(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 773 457**

(51) Int. CI.:

A23C 9/123 (2006.01)
A23C 9/13 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2015 PCT/IB2015/055827**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17021754**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2015 E 15766613 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3328208**

(54) Título: **Métodos para la preparación de productos fermentados que comprenden Bifidobacterias**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

MARCHAL, LAURENT y
DAVAL, CHRISTOPHE

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Métodos para la preparación de productos fermentados que comprenden Bifidobacterias

Campo de la invención

La presente invención proporciona métodos para la preparación de productos alimenticios fermentados que comprenden especies de *Bifidobacterium*, a saber, *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* y/o *Bifidobacterium breve*. La presente invención proporciona adicionalmente productos preparados por tales métodos, así como inóculos de uso en tales métodos.

Antecedentes

Conforme a una definición aprobada por una Consulta conjunta de expertos de la Organización de Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas/Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO) acerca de propiedades Sanitarias y Nutricionales de la leche en polvo con bacterias vivas de ácido láctico en 2001, los probióticos son “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud en el hospedador”. Los probióticos están disponibles ampliamente en forma de productos alimenticios y suplementos, que incluyen productos lácteos fermentados. Los probióticos lácteos más comunes son de los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, aunque se han identificado también probióticos de los géneros *Escherichia, Enterococcus, Bacillus, Propionibacterium* y *Saccharomyces.*

Las *Bifidobacterias* están presentes naturalmente en la microbiota intestinal y se encuentran entre las especies probióticas más abundantes y mejor caracterizadas. Las principales especies presentes en el colon humano son *Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium longum ssp infantis, Bifidobacterium breve,* y *Bifidobacterium longum.* Las bacterias del género *Bifidobacteria* se utilizan en gran escala en productos alimenticios probióticos disponibles comercialmente, tales como productos lácteos fermentados que incluyen queso, yogur, yogur congelado y leche fermentada.

Como se define en las directrices FAO/WHO mencionadas anteriormente, los probióticos son bacterias vivas. Adicionalmente, se ha recomendado una ingesta diaria de al menos 10^8 a 10^9 células viables como la dosis mínima para proporcionar un efecto beneficioso (Silva *et al,* J. Appl. Microbiol. 97 (2004) 29-37). Así pues, no sólo es necesario asegurar que se establecen recuentos de probióticos suficientes durante la preparación del producto, sino que los mismos tienen que mantenerse también durante toda la vida útil del producto. Estos requerimientos plantean problemas en la fabricación de productos lácteos probióticos de *Bifidobacterias*, dado que las *Bifidobacterias* tienen actividad proteolítica débil y crecen lentamente en la leche. Adicionalmente, la viabilidad de las *Bifidobacterias* en los productos lácteos fermentados está limitada por su sensibilidad al pH ácido. Esto es particularmente relevante para los productos de tipo yogur, dado que la acidez puede aumentar en tales productos durante el almacenamiento, fenómeno denominado “post-acidificación”; que puede afectar por consiguiente a la viabilidad de las *Bifidobacterias*. La supervivencia de las *Bifidobacterias* durante el almacenamiento se ve afectada también por otros factores tales como los niveles de temperatura y oxígeno, así como el contenido de ácidos láctico y acético. Finalmente, se ha demostrado que el crecimiento de las *Bifidobacterias* es inhibido por cocultivo con cultivos iniciadores típicos utilizados en la preparación de productos de leche fermentada tales como yogures.

El uso de cantidades relativamente altas del *Bifidobacterias* en el inóculo, así como mejoradores del crecimiento puede utilizarse para favorecer la expansión y la retención de las poblaciones de probióticos. Mejoradores de crecimiento conocidos en la técnica incluyen el uso de extracto de levadura, hidrolizados de caseína, aminoácidos, así como otros micronutrientes y elementos traza. La cisteína ha sido descrita como un mejorador del crecimiento y retención de poblaciones de *Bifidobacterium* en la solicitud de patente PCT/FR2006/001688, mientras que el manganeso ha sido propuesto como estimulante del crecimiento para la cepa CHCC5445 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* en la solicitud de patente EP 2380446. En esta solicitud EP se demostró que el manganeso aumenta la acidificación/crecimiento de la cepa CHCC5445 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* en la leche, pero sólo cuando la leche se suplementa con una cantidad adecuada de péptidos.

Compendio de la invención

La materia objeto de la invención se define por las reivindicaciones 1 a 15.

La presente invención proporciona un proceso para la preparación de un producto de leche fermentada que comprende la fermentación de una mezcla que comprende leche, *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* y/o *Bifidobacterium breve* y un compuesto de manganeso. Sorprendentemente, en esta memoria se describe que la adición de un compuesto de manganeso es capaz de mejorar el crecimiento de dicha subespecie de Bifidobacterium en la leche sin el requisito de suplementación de péptidos.

La invención proporciona adicionalmente productos que pueden obtenerse por medio de tales procesos, así como usos de compuestos de manganeso en el cultivo de *Bifidobacterium animales* subsp. *animalis* y/o *Bifidobacterium breve.*

En una realización adicional, la presente invención proporciona un inóculo para la preparación de productos de leche fermentada que comprende un compuesto de manganeso y *Bifidobacterium seleccionado de Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* y/o *Bifidobacterium breve.*

Descripción detallada

Como se utiliza en esta memoria, el término “CNCM I-“, seguido por un número de 4 dígitos se utilizará para hacer referencia a una cepa depositada en la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM, París, Francia) bajo el Tratado de Budapest con un número de acceso correspondiente a dicho número de 4 dígitos, v.g. CNCM I-4602 o CNCM I-4321.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión “composición estable” se utilizará para dar a entender una composición que no presenta sedimentación y/o separación de suero.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión “x% (p/p)” es equivalente a “x g por 100 g”.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión “leche fermentada” se utilizará para dar a entender un producto o composición derivado de leche por la acción acidificante de al menos una bacteria de ácido láctico.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión “de cuchara” se utilizará para dar a entender un sólido o semi-sólido que puede ser consumido a cucharadas o con otro utensilio.

Como se utiliza en esta memoria, el término “fermentación” se utilizará para dar a entender el metabolismo de una sustancia por bacterias, levaduras, u otros microorganismos.

Como se utiliza en esta memoria, el término “cfu” o “CFU” se utilizará como abreviatura de la expresión “unidad formadora de colonia”.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión “en forma libre” se utilizará para dar a entender aquello que no está combinado a otros aminoácidos por un enlace peptídico formando péptidos, polipéptidos o proteínas.

Como se utiliza en esta memoria, la referencia a una cepa o especie bacteriana se utilizará para incluir bacterias funcionalmente equivalentes derivadas de ella tales como, pero sin limitarse a, mutantes, variantes o bacterias transformadas genéticamente. Estos mutantes o cepas transformadas genéticamente pueden ser cepas en las cuales uno o más genes endógenos de la cepa parental se ha (han) mutado, por ejemplo, para modificar algunas de sus propiedades metabólicas (v.g., su capacidad para fermentar los azúcares, su resistencia a la acidez, su supervivencia al transporte en el tracto gastrointestinal, sus propiedades post-acidificación o su producción de metabolitos). Aquéllos pueden ser también cepas resultantes de la transformación genética de la cepa parental para añadir uno o más genes de interés, por ejemplo, a fin de proporcionar a dichas cepas transformadas genéticamente características fisiológicas adicionales, o permitir que las mismas expresen proteínas de interés terapéutico o profiláctico que se desea administrar a través de dichas cepas. Estos mutantes o cepas transformadas genéticamente pueden obtenerse a partir de la cepa parental por medio de técnicas convencionales para mutagénesis aleatoria u orientada y transformación genética de bacterias, o por medio de la técnica conocida como “desordenamiento del genoma”. En el texto presente, cepas, mutantes y variantes derivados de una especie o cepa parental se considerarán abarcados por referencia a dicha especial o cepa parental, v.g. deberá entenderse que las frases “*Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis” y* “cepa CNCM I-4602” incluyen cepas, mutantes y variantes derivados de ellas.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión “extracto de levadura” deberá utilizarse para dar a entender concentrados de compuestos solubles de células de levadura. A este respecto, puede hacerse referencia en particular al artículo “Yeast extracts: production, properties and components” por Rolf Sommer (9th International Symposium on Yeasts), del cual se extrae la información que sigue.

Los extractos de levadura se producen principalmente por autólisis, es decir la hidrólisis se lleva a cabo sin adición de otras enzimas. Extracto de levadura o autolizado de levadura se utilizan principalmente en la industria de la fermentación y en la industria agro-alimentaria. La principal materia prima utilizada a fin de producir el extracto de levadura está constituida por levaduras con una concentración elevada de proteínas (cepas de *Saccharomyces cerevisiae*) cultivadas en medios basados en melazas o está constituida por levaduras de cerveza de la que se ha eliminado el amargor (cepas de *Sacharomyces cerevisiae* o *Sacharomyces uvarum*). Otras materias primas utilizadas son levaduras tales como *Kluyveromyces fragilis* (fermentada en lactosuero) o *Candida utilis* (cultivada en residuos ricos en carbohidratos procedentes de la industria maderera, o en etanol) o también cepas especiales de levaduras de panadero, a fin de producir extracto de levadura que contiene 5’-nucleótidos.

Se conocen en la técnica métodos para la preparación de extracto de levadura, siendo el proceso de disociación por autólisis el proceso de producción utilizado más frecuentemente. Durante este proceso, las levaduras son degradadas por sus enzimas endógenas. El proceso de autólisis puede iniciarse por choque osmótico o temperatura controlada, causando la muerte celular sin desactivación de las enzimas endógenas (en particular las proteasas). La temperatura, el pH controlado y la duración de la autólisis son factores decisivos en un proceso de autólisis estandarizado. Por

adición de sales o enzimas (por ejemplo, proteasas o mezclas de proteasas y peptidasas) con relación a la autólisis "estándar", puede controlarse la degradación proteínica de las células de levadura.

Como alternativa a la autólisis, el extracto de levadura puede producirse por termólisis (por ejemplo, por ebullición de las levaduras en agua a 100°C), plasmólisis (tratamiento con soluciones salinas concentradas a una temperatura inferior a 100°C) y degradación mecánica (homogeneización o trituración a alta presión). Los compuestos solubles se separan de las paredes celulares insolubles y se concentran con un evaporador, valiéndose de evaporación con agitación o en película descendente, seguida por etapas opcionales de filtración, concentración a vacío parcial y esterilización rápida.

Procesos de la invención

La presente descripción proporciona un proceso para la preparación de un producto de leche fermentada que comprende los pasos siguientes:

i) suministro de una mezcla que comprende:

a) leche
b) al menos una especie de bacterias, que comprende al menos una *Bifidobacteria* seleccionada del grupo que consiste en *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* y *Bifidobacterium breve,*
c) un compuesto de manganeso gracias

ii) fermentación de dicha mezcla para proporcionar un producto de leche fermentada.

La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de un producto de leche fermentada que comprende los pasos siguientes:

i) suministro de una mezcla que comprende:

a) leche
b) al menos una especie de bacterias, que comprende al menos una *Bifidobacteria* seleccionada del grupo que consiste en *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* y *Bifidobacterium breve,*
c) un compuesto de manganeso

ii) fermentación de dicha mezcla para proporcionar un producto de leche fermentada,

en donde la cantidad de compuesto de manganeso en dicha mezcla i) es al menos 5 mg/l. Debe entenderse que el compuesto de manganeso de ii) se refiere a manganeso que está presente fuera de la célula *Bifidobacteria*, es decir no está incluido en el interior de la célula de *Bifidobacteria*.

Con preferencia, la mezcla comprende al menos aproximadamente 30% (p/p) de leche, con más preferencia al menos aproximadamente 50% (p/p) de leche, y con más preferencia aún al menos aproximadamente 70% (p/p) de leche. Preferiblemente, dicha leche es leche vegetal y/o animal, más preferiblemente leche de soja, almendra, avena, cáñamo, coco, arroz, cabra, oveja, camello, yegua o vaca, y muy preferiblemente de vaca. Preferiblemente dichas leche o leches se someten a tratamiento térmico, típicamente por pasteurización, para asegurar esterilidad. Preferiblemente dicho tratamiento térmico se lleva a cabo antes de la preparación del producto de leche fermentada.

Preferiblemente dicha mezcla comprende una o más de leche desnatada, parcialmente desnatada o no desnatada. Preferiblemente dichas leche o leches puede(n) encontrarse en forma líquida, pulverizada y/o concentrada. En una realización, dicha mezcla comprende además nata. En una realización, dicha mezcla comprende adicionalmente zumos de planta y/o fruta. En una realización, dichas leche o leches pueden estar enriquecidas o reforzadas con componentes de leche adicionales u otros nutrientes tales como, pero sin limitarse a, vitaminas, minerales, elementos traza u otros micronutrientes.

El compuesto de manganeso puede ser cualquier componente de este tipo adecuado para consumo animal o humano y utilizable por las *Bifidobacterias*. Típicamente, el compuesto de manganeso puede ser una sal o solución de manganeso. Particularmente, se prefiere que el compuesto de manganeso sea una sal de manganeso tal como un acetato, carbonato, cloruro, citrato soluble, gluconato, ortofosfato, fosfato dibásico, sulfato u óxido. Se prefiere particularmente que el compuesto de manganeso sea $MnCl_2$ y/o $MnSO_4$.

En una realización, la invención se refiere a un proceso como se define anteriormente, en donde la cantidad de compuesto de manganeso en dicha mezcla i) está comprendida entre 5 y 100 mg/l, preferiblemente entre 5 y 65 mg/l.

Con preferencia, la cantidad de compuesto de manganeso en dicha mezcla es preferiblemente al menos 10 mg/l, 15 mg/l, 20 mg/l, 25 mg/l, 30 mg/l, 35 mg/l, 40 mg/l, 45 mg/l, 50 mg/l, 55 mg/l, 60 mg/l, 65 mg/l, o más.

Preferiblemente, la cantidad de *Bifidobacterias* en dicha mezcla i) es 10^6-10^8 cfu/g, más preferiblemente 10^6-10^7 cfu/g. En una realización, la *Bifidobacteria* es *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis,* preferiblemente la cepa CNCM I-

4602. En una realización alternativa, la *Bifidobacteria* es *Bifidobacterium Breve,* preferiblemente la cepa CNCM I-4321.

En una realización, la invención se refiere a un proceso como se define anteriormente, en donde dicha *Bifidobacteria* es *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* la cepa CNCM I-4602 y/o la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4321.

Se prefiere particularmente que la leche fermentada conforme a la invención se obtenga por la acción acidificante de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más cepas de bacterias de ácido láctico. Conforme a una realización, la mezcla de i) comprende adicionalmente al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más cepas de bacterias de ácido láctico.

La selección de cepas de bacterias de ácido láctico adecuadas está dentro del alcance de la persona experta y es típicamente una bacteria de ácido láctico termófila. Ejemplos de bacterias de ácido láctico que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitarse a, *Lactobacilli* (por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus buchneri, Lactobacillus delbruckei,* en particular *L. delbruckei supsp. bulgaricus* o *lactis, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus rhamnosus); Streptococci* (por ejemplo, *Streptococcus thermophilus); Lactococci* (por ejemplo, *Lactococcus lactis,* típicamente *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris).* Típicamente puede utilizarse una mezcla o asociación de una pluralidad de especies de bacterias de ácido láctico, típicamente una mezcla o asociación de *Lactobacillus* y Streptococcus. Para la preparación de yogur, ésta incluye típicamente *Lactobacillus bulgaricus* (al que se hace referencia también como *Lactobacillus delbruckei* subsp. *bulgaricus)* y *Streptococcus thermophilus,* opcionalmente con microorganismos adicionales tales como, pero sin limitarse a, especies probióticas u otras especies que pueden proporcionar cualidades organolépticas u otras deseables a la composición, v.g. *Lactococcus lactis.*

En una realización adicional, las bacterias de ácido láctico pueden comprender además una bacteria probiótica. Bacterias probióticas son conocidas por los expertos en la técnica. Ejemplos de bacterias probióticas incluyen algunas *Bifidobacteria y Lactobacilli, tales* como *Bifidobacterium brevis, Bifidobacterium animalis, Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus casei, Lactobacillus easel paracasei, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii, Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum.*

Conforme a una realización, la mezcla de i) comprende adicionalmente una pluralidad de especies de bacterias de ácido láctico que comprenden cualquiera de *Streptococcus thermophilus* y/o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus,* más preferiblemente ambas. En una realización adicional, la mezcla de i) comprende adicionalmente una pluralidad de especies de bacterias de ácido láctico que comprenden *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactococcus lactis.*

Preferiblemente, la cantidad total de bacterias de ácido láctico en dicha mezcla i) es aproximadamente 10^6-10^8 cfu/g, con más preferencia aproximadamente 10^6-10^7 cfu/g. Preferiblemente, la cantidad de *Lactobacillus* bulgaricus en dicha mezcla i) es aproximadamente 10^6 -10^8 cfu/g, con más preferencia aproximadamente 10^6-10^7 cfu/g. Con preferencia, la cantidad de Streptococcus thermophilus en dicha mezcla i) es aproximadamente 10^6 -10^8 cfu/g, con más preferencia aproximadamente 10^6-10^7 cfu/g.

Métodos para la preparación de productos de leche fermentada, tales como yogures o equivalentes de los mismos, son bien conocidos en la técnica. Típicamente, un producto de leche fermentada se prepara por cultivo de leches a una temperatura adecuada con microorganismos adecuados para proporcionar una reducción en el pH, preferiblemente hasta un pH igual a o menor que 5, con preferencia entre aproximadamente 3 y 4,5; con más preferencia entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,5. El pH puede ajustarse controlando la fermentación por el microorganismo y deteniéndola en el momento apropiado, por ejemplo, por enfriamiento.

Las temperaturas adecuadas para la fermentación de la leche son típicamente aproximadamente 36°C a aproximadamente 44°C, y la temperatura se mantiene durante un tiempo de incubación suficiente para proporcionar la reducción en el pH deseada.

Para la preparación de un producto de leche fermentada, la temperatura al comienzo de la fermentación es por lo general aproximadamente 36°C a aproximadamente 43°C, en particular aproximadamente 37°C a aproximadamente 40°C, y la temperatura al final de la fermentación es por lo general aproximadamente 37°C a aproximadamente 44°C, en particular aproximadamente 38°C a aproximadamente 41°C. El tiempo de fermentación es por lo general aproximadamente 6 a aproximadamente 11 horas.

Subsiguientemente a la fermentación, la leche fermentada se enfría. Opcionalmente puede realizarse una etapa de enfriamiento intermedio de la leche fermentada para proporcionar una leche fermentada pre-enfriada que tiene una temperatura comprendida entre aproximadamente 22°C y aproximadamente 4°C. Típicamente, el tiempo de enfriamiento intermedio es aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, en particular aproximadamente 1

hora y 30 minutos a aproximadamente 2 horas. La leche fermentada pre-enfriada se almacena típicamente durante hasta 40 horas o menos.

Preferiblemente, se realiza una etapa de enfriamiento final de la leche fermentada, tal que la temperatura al comienzo del enfriamiento final es menor que aproximadamente 22°C y la temperatura al fin del enfriamiento final es aproximadamente 4°C a aproximadamente 10°C. El producto enfriado puede almacenarse, transportarse y/o distribuirse luego a una temperatura comprendida entre aproximadamente 1°C y aproximadamente 10°C durante al menos aproximadamente 30 días, al menos aproximadamente 60 días o al menos aproximadamente 90 días.

Conforme a una realización adicional, el proceso para la preparación de un producto de leche fermentada como se define anteriormente comprende opcionalmente una etapa de agitación a una presión de al menos 20 bar, o realización de una suavizado dinámico, para obtener una composición que tiene la viscosidad deseada, típicamente una viscosidad de hasta 20 mPa.s. Las operaciones de agitación o suavizado dinámico proporcionan cierta cizalladura a la composición, que conduce típicamente a una disminución de viscosidad. Tales operaciones son conocidas por el experto en la técnica, y pueden realizarse con equipo convencional apropiado. Esta etapa se efectúa típicamente a baja temperatura, por ejemplo, a una temperatura de 1°C a 20°C.

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la aplicación de cierta cizalladura a baja temperatura, típicamente por agitación a alta presión o por realización de un suavizado dinámico, puede conducir a una formación de gel fluido en la composición, que proporciona estabilidad mejorada incluso a una viscosidad baja de hasta 20 mPa.s.

Conforme a una realización adicional, el proceso para la preparación de un producto de leche fermentada como se define anteriormente comprende opcionalmente una etapa de adición de una preparación intermedia antes del o subsiguientemente al paso de fermentación ii), comprendiendo dicha preparación intermedia una preparación de frutas y/o cereales y/o aditivos tales como saborizantes y/o colorantes. Dicha preparación intermedia puede contener en particular espesantes (fibras solubles e insolubles, alginatos, carragenanos, goma de xantano, pectina, almidón, en particular gelatinizado, goma de gelano, celulosa y sus derivados, goma guar y de algarroba, inulina) o edulcorantes (aspartamo, acesulfamo K, Sacarina, sucralosa, ciclamato) o Conservantes. Ejemplos de saborizantes incluyen, pero sin limitarse a, manzana, naranja, fresa, kiwi, saborizante de cacao, etc. Ejemplos de colorantes incluyen, pero sin limitarse a, beta-caroteno Carmín, y rojo de cochinilla. Además, la preparación de las frutas mencionadas anteriormente puede comprender frutas que están enteras o en trozos puede comprender frutas que están enteras o en trozos o en jalea o mermelada, haciendo posible por ejemplo obtener yogures de fruta. La preparación intermedia puede contener también extractos de plantas (soja, arroz, etc.).

Preferiblemente, el producto de leche fermentada conforme a la invención comprende hasta aproximadamente 30% (p/p) de dicha preparación intermedia, v.g. hasta aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25% (p/p).

El producto se envasa opcionalmente en un recipiente sellado o que puede sellarse, que contiene aproximadamente 50 g, 60 g, 70 g, 75 g, 80 g, 85 g, 90 g, 95 g, 100 g, 105 g, 110 g, 115 g, 120 g, 125 g, 130 g, 135 g, 140 g, 145 g, 150 g, 200 g, 300 g, 320 g o 500 g o aproximadamente 1 oz (28,35 g), 2 oz (56,70 g), 3 oz (85,05 g), 4 oz (113,40 g), 5 oz (141,75 g), 6 oz (170,10 g) ó 12 oz (340,19 g) de producto en peso. El sellado puede realizarse por ejemplo con una cápsula o con una tapa. El producto puede envasarse antes o después del paso de fermentación ii). Conforme a una realización, la invención proporciona un proceso de la invención en el cual la mezcla i) se envasa antes de la fermentación del paso ii). En una realización alternativa, se envasa la leche fermentada del paso ii).

En una realización, la invención proporciona un proceso de la invención en el cual la mezcla i) comprende adicionalmente aminoácido que contiene azufre y/o extracto de levadura.

El aminoácido que contiene azufre es preferiblemente cisteína (L-cisteína) o metionina, así como sus derivados, opcionalmente en la forma de una sal. Típicamente, el aminoácido que contiene azufre puede ser hidrocloruro de L-cisteína monohidratado (monohidrocloruro de ácido (R)-2-amino-mercaptopropiónico monohidratado) o L-metionina (ácido (S)-2-amino-4-metiltio-butírico). Preferiblemente, los aminoácidos que contienen azufre conforme a la invención se utilizan en forma reducida, es decir que el grupo sulfhidrilo -SH está reducido. Por consiguiente, esta forma preferida de los aminoácidos que contienen azufre excluye en particular cistina, la forma oxidada de cisteína que implica la combinación de dos cisteínas por un puente disulfuro.

El extracto de levadura puede encontrarse en la forma de extracto de levadura líquido (materia seca: 50 a 65%); extracto de levadura viscoso de tipo pasta (materia seca: 70 a 80%); o polvo seco de extracto de levadura. Típicamente, los extractos de levadura adecuados para uso en procesos de fermentación pueden tener un contenido de proteínas de 75%-75%, contenido de sodio menor que 0,5%, contenido de polisacáridos menor que 5%, contenido de oligosacáridos menor que 1% y contenido de lípidos menor que 0,5%. Típicamente, el contenido de proteínas del extracto de levadura adecuado para uso en fermentación puede ser aproximadamente 35-40% de aminoácidos libres; 10-15% de di-, tri- y tetrapéptidos (MW < 600 Da), 40-45% de oligopéptidos (MW de 2000-3000 Da); y 2-5% de oligopéptidos (MW de 3000-100000 Da).

Preferiblemente, la cantidad de cisteína en dicha mezcla i) está comprendida entre aproximadamente 1 y 100 mg/l, más preferiblemente entre 5 y 75 mg/l. Preferiblemente, la cantidad de extracto de levadura en dicha mezcla i) es hasta aproximadamente 0,5%.

La invención se refiere también al uso de un compuesto de manganeso en el cultivo de *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* y/o *Bifidobacterium breve,* en donde la cantidad de compuesto de manganeso es al menos 50 mg/l.

La presente descripción proporciona el uso de un compuesto de manganeso en el cultivo de al menos una especie de *Bifidobacteria*, que comprende al menos un *Bifidobacterium* seleccionado del grupo que consiste en *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* y *Bifidobacterium breve.* Típicamente, la cantidad de compuesto de manganeso utilizada está comprendida entre 5 y 100 mg/l de medio de cultivo, con más preferencia entre aproximadamente 5 y 65 mg/l, conforme a lo cual la cantidad de compuesto de manganeso utilizada es preferiblemente al menos 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 15 mg/l, 20 mg/l, 25 mg/l, 30 mg/l, 35 mg/l, 40 mg/l, 45 mg/l, 50 mg/l, 55 mg/l, 60 mg/l, 65 mg/l o más.

Particularmente se prefiere que el compuesto de manganeso sea una sal de manganeso, típicamente $MnCl_2$ y/o $MnSO_4$. Preferiblemente, la cantidad de *Bifidobacteria* utilizada es aproximadamente 10^6-10^8 cfu/g de medio de cultivo, más preferiblemente 10^6-10^7 cfu/g. En una realización, la *Bifidobacteria* es *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis,* preferiblemente la cepa CNCM I-4602. En una realización alternativa, la *Bifidobacteria* es *Bifidobacterium Breve,* preferiblemente la cepa CNCM I-4321.

En una realización, la invención se refiere al uso como se define anteriormente, en donde dicha *Bifidobacteria* es *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* cepa CNCM I-4602 y/o *Bifidobacterium breve* cepa CNCM I-4321.

Inóculo de la invención

La invención se refiere también a un inóculo para la preparación de productos de leche fermentada que comprende

i) al menos una especie de bacterias, que comprende al menos una *Bifidobacteria* seleccionada del grupo que consiste en *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* and *Bifidobacterium breve* y
ii) un compuesto de manganeso en una cantidad de al menos 0,1% p/p en donde i) e ii) se proporcionan en la forma de una mezcla o como un kit de partes.

La presente descripción proporciona un inóculo para la preparación de productos de leche fermentada que comprende:
i) al menos una especie de bacterias, que comprende al menos una *Bifidobacteria* seleccionada del grupo que consiste en *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* y *Bifidobacterium breve* y,
ii) un compuesto de manganeso.

Debe entenderse que el compuesto de manganeso de ii) se refiere a manganeso que está presente fuera de la célula *Bifidobacteria*, es decir, no está incluido en el interior de la célula *Bifidobacteria*.

El inóculo de la invención es adecuado para la inoculación directa de al menos una cepa de *Bifidobacteria* en leche a fin de proporcionar los productos de leche fermentada de la invención.

En una realización, i) e ii) pueden proporcionarse como una mezcla. En una realización alternativa, i) e ii) se proporcionan como un kit de partes.

El inóculo o las bacterias del mismo son preferiblemente frescos, congelados o liofilizados. El inóculo puede estar en forma líquida, seca, secada por pulverización o sólida. Se prefiere particularmente que el inóculo esté en forma líquida. Típicamente el inóculo se proporciona a la mezcla láctea en cantidades de hasta 500 mg/l.

El compuesto de manganeso puede ser cualquier compuesto de este tipo adecuado para consumo animal o humano y utilizable por las *Bifidobacterias*. Típicamente, el compuesto de manganeso puede ser una sal o solución de manganeso. Se prefiere particularmente que el compuesto de manganeso sea una sal de manganeso tal como un acetato, carbonato, cloruro, citrato soluble, gluconato, ortofosfato, fosfato dibásico, sulfato u óxido. Se prefiere particularmente que el compuesto de manganeso sea $MnCl_2$ y/o $MnSO_4$.

Preferiblemente, la cantidad de compuesto de manganeso en dicho inóculo i) es con preferencia aproximadamente al menos 0,1%, 1%, 5%, 10% o más (p/p). Típicamente entre 0,1 y 20% (p/p), con más preferencia entre aproximadamente 1 y 13% (p/p).

Preferiblemente, la cantidad de *Bifidobacteria* en dicho inóculo i) es aproximadamente 10^{10}-10^{11} cfu/g o aproximadamente 10^{10}-10^{11} cfu/ml cuando el inóculo se proporciona en forma líquida. En una realización, la *Bifidobacteria* es *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis,* preferiblemente la cepa CNCM I-4602. En una realización alternativa, la *Bifidobacteria* es *Bifidobacterium Breve,* preferiblemente la cepa CNCM I-4321.

En una realización, la invención se refiere a un inóculo como se define anteriormente, en donde dicha *Bifidobacteria* es *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* cepa CNCM I-4602 y/o *Bifidobacterium breve* cepa CNCM I-4321.

En una realización adicional, el inóculo comprende adicionalmente al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más cepas de bacterias de ácido láctico. La selección de las cepas de bacterias de ácido láctico adecuadas está dentro del alcance de la persona experta y es típicamente una bacteria de ácido láctico termófila. Ejemplos de bacterias de ácido láctico que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitarse a, Lactobacilli (por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus buchneri, Lactobacillus delbruckei, en* particular *L. delbruckei supsp. bulgaricus* o *lactis, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus rhamnosus); Streptococci* (por ejemplo, *Streptococcus thermophilus); Lactococci* (por ejemplo, *Lactococcus lactis,* típicamente *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris).* Típicamente puede utilizarse una mezcla o asociación de una pluralidad de especies de bacterias de ácido láctico, típicamente una mezcla o asociación de *Lactobacillus* y Streptococcus. Para la preparación de yogur, ésta incluye típicamente *Lactobacillus bulgaricus* (al que se hace referencia también como *Lactobacillus delbruckei* subsp. *bulgaricus)* y *Streptococcus thermophilus,* opcionalmente con microorganismos adicionales tales como, pero sin limitarse a, especies probióticas u otras especies que pueden proporcionar cualidades organolépticas u otras cualidades deseables a la composición, v.g. *Lactococcus lactis*.

En una realización preferida, el inóculo comprende adicionalmente una pluralidad de especies de bacterias de ácido láctico que comprenden cualquiera de *Streptococcus thermophilus* y/o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus,* o más preferiblemente ambas. En una realización alternativa, el inóculo comprende adicionalmente una pluralidad de especies de bacterias de ácido láctico que comprenden *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactococcus lactis.*

En una realización adicional, la invención proporciona un inóculo que comprende adicionalmente iii) aminoácido que contiene azufre y/o extracto de levadura.

El aminoácido que contiene azufre es preferiblemente cisteína (L-cisteína) o metionina, así como sus derivados, opcionalmente en la forma de una sal. Típicamente, el aminoácido que contiene azufre puede ser hidrocloruro de L-cisteína monohidratado (monohidrocloruro de ácido (R)-2-amino-mercaptopropiónico monohidratado) o L-metionina (ácido (S)-2-amino-4-metiltio-butírico). Preferiblemente, los aminoácidos que contienen azufre conforme a la invención se utilizan en forma reducida, es decir que el grupo sulfhidrilo -SH está reducido. Por consiguiente, esta forma preferida de los aminoácidos que contienen azufre excluye en particular cistina, la forma oxidada de cisteína que implica la combinación de dos cisteínas por un puente disulfuro.

El extracto de levadura puede encontrarse en la forma de extracto de levadura líquido (materia seca: 50 a 65%); extracto de levadura viscoso de tipo pasta (materia seca: 70 a 80%); o polvo seco de extracto de levadura. Los extractos de levadura adecuados para uso en procesos de fermentación pueden tener típicamente un contenido de proteínas de 75%-75%, contenido de sodio menor que 0,5%, contenido de polisacáridos menor que 5%, contenido de oligosacáridos menor que 1% y contenido de lípidos menor que 0,5%. Típicamente, el contenido de proteínas del extracto de levadura adecuado para uso en fermentación puede ser aproximadamente 35-40% de aminoácidos libres; 10-15% de di-, tri- y tetrapéptidos (MW < 600 Da), 40-45% de oligopéptidos (MW de 2000-3000 Da); y 2-5% de oligopéptidos (MW de 3000-100000 Da).

Kits

La presente descripción proporciona un kit (es decir, artículo de fabricación) para la preparación de productos de leche fermentada que comprende:

i) un receptáculo que contiene al menos una especie de bacterias, que comprende al menos una *Bifidobacteria* seleccionada del grupo que consiste en *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* y Bifidobacterium breve y,
ii) un receptáculo que contiene un compuesto de manganeso.

El kit comprende opcionalmente además cisteína, extracto de levadura y/o bacterias de ácido láctico.

Conforme a ello, el kit comprende opcionalmente además iiia) un receptáculo que contiene aminoácido que contiene azufre. El kit comprende opcionalmente iiib) un receptáculo que contiene extracto de levadura. El aminoácido que contiene azufre es preferiblemente cisteína (L-cisteína) o metionina, así como sus derivados, opcionalmente en la forma de una sal. Típicamente, el aminoácido que contiene azufre puede ser hidrocloruro de L-cisteína monohidratado (monohidrocloruro de ácido (R)-2-amino-mercaptopropiónico monohidratado) o L-metionina (ácido (S)-2-amino-4-metiltio-butírico). Preferiblemente, los aminoácidos que contienen azufre conforme a la invención se utilizan en forma reducida, es decir que el grupo sulfhidrilo -SH está reducido. Por consiguiente, esta forma preferida de los aminoácidos que contienen azufre excluye en particular cistina, la forma oxidada de cisteína que implica la combinación de dos cisteínas por un puente disulfuro.

El extracto de levadura puede encontrarse en la forma de extracto de levadura líquido (materia seca: 50 a 65%); extracto de levadura viscoso de tipo pasta (materia seca: 70 a 80%); o polvo seco de extracto de levadura. Los extractos de levadura adecuados para uso en procesos de fermentación pueden tener típicamente un contenido de proteínas de 75%-75%, contenido de sodio menor que 0,5%, contenido de polisacáridos menor que 5%, contenido de oligosacáridos menor que 1% y contenido de lípidos menor que 0,5%. Típicamente, el contenido de proteínas del

extracto de levadura adecuado para uso en fermentación puede ser aproximadamente 35-40% de aminoácidos libres; 10-15% de di-, tri- y tetrapéptidos (MW < 600 Da), 40-45% de oligopéptidos (MW de 2000-3000 Da); y 2-5% de oligopéptidos (MW de 3000-100000 Da).

El kit comprende opcionalmente además iiic) un receptáculo que contiene al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más cepas de bacterias de ácido láctico. La selección de cepas de bacterias de ácido láctico adecuadas está dentro del alcance de la persona experta y es típicamente una bacteria de ácido láctico termófila. Ejemplos de bacterias de ácido láctico que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitarse a, *Lactobacilli* (por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus buchneri, Lactobacillus delbruckei,* en particular L. *delbruckei supsp. bulgaricus o* lactis*, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus rhamnosus); Streptococci* (por ejemplo, *Streptococcus thermophilus); Lactococci* (por ejemplo, *Lactococcus lactis,* típicamente *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris).* Típicamente puede utilizarse una mezcla o asociación de una pluralidad de especies de bacterias de ácido láctico, típicamente una mezcla o asociación de *Lactobacillus* y Streptococcus. Para la preparación de yogur, ésta incluye típicamente *Lactobacillus bulgaricus* (al que se hace referencia también como *Lactobacillus delbruckei* subsp. *bulgaricus)* y *Streptococcus thermophilus,* opcionalmente con microorganismos adicionales tales como, pero sin limitarse a, especies probióticas u otras especies que pueden proporcionar cualidades organolépticas u otras cualidades deseables a la composición, v.g. *Lactococcus lactis.*

En una realización preferida, dichas bacterias ácido láctico comprenden cualquiera de *Streptococcus thermophilus* y/o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus,* preferiblemente ambas. En una realización alternativa, dicha bacteria de ácido láctico comprende una pluralidad de especies de bacterias de ácido láctico que comprenden *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus y Lactococcus.*

Opcionalmente, el kit de partes puede comprender adicionalmente instrucciones para uso de i) e ii) para la preparación de productos de leche fermentada.

Productos de leche fermentada de la invención

En una realización adicional, la presente invención proporciona productos de leche fermentada que pueden obtenerse por medio de un proceso de la invención o prepararse por medio de un inóculo de la invención. El producto conforme a la invención es adecuado para consumo o ingestión, preferiblemente por medios orales. Conforme a ello, el producto comprende o consiste en materia comestible. Se prefiere particularmente que los productos de la invención estén sustancialmente exentos de materia patógena o toxicógena. El producto conforme a la invención puede ser un producto farmacéutico, un producto nutracéutico, y/o un producto alimenticio.

Preferiblemente, el producto de leche fermentada comprende, comprende esencialmente o consiste en leche que ha sido sometida a tratamiento térmico al menos equivalente a pasteurización, llevándose a cabo preferiblemente dicho tratamiento térmico antes de la preparación del producto de leche fermentada.

Típicamente, la leche se pasteuriza por medio de los pasos sucesivos siguientes:

1) una etapa de estandarización de las sustancias grasas de la materia prima a fin de obtener una sustancia estandarizada,
2) una etapa de enriquecimiento con materia seca de la sustancia estandarizada obtenida en la etapa anterior, a fin de obtener una sustancia enriquecida,
3) una etapa de precalentamiento de la sustancia enriquecida obtenida en la etapa anterior, a fin de obtener una sustancia de partida,
4) una etapa de pasteurización y retención de la sustancia de partida obtenida en la etapa anterior, a fin de obtener una sustancia pasteurizada y retenida,
5) una etapa opcional de homogeneización de la sustancia pasteurizada y retenida obtenida en la etapa anterior, a fin de obtener una sustancia pasteurizada, retenida y opcionalmente homogeneizada,
6) una etapa de enfriamiento inicial de la sustancia pasteurizada, retenida y opcionalmente homogeneizada obtenida en la etapa anterior, a fin de obtener una sustancia de partida pasteurizada que ha sido retenida, opcionalmente homogeneizada, y enfriada.

Como se utiliza en esta memoria, “estandarización de las sustancias grasas” debe utilizarse para dar a entender una etapa que consiste en llevar la cantidad de grasas presentes en la sustancia de partida a un nivel predeterminado. El enriquecimiento con materia seca implica la adición de proteínas y sustancia grasa a fin de modificar la consistencia de la cuajada.

Como se utiliza en esta memoria, “retención” debe utilizarse para dar a entender una termización rápida de la leche y hace posible destruir la flora microbiana vegetativa, con inclusión de las formas patógenas. Su duración típica es de 4 a 10 minutos, en particular de 5 a 8 minutos, y de modo más particular aproximadamente 6 minutos.

Como se utiliza en esta memoria, “homogeneización” debe utilizarse para dar a entender la dispersión de las sustancias grasas en la sustancia de tipo leche en pequeños glóbulos de grasa. La homogeneización se lleva a cabo por ejemplo a una presión de 100 a 280 bar, en particular 100 a 250 bar, más en particular 100 a 200 bar, particularmente aproximadamente 200 bar. Esta etapa de homogeneización es puramente opcional. La misma está ausente en particular del proceso de producción de productos con 0% de sustancias grasas.

Preferiblemente, el producto de leche fermentada comprende más de aproximadamente 0,3 g por 100 g en peso de ácido láctico libre, más preferiblemente por encima de aproximadamente 0,7 g ó 0,6 g por 100 g en peso de ácido láctico libre. Preferiblemente, el producto de leche fermentada comprende un contenido de proteínas al menos equivalente al de la leche o leches de la(s) que se deriva el mismo, con preferencia al menos aproximadamente 2,5%, con más preferencia al menos aproximadamente 3% o 3,5% (p/p). Preferiblemente, el producto de leche fermentada tiene un pH igual a o menor que 5, con preferencia entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4,5 y con más preferencia entre aproximadamente 3,5 de aproximadamente 4,5.

Preferiblemente, el producto de leche fermentada tiene una viscosidad menor que 200 mPa.s, más preferiblemente menor que 100 mPa.s y muy preferiblemente menor que 60 mPa.s, a 10°C, con una velocidad de cizalladura de 64 s^{-1}. El producto de leche fermentada conforme a la invención es preferiblemente un producto seleccionado del grupo que comprende yogur, yogur cuajado, yogur agitado, yogur que puede verterse, bebida de yogur, yogur congelado, kéfir, suero de mantequilla, quark, crema agria, queso tierno y queso. En una realización, el producto de leche fermentada conforme a la invención es un producto de leche fermentada bebible, más preferiblemente una bebida de leche fermentada tal como, pero sin limitarse a, una bebida de yogur, kéfir, etc. En una realización alternativa, el producto lácteo conforme a la invención es un producto de leche fermentada que puede utilizarse a cucharadas tal como un yogur cuajado o agitado o equivalente de los mismos.

Preferiblemente, el producto de leche fermentada, conforme a la invención, puede almacenarse, transportarse y/o distribuirse a una temperatura desde 1°C a 10°C durante al menos aproximadamente 30 días, al menos aproximadamente 60 días o al menos aproximadamente 90 días desde el envasado y se mantiene adecuado para el consumo.

Preferiblemente, el producto de leche fermentada comprende al menos 10^6, más preferiblemente al menos 10^7 y muy preferiblemente al menos 10^8 unidades formadoras de colonia (CFU) de bacterias *Bifidobacteria* conforme a la invención por gramo (g) de producto conforme a la invención. Preferiblemente también, el producto conforme a la invención comprende al menos aproximadamente 10^{11}, más preferiblemente al menos 10^{10} y muy preferiblemente al menos 10^9 unidades formadoras de colonia (CFU) de bacterias *Bifidobacteria* conforme a la invención por gramo (g) de producto conforme a la invención. En una realización, la *Bifidobacteria* es *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis,* preferiblemente la cepa CNCM I-4602. En una realización alternativa, la *Bifidobacteria* es *Bifidobacterium Breve,* preferiblemente la cepa CNCM I-4321.

En una realización, la invención se refiere a un producto como se define anteriormente, en donde dicha *Bifidobacteria* es *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis,* cepa CNCM I-4602 y/o *Bifidobacterium breve,* cepa CNCM I-4321.

Preferiblemente, el producto de leche fermentada es un producto envasado que comprende al menos 10^6, más preferiblemente al menos 10^7 y muy preferiblemente al menos 10^8 unidades formadoras de colonia (CFU) de bacterias *Bifidobacteria* conforme a la invención por gramo (g) de producto conforme a la invención subsiguientemente al almacenamiento, transporte y/o distribución a una temperatura que va desde 1°C a 10°C durante al menos aproximadamente 30 días, al menos aproximadamente 60 días o al menos aproximadamente 90 días desde su envasado.

Conforme a una realización adicional, el producto de leche fermentada comprende además una preparación intermedia que comprende una preparación de frutas y/o cereales y/o aditivos tales como saborizantes y/o colorantes. Dicha preparación intermedia puede contener en particular espesantes (fibras solubles e insolubles, alginatos, carragenanos, goma de xantano, pectina, almidón, en particular gelatinizado, goma de gelano, celulosa y sus derivados, goma guar y de algarroba, inulina) o edulcorantes (aspartamo, acesulfamo K, sacarina, sucralosa, ciclamato) o conservantes. Ejemplos de saborizantes son: manzana, naranja, fresa, kiwi, saborizante de cacao, etc. Ejemplos de colorantes son: beta-caroteno, carmín, y rojo de cochinilla. Además, la preparación de las frutas mencionadas anteriormente puede comprender frutas que están enteras o en trozos o en jalea o mermelada, haciendo posible por ejemplo obtener yogures de frutas. Preferiblemente, el producto de leche fermentada conforme a la invención comprende hasta aproximadamente 30% (p/p) de dicha preparación intermedia, v.g. hasta aproximadamente 10%, 15%, 20%, o 25% (p/p).

Preferiblemente, el producto de leche fermentada conforme a la invención se proporciona en un envase sellado o susceptible de sellado que contiene aproximadamente 50 g, 60 g, 70 g, 75 g, 80 g, 85 g, 90 g, 95 g, 100 g, 105 g, 110 g, 115 g, 120 g, 125 g, 130 g, 135 g, 140 g, 145 g, 150 g, 200 g, 300 g, 320 g o 500 g o aproximadamente 1 oz (28,35 g), 2 oz (56,70 g), 3 oz (85,05 g), 4 oz (113,40 g), 5 oz (141,75 g), 6 oz (170,10 g) ó 12 oz (340,19 g) de producto en peso.

Ejemplos

La finalidad de los presentes experimentos fue determinar el efecto de la suplementación de manganeso sobre la fermentación de la leche por *Bifidobacterium*.

Materiales y métodos

Se preparó leche reconstituida mezclando 112 g de leche desnatada en polvo (Arla Foods) por litro de agua permutada. Sulfato de manganeso(II) monohidratado ($MnSO_4$) e hidrocloruro de L-cisteína monohidratado fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El extracto de levadura fue suministrado por AES laboratoire. El medio de leche se trató en autoclave a 115°C durante 15 minutos antes de la inoculación.

Las cepas de *Bifidobacteria* se proporcionaron congeladas. *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* CNCM I-4602 & *Bifidobacterium breve* CNCM I-4321 fueron suministradas por Danone. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* "BB12" fue suministrado por Chr. Hansen. Las cepas se inocularon en medios de leche reconstituida después de descongelación a 0,01 % v/v (aproximadamente 5 x 10^6 cfu/ml). Para los cultivos de *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis,* el medio de leche reconstituida se suplementó con 2 g/l de dextrosa, a fin de asegurar tiempos de acidificación comparables a *Bifidobacterium breve* y BB12.

La fermentación se llevó a cabo a 37ºC y se monitorizó utilizando una sonda de pH.

Ejemplo 1: Suplementación con manganeso del medio de leche reconstituido

Se preparó leche reconstituida y se fermentó utilizando *B. animalis, B. breve* o BB12 como las proporcionadas anteriormente. Se observó que la adición de $MnSO_4$ a la leche reconstituida acortaba el tiempo para alcanzar pH 5,5 para *B. animalis animalis* & *B. breve*, pero no para BB12. A niveles de 5mg/L y 65mg/L se observó una reducción de 7% en el tiempo hasta pH 5,5 para *B. animalis* subsp. *animalis,* y para BB12 se observó por el contrario un aumento en el tiempo hasta pH 5,5 mayor de 10% para ambos niveles de suplementación de manganeso. Para *B. breve,* el ensayo de suplementación de manganeso se llevó a cabo solamente al nivel de 65 mg/L, proporcionando un ligero acortamiento en el tiempo hasta pH 5,5.

Tabla 1: La adición de $MnSO_4$ acorta el tiempo hasta pH 5,5 para *Bifidobacterias* seleccionadas

Cepa	Leche reconstituida	Leche reconstituida + 5 mg/L Mn	Leche reconstituida + 65 mg/L Mn
B. animalis subsp. *animalis*	1024	956	952
B. breve	1088		1068
BB12	904	1004	1052

Ejemplo 2: Suplementación de medios de leche reconstituida con $MnSO_4$ junto con cisteína.

Se preparó leche reconstituida y se fermentó utilizando *B. animalis* subsp. *animalis, B. breve o* BB12 como las proporcionadas anteriormente. Como en el Ejemplo 1, se observó que la adición de $MnSO_4$ junto con cisteína a la leche reconstituida acortaba el tiempo hasta alcanzar pH 5,5 para *B. animalis* subsp. *animalis* & *B. breve,* pero no para BB12.

Tabla 2: La adición de $MnSO_4$ junto con cisteína acorta el tiempo hasta pH 5,5 para *Bifidobacterias* seleccionadas

Cepa	Mezcla láctea	Tiempo hasta pH 5,5
B. animalis subsp. *animalis*	Leche reconstituida	1024
	Leche reconstituida + 50mg/L Mn + 15mg/L Cisteína	988
	Leche reconstituida + 15mg/L Mn + 50mg/L Cisteína	736
B. breve	Leche reconstituida	1088
	Leche reconstituida + 50mg/L Mn + 15mg/L Cisteína	956
	Leche reconstituida + 15mg/L Mn + 50mg/L Cisteína	760

BB12	Leche reconstituida	904
	Leche reconstituida + 50mg/L Mn + 15mg/L Cisteína	1372
	Leche reconstituida + 15mg/L Mn + 50mg/L Cisteína	924

Ejemplo 3: Suplementación de medios de leche reconstituida con levadura.

La adición de extracto de levadura acortaba adicionalmente el tiempo hasta pH 5,5 para *B. animalis animalis,* no sólo cuando se utilizaba en presencia de $MnSO_4$ junto con cisteína, sino también cuando se añadía como suplemento único a leche reconstituida.

Cepa	Mezcla Láctea	Tiempo hasta pH 5,5
B. animalis subsp. *animalis*	Leche reconstituida	1024
	Leche reconstituida + 0,25 g/L extracto de levadura	746
	Leche reconstituida + 50mg/L Mn + 15mg/L Cisteína + 0,25 g/L extracto de levadura	596
	Leche reconstituida + 15mg/L Mn + 50mg/L Cisteína + 0,25 g/L extracto de levadura	524

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de un producto de leche fermentada que comprende los pasos siguientes:

i) suministro de una mezcla que comprende:

a) leche
b) al menos una especie de bacterias, que comprende al menos una *Bifidobacteria* seleccionada del grupo que consiste en *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* and *Bifidobacterium breve,*
c) un compuesto de manganeso

ii) fermentación de dicha mezcla para proporcionar un producto de leche fermentada,
en donde la cantidad de compuesto de manganeso en dicha mezcla i) es al menos 5 mg/l.

2. Un proceso conforme a la reivindicación 1, en donde la cantidad de compuesto de manganeso en dicha mezcla i) está comprendida entre 5 y 100 mg/l, preferiblemente entre 5 y 65 mg/l.

3. Un proceso conforme a la reivindicación 1 ó 2, en donde el compuesto de manganeso es una sal de manganeso.

4. Un proceso conforme a la reivindicación 3, en donde la sal de manganeso se selecciona del grupo que consiste en $MnCl_2$ y/o $MnSO_4$.

5. Un proceso conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad de *Bifidobacterium* en dicha mezcla i) es $10^6 – 10^8$ cfu/g.

6. Un producto que puede obtenerse por el proceso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

7. Un producto conforme a la reivindicación 6, en donde dicho producto comprende al menos 10^6 cfu/g de *Bifidobacteria.*

8. Uso de un compuesto de manganeso en el cultivo de Bifidobacterium animalis subsp. animalis y/o Bifidobacterium breve, en donde la cantidad de compuesto de manganeso es al menos 50 mg/l.

9. Un inóculo para la preparación de productos de leche fermentada que comprende

i) al menos una especie de bacterias, que comprende al menos una *Bifidobacteria* seleccionada del grupo que consiste en *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* y/o *Bifidobacterium breve* y,
ii) un compuesto de manganeso en una cantidad de al menos 0,1% p/p
en donde i) e ii) se proporcionan en la forma de una mezcla o como un kit de partes.

10. Un inóculo conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el inóculo o las bacterias del mismo son recientes, congeladas o liofilizadas.

11. Un inóculo conforme a la reivindicación 10, en donde el compuesto de manganeso es una sal de manganeso.

12. Un inóculo conforme a la reivindicación 11, en donde la sal de manganeso se selecciona del grupo que consiste en $MnCl_2$ y/o $MnSO_4$.

13. Un proceso, producto o inóculo conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la mezcla o inóculo comprende adicionalmente cisteína y/o extracto de levadura.

14. Un proceso, producto, uso o inóculo conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la al menos una bacteria comprende adicionalmente *Lactobacillus bulgaricus* y/o *Streptococcus thermophilus.*

15. Un proceso, producto, uso o inóculo conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha *Bifidobacteria* es *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* cepa CNCM I-4602 y/o *Bifidobacterium breve* cepa CNCM I-4321.