulgaricus* que el yogur de referencia (aproximadamente 2 veces más *L. bulgaricus*). En los polvos de la invención, había un mayor consumo de formiato, lo que explica el menor nivel encontrado en el polvo de yogur. Pero la presencia de formiato indica la producción de este metabolito secundario por parte de *S. thermophilus*.

De un modo especialmente destacable, los inventores han observado que los polvos según la invención presentan un contenido en foliato (vitamina B9) mucho mayor que los del yogur de referencia, es decir, un contenido de aproximadamente el doble.

Las características metabólicas de los polvos según la invención son al menos equivalentes a las del yogur de referencia.

Además, se observa que para determinados metabolitos secundarios, tales como, por ejemplo, foliatos (vitamina B9), las características de los polvos según la solicitud o la invención son incluso claramente superiores a las del yogur de referencia).

Ejemplo 11: comparación con un polvo de yogur “falso”, es decir, un polvo de yogur en el que las bacterias simplemente se han añadido sin ningún proceso de fermentación (aporte de bacterias exógenas):

Se obtuvo un polvo según la invención como se describe en el Ejemplo 8 (sustrato lácteo con un contenido en MS alto como se describe en el Ejemplo 8; inoculación utilizando concentrados congelados obtenidos como se describe en el Ejemplo 2; método de deshidratación del Ejemplo 9). Este polvo contenía $2,2 \cdot 10^9$ ufc de yogur de simbiosis de ST CNCM I-2130 y LB CNCM I-1519 por gramo de polvo.

De forma paralela, se obtuvo un polvo de yogur falso mediante simple adición de bacterias ST y LB a un polvo de leche desnatada, sin que dichas bacterias ejercieran actividad de fermentación (simple adición de bacterias exógenas). Este polvo falso se obtuvo de la siguiente manera:

- adición de yogur fermentado liofilizado concentrado DANISCO YO-MIX 495 LYO al polvo de leche desnatada, de modo que la concentración final en yogur de simbiosis de ST+LB es de aproximadamente $2,2 \cdot 10^9$ ufc/g,
- homogeneización por agitación.

Los resultados son los siguientes:

10 *Tabla 7:*

	Polvo de la invención	Polvo falso (adición de ST y LB exógenas)
Beta-galactosidasa/g actividad	48	1,8

Se observa que el polvo de la invención presenta una actividad de beta-galactosidasa claramente superior a la del polvo falso.

- 15 Se pueden obtener resultados comparables con un polvo de la invención producido como se describe en el Ejemplo 1, es decir, a partir de un sustrato lácteo que presenta un valor clásico de contenido en MS.

20 Ejemplo 12: comparación de polvos según la invención con polvos comerciales

Las capacidades de almacenamiento del polvo según la invención se han comparado con los polvos actualmente disponibles para la venta.

Se han comparado tres tipos de polvos:

- 25 - polvo M/A 5.4 Active comercializado por Dr. Otto Süwelack (Joseph-Süwelack Strasse, D-48727 Billerbeck, Alemania),
- polvos EPI PY48 y EPI 905 (de la compañía EPI, Z.I. De l'Hermitage; B.P. 108; F-44153 Ancenis Cedex; Francia),
- polvos según la invención, que se denotan:
- 30 - Danone 1, Danone 2, Danone 3: estos tres polvos de la invención, obtenidos según el Ejemplo 1, inoculando un sustrato lácteo con un contenido en MS convencional utilizando concentrados de ST y LB congelados (productos como se describe en el Ejemplo 2), el yogur deshidratado como se describe en el Ejemplo 3, teniendo cada uno de estos tres polvos Danone 1, Danone 2, Danone 3 contenidos en ST+LB diferentes, y
- 35 - Danone 4: este es un polvo de la invención, obtenido según el Ejemplo 8, inoculando un sustrato lácteo con un alto contenido en MS utilizando concentrados de ST y LB congelados (productos como se describe en el Ejemplo 2), habiéndose deshidratado el yogur como se describe en el Ejemplo 9.

En una primera serie de ensayos se evaluó la supervivencia de los fermentos lácticos en los polvos de yogur comerciales y en los polvos según la invención en diferentes condiciones de almacenamiento: polvo solo o incorporación en un relleno anhidro, variando la temperatura entre 5 y 35 °C y el tiempo entre 3 días y más de 6 meses.

40 El relleno alimenticio sometido a ensayo está compuesto de:

Tabla 8:

INGREDIENTE	% utilizado en el relleno (%peso)
Grasa vegetal (copra hidrogenada 32)	43,9 %
Dextrosa	7,2 %
Azúcar en polvo	37,2 %
Lactosuero suave	1,5 %
Polvo de yogur según la invención	10,2 %
TOTAL	100 %

- 45 * Copra hidro 32 = copra totalmente hidrogenada con un punto de fusión de 32 °C

El % de LB y/o ST vivas o viables se midió según el método FIL oficial. El método de medición de fermentos en el relleno es estrictamente el mismo que para los polvos (5 g de muestras en ambos casos y dilución en un medio, como se describe en el Ejemplo 5).

50 Los resultados se ilustran a continuación en las Tablas 9 y 10, y en las Figuras 5, 6 y 11.

Tabla 9:

	Polvo Süwelack M/A 5.4 Active	Polvo EPI PY 48	Polvo según la invención
Población inicial (ufc/g) ± desviación estándar	$2,9 \pm 0,7 \cdot 10^7$	$1,6 \pm 0,2 \cdot 10^7$	Danone 1: $8,7 \pm 4,1 \cdot 10^9$ Danone 2: $3,7 \pm 1,8 \cdot 10^9$ Danone 3: $5,8 \pm 3,2 \cdot 10^9$ Danone 4: $1,8 \pm 0,3 \cdot 10^9$
Log(población)	7,5	7,2	Danone 1: 9,9 Danone 2: 9,6 Danone 3: 9,8 Danone 4: 9,25

Tabla 10:

5

	Polvo Süwelack M/A 5.4 Active	Polvo EPI PY 48	Polvo según la invención
Población residual a 4 °C y 1 mes	$1,4 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	Danone 1: $8,7 \pm 4 \cdot 10^9$ Danone 2: $3,7 \pm 1,8 \cdot 10^9$ Danone 3: $5,8 \pm 3,2 \cdot 10^9$ Danone 4: $1,6 \pm 0,8 \cdot 10^9$
% de supervivencia a 4 °C y 1 mes	$47 \pm 7 \%$	$74 \pm 18 \%$	Danone 1: 100 % Danone 2: 100 % Danone 3: 100 % Danone 4: 90 %
Población residual a 4 °C y 6 meses	$8,7 \cdot 10^6$		Danone 1: $1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{10}$ Danone 2: $6,3 \pm 0,1 \cdot 10^9$ Danone 3: $4,5 \pm 0,7 \cdot 10^9$
% de supervivencia a 4 °C y 6 meses	30 %		Danone 1: 100 % Danone 2: 100 % Danone 3: 100 %
Población residual a 20 °C y 1 mes	$8,7 \cdot 10^6$		Danone 1: $8,7 \pm 4 \cdot 10^9$ Danone 2: $3,7 \pm 1,8 \cdot 10^9$ Danone 3: $5,8 \pm 3,2 \cdot 10^9$ Danone 4: $1,7 \pm 0,5 \cdot 10^9$
% de supervivencia a 20 °C y 1 mes	$30 \pm 2 \%$		Danone 1: 100 % Danone 2: 100 % Danone 3: 100 % Danone 4: 93 %
Población residual a 20 °C y 6 meses	$2 \cdot 10^5$		Danone 1: $7 \pm 2 \cdot 10^9$ Danone 2: $3,2 \cdot 10^9$ Danone 3: $3,8 \cdot 10^9$
% de supervivencia a 20 °C y 6 meses	6 %		Danone 1: 80 % Danone 2: 94 % Danone 3: 100 %
Población residual a 35 °C y 2 semanas	10^3	$4,4 \cdot 10^3$	Danone 1: $2,5 \cdot 10^9$ Danone 2: $2,1 \cdot 10^9$ Danone 3: $1,4 \cdot 10^9$ Danone 4: $7,1 \cdot 10^8$
% de supervivencia a 35 °C y 2 semanas	0,004 %	0,4 %	Danone 1: $29 \pm 8 \%$ Danone 2: $58 \pm 4 \%$ Danone 3: $24 \pm 5 \%$ Danone 4: 40 %

Se observa que, a diferencia de los polvos comerciales, los polvos de la invención presentan una excelente estabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente (T=20 °C, por ejemplo).

La Figura 11 ilustra claramente esta estabilidad excepcional.

Tras 4 meses de almacenamiento a una temperatura de 20 °C, la tasa de supervivencia de los fermentos de ST+LB contenidos en los polvos de la invención es, como mínimo, de 80 %, de forma más general al menos 90 %. Los fermentos de ST presentan una tasa de supervivencia especialmente alta con respecto a los fermentos de LB; la tasa de supervivencia de ST es por lo tanto al menos igual, de forma general superior a la tasa de supervivencia de ST+LB. De hecho, la tasa de supervivencia de la ST tras 4 meses de almacenamiento a una temperatura de 20 °C es de al menos 90 %, de forma más general al menos 95 %.

Tras 6 meses de almacenamiento del polvo a una temperatura de 20 °C, la tasa de supervivencia de la población de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* contenida en un polvo de la invención es de al menos 75 %, de forma más general al menos 85 %. De hecho, la tasa de supervivencia de la ST tras 6 meses de almacenamiento a una temperatura de 20 °C es de al menos 85 %, de forma más general al menos 90 %.

Ejemplo 13: comparación de un polvo según la invención con polvos comerciales

Después de los ensayos descritos en el Ejemplo 12, se compararon los cambios de cinética de las poblaciones de fermentos para los tres tipos de polvo descritos en el Ejemplo 12, es decir:

- el polvo M/A 5.4 Active comercializado por Dr. Otto Süwelack (Joseph-Süwelack Strasse, D-48727 Billerbeck, Alemania),
- polvos EPI PY48 y EPI 905 (de la compañía EPI, Z.I. De l'Hermitage; B.P. 108; F-44153 Ancenis Cedex; Francia),
- polvos según la invención, que se denotan Danone 1, Danone 2, Danone 3 (tres contenidos en ST+LB diferentes).

Los polvos según la invención se han obtenido como se describe en el Ejemplo 1. Las capacidades de almacenamiento de dichos polvos se compararon como se ha descrito en el Ejemplo 12 (% de supervivencia), en forma de "polvo expuesto", o en forma de relleno anhidro.

Los rellenos tienen la misma composición que los descritos en el Ejemplo 12, relleno sin agua.

Se tomaron los valores de almacenamiento del "polvo expuesto" y de "relleno", teniendo en cuenta la dilución ejercida dentro de la fórmula de relleno.

1. Comparación de cambios cinéticos en las poblaciones de fermentos:

Se midieron poblaciones de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* como función del tiempo de almacenamiento y de la temperatura.

El polvo de yogur puro, o según el caso, el relleno anhidro, se analiza utilizando el método FIL oficial (ver ejemplo 5).

Se representa el cambio en las poblaciones en función del tiempo, y se ajusta (utilizando un Excel® solver) mediante un modelo cinético de segundo orden, como se describe en la Ecuación (2):

$$C(t) = \frac{C_0}{1 + k \cdot C_0 \cdot t} \quad (2)$$

donde C(t) es la población de fermentos en el instante t (g⁻¹), C₀ es la población de fermentos inicial (g⁻¹), k la constante de velocidad (g.día⁻¹) y t es el tiempo (día).

Este ajuste se realiza tanto para la población total (St+Lb), o para las poblaciones correspondientes. Sin embargo, en la medida en que los polvos comerciales tienen un contenido en *Lactobacillus* muy bajo, solo se pueden comparar los polvos de forma objetiva analizando la flora total. A continuación, la Tabla 11 muestra los resultados obtenidos.

En la Tabla 11, <C₀> y <k> indican los valores medios para las poblaciones iniciales y las constantes de velocidad halladas respectivamente ajustando series de datos diferentes.

A continuación, en la Tabla 11, la notación <> significa un valor medio de varias mediciones.

Tabla 11:

Polvo	T (°C)	<Co> ± desviación estándar	Log(Co)	<k> ± desviación estándar	producto k.co
Dr Süw. M/A 5.4	5	2,9 ± 0,7 10 ⁷	7,5	2,7 ± 1,5 10 ⁻¹⁰	9,6 10 ⁻³
Dr Süw. M/A 5.4	20			1,4 ± 0,6 10 ⁻⁹	4,9 10 ⁻²
Dr Süw M/A 5.4	35			4,4 ± 4 10 ⁻⁶	1,6 10 ²
EPI PY 48	5	16 ± 0,2 10 ⁷	7,2	5,7 ± 0,6 10 ⁻¹⁰	9,0 10 ⁻³
Danone 1	5	8,7 ± 4 10 ⁹	9,9	-	
Danone 1	20			-	
Danone 1	30			7,2 10 ⁻¹²	6,2 10 ⁻²
Danone 1	35			1,2 10 ⁻¹¹	1,1 10 ⁻¹
Danone 1	40			4,0.10 ⁻¹¹	0,35
Danone 1	45			7,8.10 ⁻¹¹	0,68
Danone 1	50			1,0.10 ⁻¹¹	87
Danone 2	5	3,7 ± 1,9 10 ⁹	9,6	-	
Danone 2	20			-	
Danone 2	30			1,0 10 ⁻¹²	3,7 10 ⁻³
Danone 2	35			1,1.10 ⁻¹¹	4,2 10 ⁻²
Danone 3	5	5,8 ± 3 10 ⁹	9,9	-	
Danone 3	20			-	
Danone 3	30			9,5 10 ⁻¹²	5,5 10 ⁻²
Danone 3	35			3,1 10 ⁻¹¹	1,8 10 ⁻¹

- 5 Las poblaciones iniciales ya se han mostrado en la Figura 5 y descrito en el Ejemplo 12. Las constantes de velocidad reflejan la velocidad a la que desaparecen los gérmenes vivos o viables y, por tanto, la cinética de mortalidad. El factor que determina dichas cinéticas es el producto $k \times Co$, que es un factor de multiplicación del tiempo en la Ecuación (2). La Figura 7 muestra cómo varía este producto en función de la temperatura de almacenamiento y para diferentes polvos comerciales y según la invención.
- 10 La Figura 7 muestra que las estabilidades de los polvos según la invención son muy superiores a las de los polvos de la técnica anterior. De forma específica, la estabilidad a 35 °C de los polvos según la invención es (casi) comparable a la de los polvos de la técnica anterior entre 5 °C y 20 °C, en condiciones de almacenamiento consideradas por tanto óptimas por el experto en la técnica.
- 15 De forma más precisa, la tasa de mortalidad aumenta con la temperatura de forma casi exponencial, hasta una temperatura crítica, a la que la mortalidad aumenta de una forma mucho mayor. Con los polvos según la invención, esta temperatura crítica es de entre 45 °C y 50 °C y es, por lo tanto, superior a las de los polvos comerciales, como los comercializados por Dr Süwelack (temperatura crítica de entre 30 °C y 35 °C).
- 20 Los polvos según la invención muestran por lo tanto una buena estabilidad a lo largo del tiempo a temperatura ambiente, pero también una buena estabilidad frente al calor, lo que los hace adecuados para usar en productos alimenticios en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente, o próxima a la temperatura ambiente.
- 25 De hecho, los resultados obtenidos para un solo polvo son suficientemente comparables a los obtenidos con el mismo polvo incorporado en el relleno; esto es así porque ambos tipos de resultados, cuando están disponibles, se presentan como un único y mismo grupo de resultados.
- Los resultados dan lugar a dos comentarios:
- 30 •Una diferencia significativa se observa en las poblaciones de fermento iniciales:
- Las concentraciones medidas en los polvos comerciales son al menos 100 veces inferiores a las medidas en un polvo según la invención en las mismas condiciones. La Figura 5 ilustra las diferencias en la población inicial en los fermentos (en esta figura, DANONE 1, DANONE 2 y DANONE 3 son polvos de la presente invención, mientras que “Dr. Süwelack”, “EPI PY48” son polvos de la técnica anterior).
- 35 •Las velocidades constantes también son muy diferentes:
- 40 Con los polvos de la técnica anterior, la disminución de las poblaciones de fermentos es detectable en el intervalo de meses para temperaturas de 5 °C a 20 °C. A 35 °C, para los polvos M/A 5.4 Active de Dr. Süwelack, se observa una disminución casi total en los fermentos en 2 semanas.

La Figura 6 ilustra este punto mostrando el cambio en las poblaciones a 20 °C en los 3 polvos según la invención. Las barras de error corresponden a la incertidumbre de medición, que es de 0,3 log. Algo similar se puede observar a 5 °C.

5 A 30 °C y a 35 °C, se puede medir una ligera disminución en las poblaciones contenidas en el polvo según la invención en la escala de una semana. Los valores de la constante de velocidad siguen siendo, no obstante, muy inferiores a los observados para los polvos de la técnica anterior, lo que demuestra una estabilidad muy superior de los fermentos en los polvos generados por la invención.

10 Estos resultados se ilustran en la Figura 7. En la Figura 7, DANONE 1, DANONE 2 y DANONE 3 son polvos según la invención, mientras que "Süwelack" y "EPI" son polvos de la técnica anterior.

15 La diferencia en la estabilidad frente al calor en la flora láctica se puede cuantificar considerando el producto de la constante de velocidad k y de la población inicial C_0 (Tabla 11): de hecho, en el modelo cinético, el tiempo es multiplicado por el producto $k \times C_0$, reflejando por tanto la velocidad a la que muere la flora a lo largo del tiempo de almacenamiento. La Figura 7 muestra el cambio en el producto $k \times C_0$ en función de la temperatura de almacenamiento para los diferentes polvos: en particular se observa que la tasa de mortalidad para los fermentos en los polvos Danone a 35 °C es casi equivalente a la de los polvos comerciales a 5 °C (aunque el experto en la técnica considera que son excelentes condiciones de almacenamiento).

20 Se ve que, a una temperatura equivalente, los polvos según la presente invención presentan un almacenamiento claramente mejor que el de los polvos de la técnica anterior.

25 Las Figuras 8A y 8B muestran cómo cambia la población "normalizada" (es decir, la relación entre la población en un instante t frente a la población inicial) en fermentos lácticos a lo largo del tiempo para los polvos de la invención, y para los polvos según la invención. El intervalo de tiempo corresponde a datos de los polvos de Dr. Süwelack de la técnica anterior (cuadrados rojos), y al ajuste según el modelo de orden 2 (línea gruesa continua).

30 Para el resto de series de puntos, se han trasladado los datos a los datos en intervalo de tiempo de la técnica anterior utilizando un factor de multiplicación: por ejemplo, cuando aumenta la temperatura la flora láctica disminuye de forma más rápida, lo que se puede compensar gráficamente mediante el uso de un factor de multiplicación superior a 1 (por ejemplo, si la población disminuye con el doble de rapidez, el factor "a" es igual a 2). Este factor de multiplicación tiene correlación con el producto $k \times C_0$ mostrado en la Figura 7. Los datos sobrepuestos resultantes forman "curvas maestras". Se observa que, independientemente de la velocidad de
35 disminución de las poblaciones, todas las series de datos siguen el mismo cambio cinético de segundo orden.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para producir un polvo de leche fermentada o de yogur, para obtener un polvo con alta densidad de fermentos lácticos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* sin tener que añadir bacterias lácticas *S. thermophilus* o *L. bulgaricus* distintas que las que participaron en la fermentación láctica, teniendo también dicho polvo muy buenas propiedades en términos de almacenamiento de los fermentos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* que contiene, caracterizado por que el proceso comprende:
 - 10 • inocular un sustrato lácteo, que se ha podido someter a un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización, inoculando con al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* a una concentración de al menos 5×10^9 ufc/g y al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* a una concentración de al menos 1×10^6 ufc/g, para obtener un sustrato lácteo inoculado;
 - 15 • fermentación láctica del sustrato lácteo así inoculado para obtener una leche fermentada o un yogur;
 - 20 • pulverizar la leche fermentada o yogur así obtenido, asegurando que la(s) temperatura(s) aplicada(s) durante la pulverización sean suficientemente favorables para la supervivencia de dichas cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* para que el polvo obtenido contenga dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* y dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* en forma viva o viable a una concentración de al menos 5×10^8 ufc/g y al menos 1×10^4 ufc/g respectivamente, y deshidratar los gránulos de polvo sobre un lecho vibratorio a una temperatura de 25 °C a 40 °C, preferiblemente de 30 °C, hasta obtener un polvo de leche fermentada o yogur que tiene una Aw (actividad de agua) de 0,25 o menos.
- 25 2. Un proceso según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* se inocula en el sustrato lácteo a una concentración de al menos 1×10^9 ufc/g, preferiblemente al menos 2×10^9 ufc/g, más preferiblemente más de $2,7 \times 10^9$ ufc/g, y por que dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* se inocula en el sustrato lácteo a una concentración de al menos 1×10^7 ufc/g, preferiblemente al menos $1,4 \times 10^7$ ufc/g.
- 30 3. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho polvo de leche fermentada o de yogur obtenido comprende dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* en forma viva o viable, a una concentración de al menos 1×10^9 ufc/g, y por que dicho polvo de leche fermentada o yogur obtenido comprende dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* en forma viva o viable, a una concentración de al menos 2×10^4 ufc/g, preferiblemente al menos 3×10^4 ufc/g, más preferiblemente al menos 4×10^4 , más preferiblemente al menos 8×10^4 ufc/g, muy preferiblemente al menos 1×10^5 ufc/g, aún más preferiblemente al menos 3×10^5 ufc/g.
- 35 4. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha pulverización de la leche fermentada o yogur comprende deshidratar y granular la leche fermentada o yogur mediante atomización.
- 40 5. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha pulverización de la leche fermentada o yogur comprende liofilizar la leche fermentada o yogur y granular la torta de liofilización.
- 45 6. Un proceso según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, caracterizado por que además de dichas etapas de deshidratación y granulación por atomización o, si resulta adecuado, además de dicha deshidratación por liofilización y dicha granulación de la torta obtenida, dicha pulverización comprende al menos una etapa de deshidratación complementaria.
- 50 7. Un proceso según la reivindicación 6, caracterizado por que dicha al menos una etapa de deshidratación complementaria es una etapa para la deshidratación sobre un lecho fluidizado producido utilizando una corriente de gas con una temperatura inferior a 80 °C.
- 55 8. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, caracterizado por que dicha al menos una etapa de deshidratación complementaria se lleva a cabo después de la granulación, y a una temperatura de 25 °C a 80 °C.
- 60 9. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que dicha pulverización de leche fermentada o de yogur comprende deshidratar y granular la leche fermentada o yogur mediante atomización, y al menos una etapa de deshidratación complementaria sobre un lecho fluidizado, y dicha deshidratación sobre un lecho vibratorio.
- 65 10. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha Aw es de 0,2 o menos, preferiblemente de 0,09 a 0,19.

11. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* es una cepa de *S. thermophilus* del tipo conocido como tipo quebradizo, que no produce exopolisacáridos (EPS) o los produce en cantidades tan pequeñas que un medio estándar para la fermentación de la leche compuesto de 120 gramos de polvo de leche desnatada, 1 gramo de péptido N3, y agua permutada en cantidad suficiente hasta 1 l, después del cultivo de dicha cepa a una temperatura de 40 °C hasta un pH de 4,7, tiene una Viscosidad de Casson a 4 °C de 500 mPa.s o menos, preferiblemente de 400 mPa.s o menos.
12. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* es la cepa de *S. thermophilus* depositada en la CNCM con el número de depósito I-2130.
13. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que durante la inoculación de dichas cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, dicho sustrato lácteo tiene un contenido en materia seca de 25 % a 60 %, preferiblemente 28 % a 55 %, más preferiblemente 38 % a 45 %.
14. Un producto intermedio que se puede producir durante la implementación del proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que está constituido por una leche fermentada o yogur que contiene al menos una cepa de *S. thermophilus* a una concentración de al menos 5×10^8 ufc/g, en forma viva o viable, y al menos una cepa de *L. bulgaricus* a una concentración de al menos 1×10^7 ufc/g, en forma viva o viable, y por que dicha al menos una cepa de *L. bulgaricus* está contenida en una relación de 1 ufc por cada 40 a 60 ufc de dicha cepa de *S. thermophilus*.
15. Un producto intermedio que se puede producir durante la implementación del proceso según la reivindicación 13, caracterizado por que está constituido:
- por un sustrato lácteo inoculado con al menos una cepa de *S. thermophilus* a una concentración de al menos 5×10^8 ufc/g y con al menos una cepa de *L. bulgaricus* a una concentración de al menos 1×10^6 ufc/g, de modo que es adecuado para producir, por fermentación láctica, un producto que se puede designar como leche fermentada o como yogur, previsto para alimentos humanos; o
 - por una leche fermentada o yogur que contiene al menos una cepa de *S. thermophilus* a una concentración de al menos 5×10^8 ufc/g, en forma viva o viable, y al menos una cepa de *L. bulgaricus* a una concentración de al menos 1×10^7 ufc/g, en forma viva o viable; y
- por que dicho sustrato lácteo inoculado o, cuando resulte apropiado, dicha leche fermentada o yogur, tiene un contenido en materia seca de 25 % a 60 %, preferiblemente 28 % a 55 %, más preferiblemente 38 % a 45 %.
16. Un proceso para producir leche fermentada o yogur que contiene *S. thermophilus* en una concentración de al menos 5×10^8 ufc/g y *L. bulgaricus* en una concentración de al menos 1×10^7 ufc/g, que comprende:
- inocular un sustrato lácteo, que se puede haber sometido a un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización, mediante inoculación con al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* y al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus*, para obtener un sustrato lácteo inoculado;
 - fermentación láctica del sustrato lácteo así inoculado para producir una leche fermentada o un yogur que contiene dichas cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en forma viva o viable;
- caracterizado por que dicha al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* se inocula a una concentración de al menos 5×10^8 ufc/g, y por que dicha al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* se inocula a una concentración de al menos 1×10^6 ufc/g.
17. Un polvo de leche fermentada o de yogur que se puede obtener mediante el proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que contiene al menos una cepa de *S. thermophilus* en forma viva o viable a una concentración de al menos 5×10^8 ufc/g, preferiblemente a una concentración de al menos 1×10^9 ufc/g, más preferiblemente al menos 2×10^9 ufc/g, y al menos una cepa de *L. bulgaricus* en forma viva o viable a una concentración de al menos 1×10^4 ufc/g, preferiblemente a una concentración de al menos 2×10^4 ufc/g, más preferiblemente a una concentración de al menos 3×10^4 ufc/g, y por que tiene una *A_w* (actividad de agua) de 0,25 o menos.
18. Un polvo de leche fermentada o de yogur según la reivindicación 17, caracterizado por que dicha al menos una cepa de *S. thermophilus* es una cepa de *S. thermophilus* del tipo quebradizo, que no produce exopolisacáridos (EPS), o que los produce en cantidades tan pequeñas que un medio estándar para la fermentación de la leche compuesto de 120 gramos de polvo de leche desnatada, 1 gramo de péptido N3, y agua permutada en cantidad suficiente hasta 1 l, después del cultivo de dicha cepa a una temperatura de 40 °C hasta un pH de 4,7, tiene una Viscosidad de Casson a 4 °C de 500 mPa.s o menos, preferiblemente de 400 mPa.s o menos.

19. Un polvo de leche fermentada o de yogur según la reivindicación 17 o la reivindicación 18, caracterizado por que tiene una Aw (actividad de agua) de 0,2 o menos, preferiblemente de 0,09 a 0,19.
- 5 20. Un relleno alimenticio, caracterizado por que contiene un polvo según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, estando dicho polvo en el estado dispersado y siendo el contenido en agua de dicho relleno alimenticio inferior a 3 %, pero no completamente cero.
- 10 21. Una galleta, caracterizada por que contiene un polvo según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 en un relleno, estando dicho polvo en el estado dispersado y siendo el contenido en agua de dicho relleno inferior a 3 %, pero no completamente cero.
22. Uso de un polvo según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, para la preparación de un producto alimenticio.
- 15 23. Uso según la reivindicación 22, caracterizado por que dicho producto alimenticio es un relleno alimenticio o una galleta que comprende dicho polvo en un relleno.

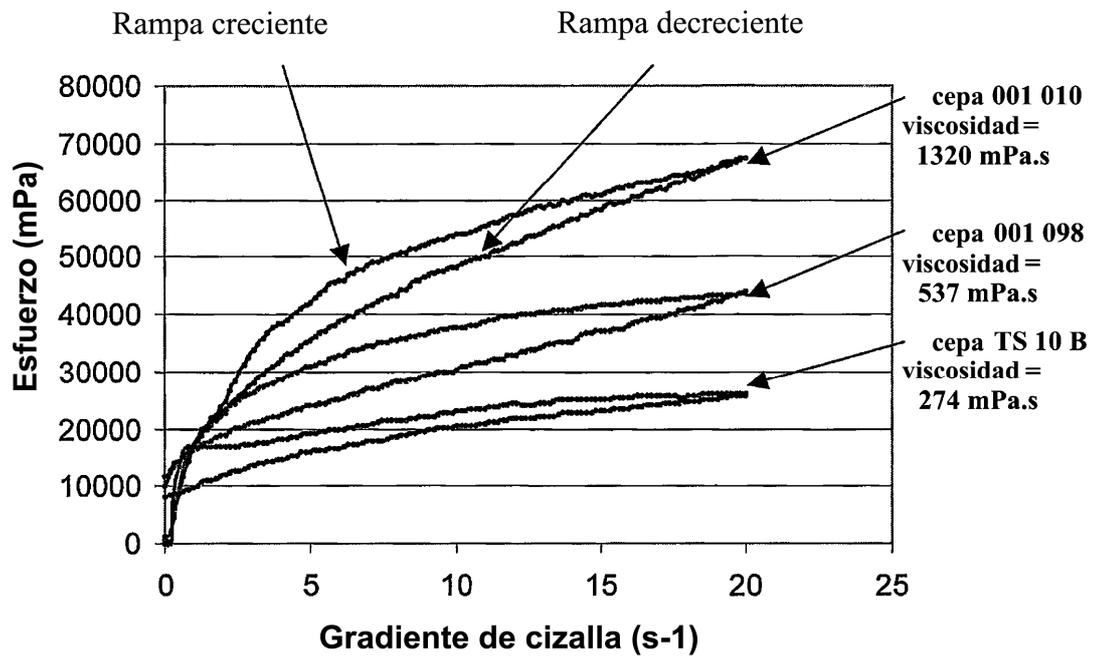


FIGURA 1

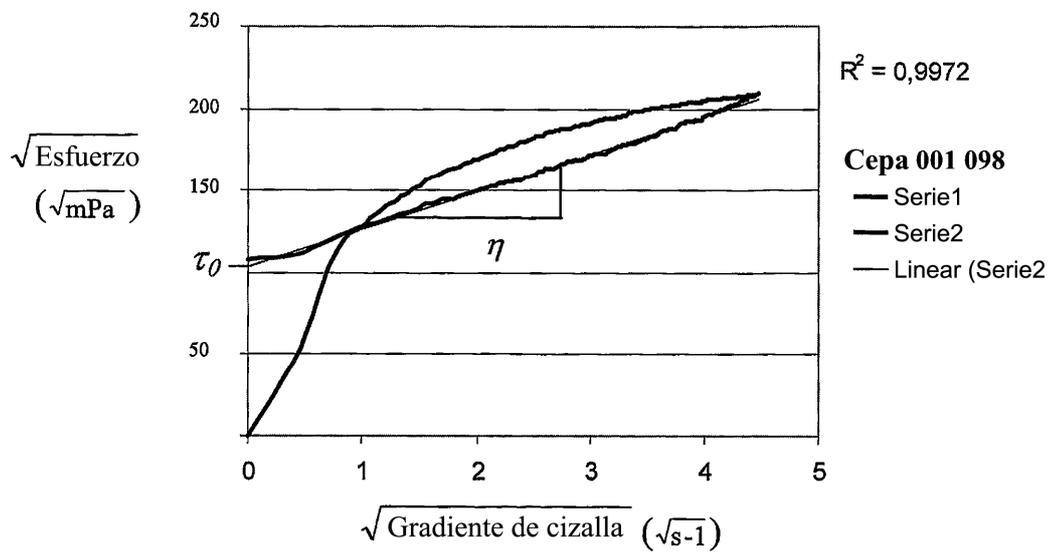


FIGURA 2

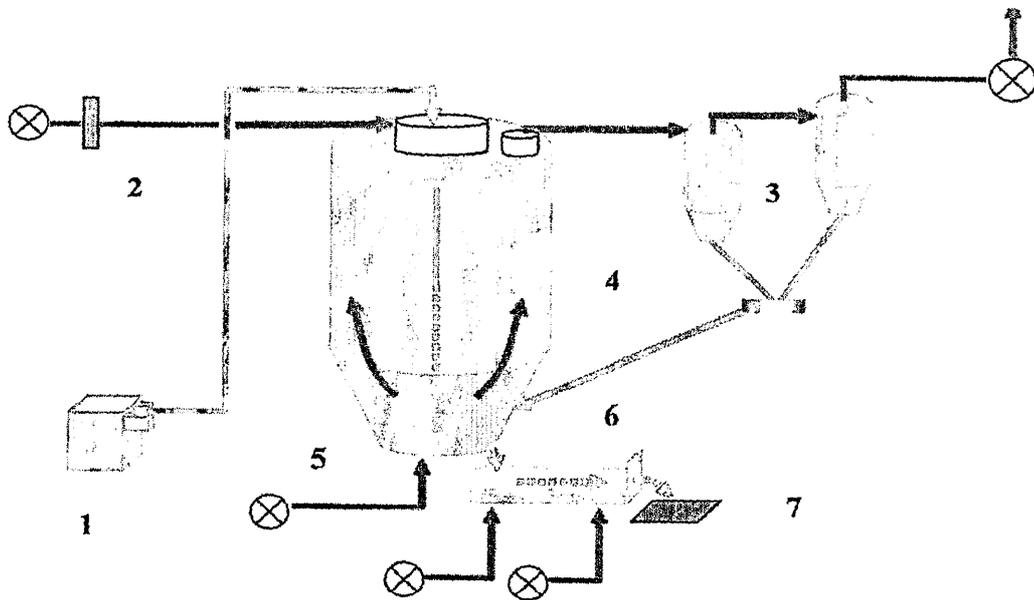


FIGURA 3

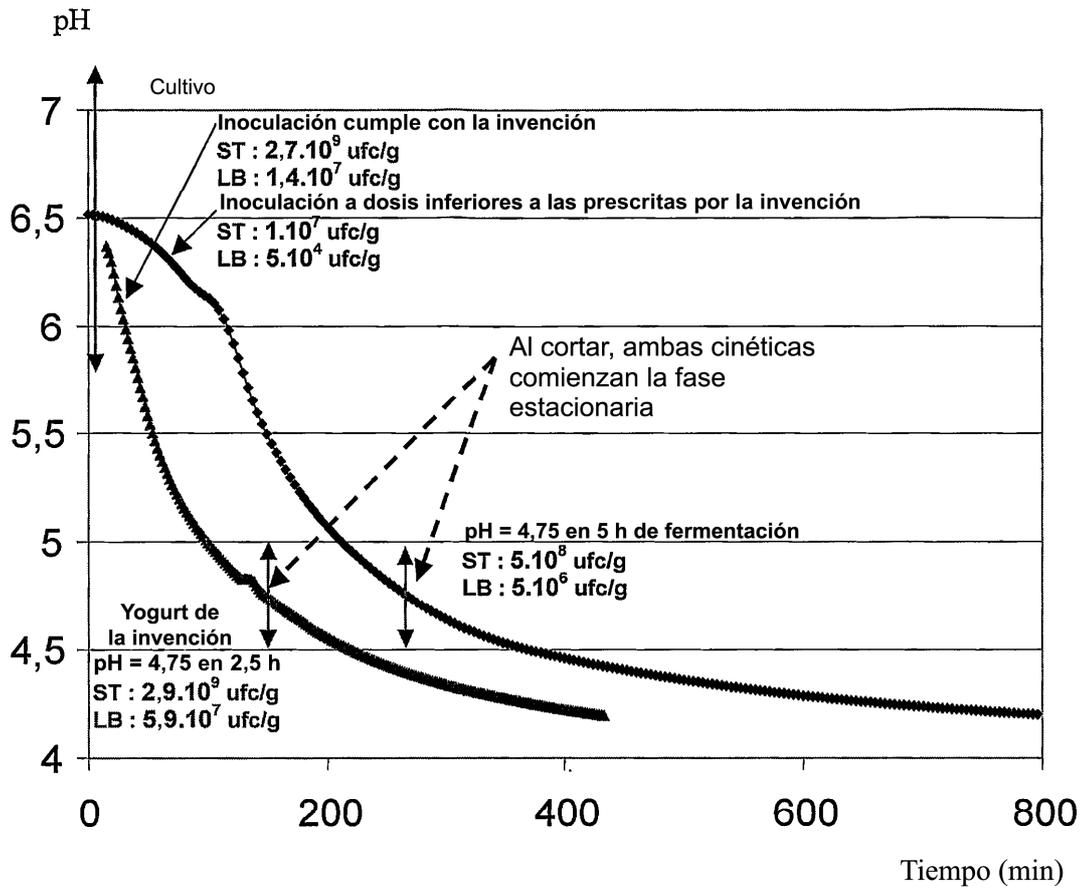


FIGURA 4

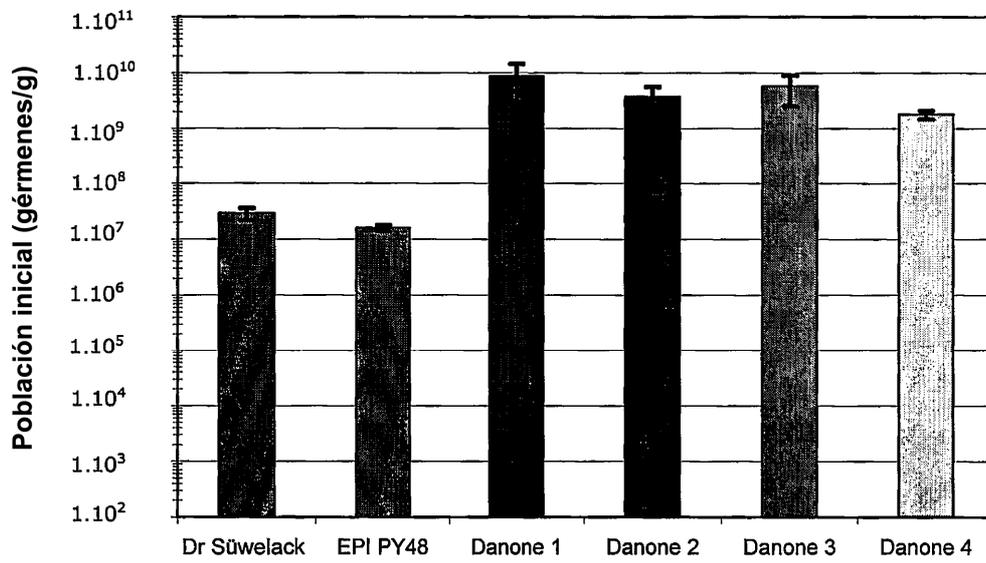


FIGURA 5

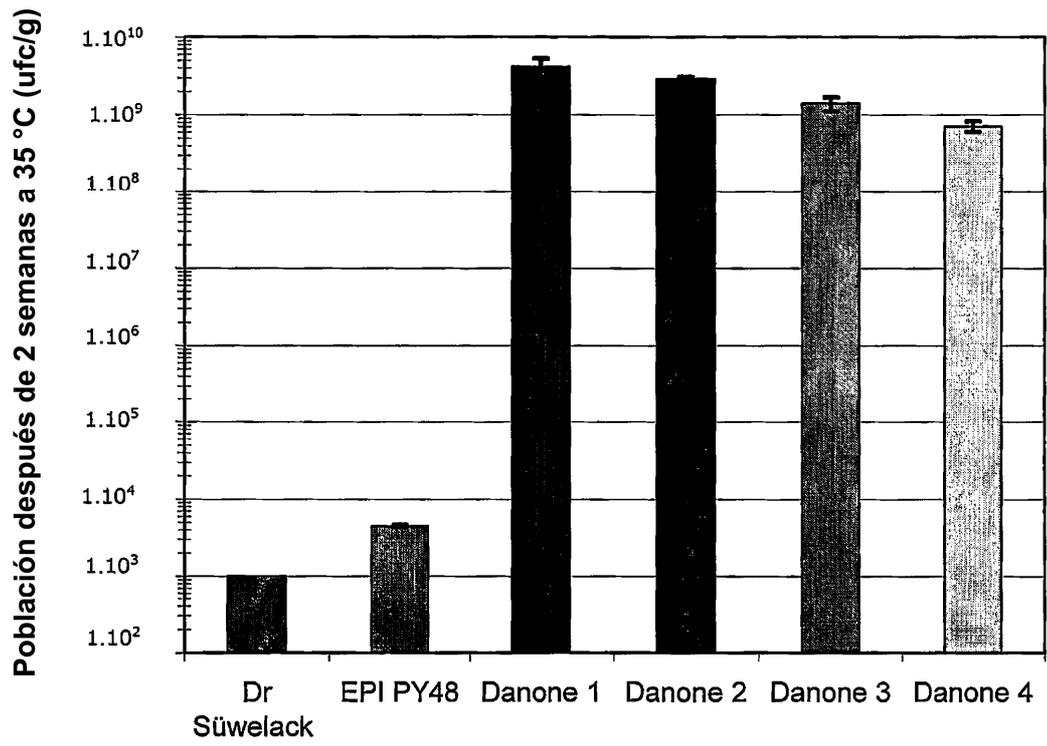


FIGURA 6

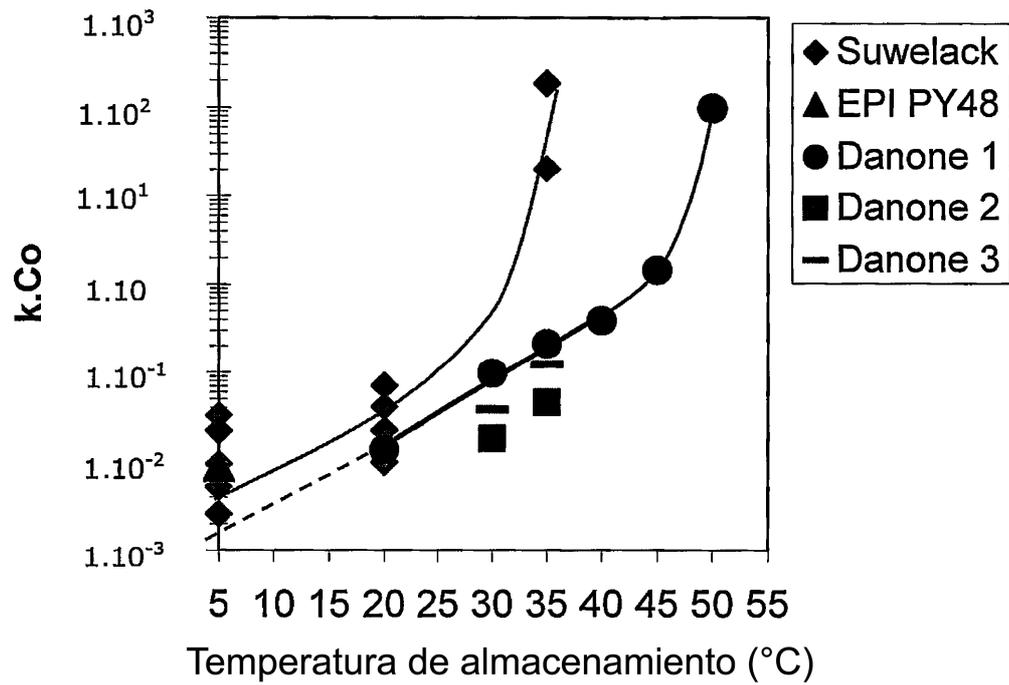


FIGURA 7

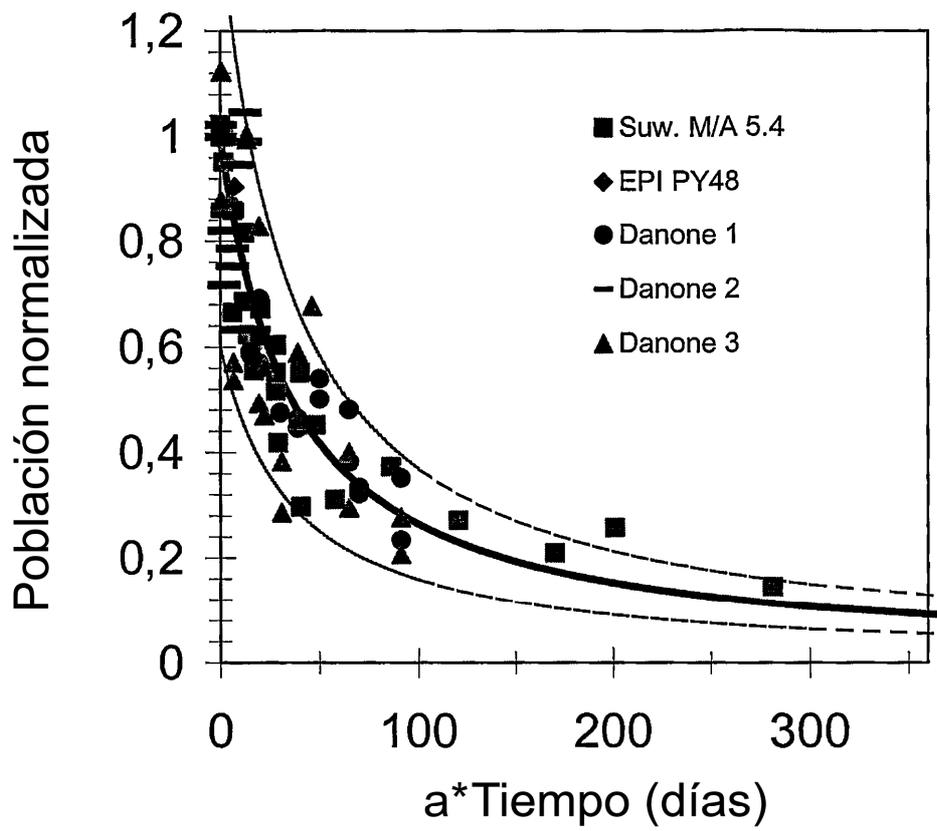


FIGURA 8A

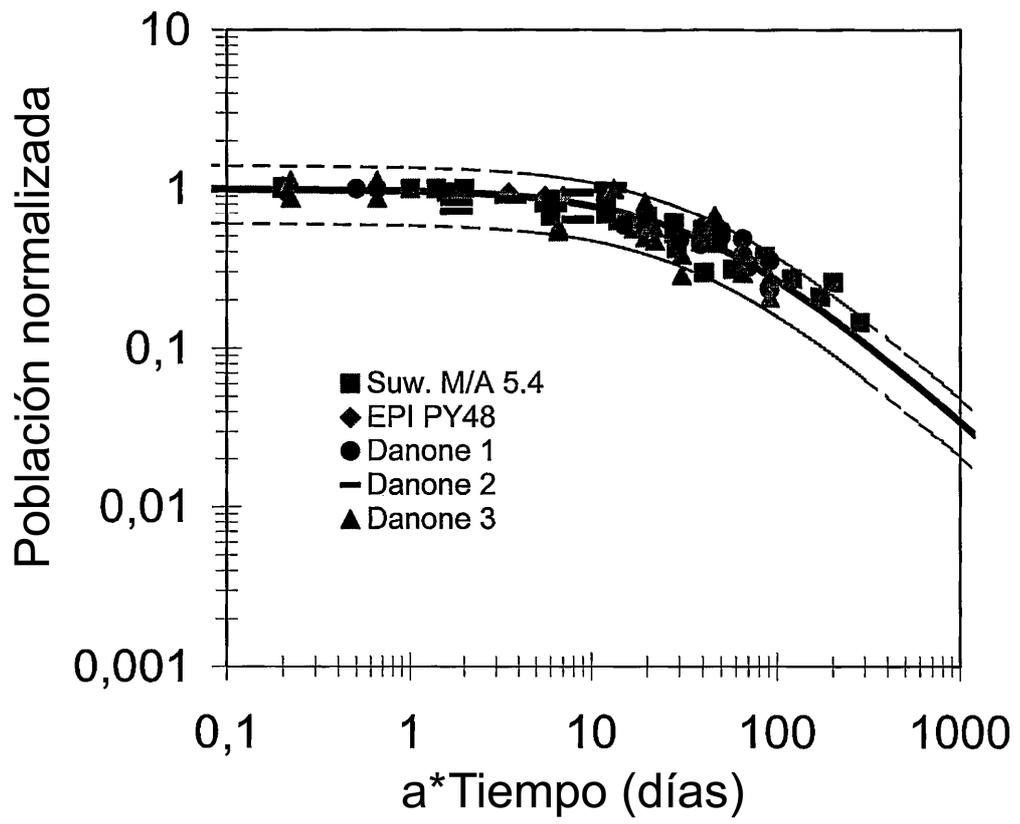


FIGURA 8B

Niveles de supervivencia acumulativos de *Streptococcus thermophilus*, en % de la dosis inicial tras el paso por el estómago y el intestino delgado

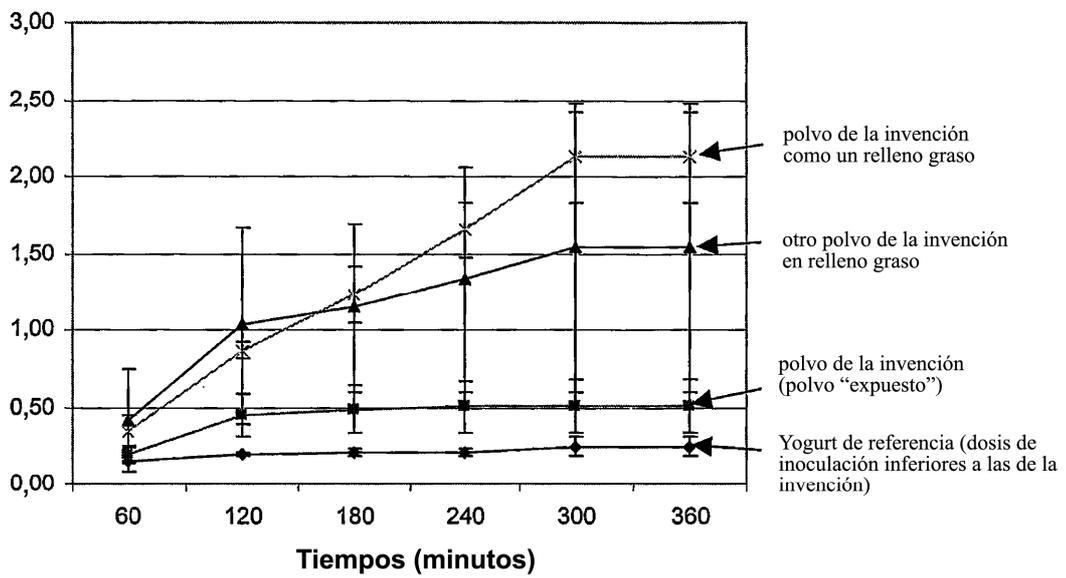


FIGURA 9

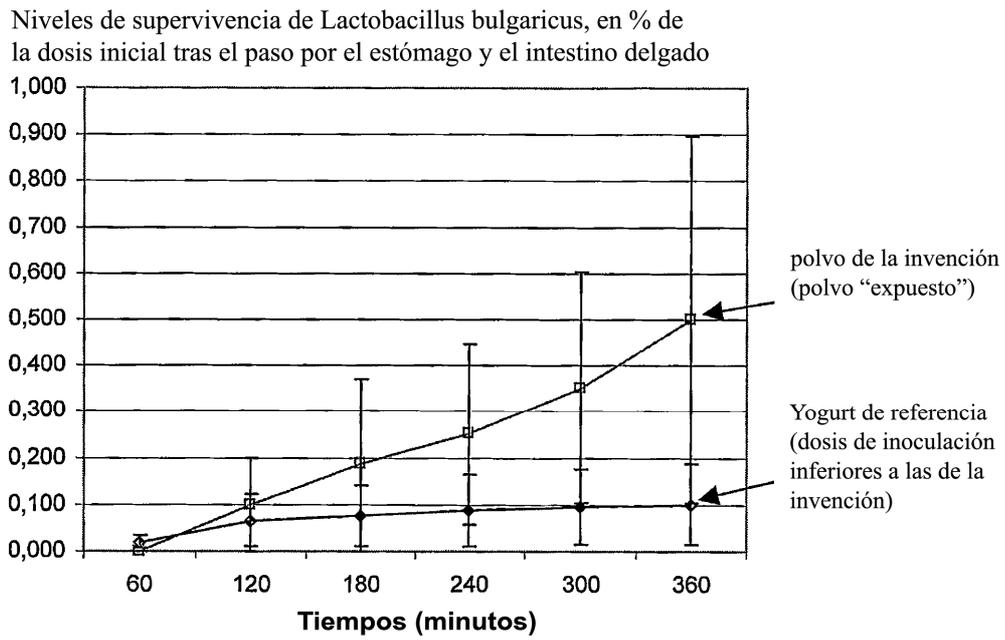


FIGURA 10

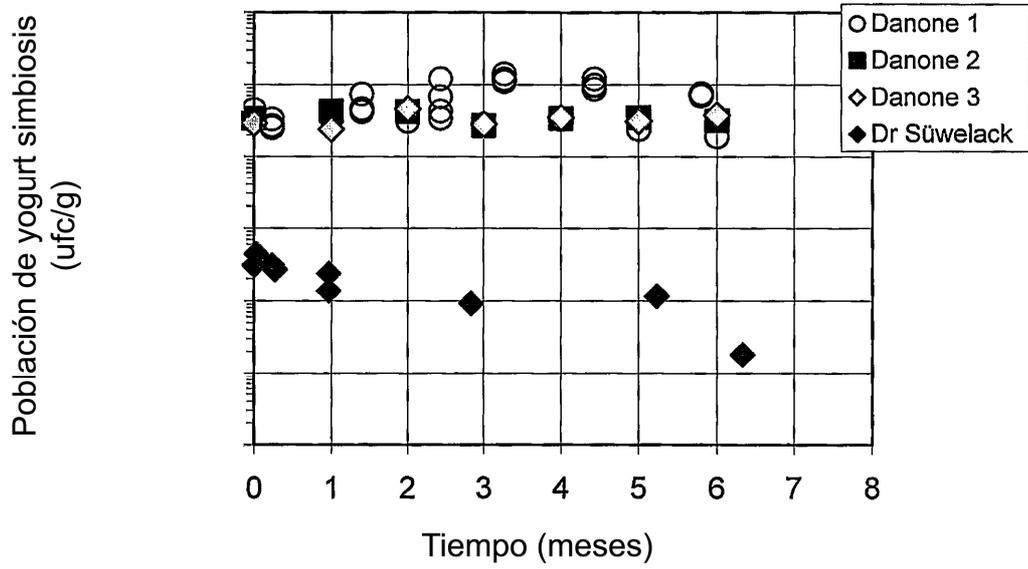


FIGURA 11