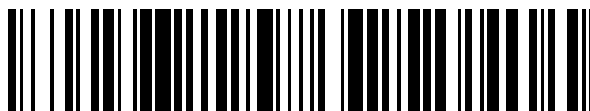


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 654**

51 Int. Cl.:

A23L 29/00 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2016** **PCT/EP2016/058267**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017** **WO17178053**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2016** **E 16716560 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020** **EP 3442348**

54 Título: **Lactobacillus rhamnosus para su uso en la preparación de productos fermentados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
13.10.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GARAULT, PEGGY;
DAVAL, CHRISTOPHE y
MARCHAL, LAURENT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 786 654 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

Lactobacillus rhamnosus para su uso en la preparación de productos fermentados

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una cepa novedosa de *Lactobacillus rhamnosus*, composiciones que comprenden dicha cepa y a procedimientos para la preparación de dichas composiciones.

Antecedentes técnicos

El diacetilo (butanodiona o butano-2,3-diona) y la acetoina (3-hidroxiбутanona o acetil metil carbinol) son compuestos saborizantes de alimentos comúnmente usados que proporcionan el sabor característico de la manteca y a menudo se adicionan a sustitutos de manteca tales como la margarina, a fin de proporcionar sabores mantecosos.

El diacetilo se produce industrialmente mediante la deshidrogenación de 2,3-butanediol. Sin embargo, tanto el diacetilo como la acetoina también son subproductos de la fermentación láctica mediante ciertas cepas de bacterias y varios otros microorganismos. Las bacterias ácidas heterolácticas son capaces de producir diacetilo y acetoina como subproductos, junto con el ácido láctico. El uso de *Lactobacillus rhamnosus* para proporcionar compuestos de sabor como el diacetilo y la acetoina es conocido en la técnica (WO 2012136832). La *Lactobacillus rhamnosus* produce acetaldehído de piruvato y el pirofosfato de tiamina, que se condensa con el piruvato para proporcionar alfa acetolactato, el cual se convierte en diacetilo, que también puede reducirse adicionalmente a acetoina mediante la reductasa de diacetilo. La acetoina también se forma mediante la descarboxilación de alfa-acetolactato. Sin embargo, la cantidad de diacetilo y acetoina formada depende de la cepa específica de *Lactobacillus rhamnosus* que se use (Medina de Figueroa Microbiol. Res. (2001) 155,257-262). Existe una necesidad de un procedimiento rentable para preparar productos alimenticios con características organolépticas cremosas y mantecosas mejoradas.

Resumen de la invención

La presente invención parte del hallazgo inesperado de que una cepa novedosa de *Lactobacillus rhamnosus* (a la que también se llamará *L. rhamnosus* en lo sucesivo) produce altas cantidades de diacetilo y acetoina, lo que proporciona características organolépticas excepcionales a los productos alimenticios.

En consecuencia, la presente invención proporciona la cepa *Lactobacillus rhamnosus* depositada en la CNCM bajo el número de referencia CNCM I-4993. La presente invención también proporciona composiciones que comprenden *L. rhamnosus* CNCM I-4993 y procedimientos para la preparación de las mismas.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en esta invención, el término "composición estable" debe interpretarse como una composición que no presenta sedimentación y/o separación de suero alguna.

Como se usa en esta invención, el término "x % (p/p)" es equivalente a "x g por cada 100 g". Como se usa en esta invención, los términos "composición láctea", "composición a base de leche" o "producto lácteo" deben interpretarse como un producto o composición que comprende esencialmente o consiste en leche o componentes de leche y, opcionalmente, otros ingredientes.

Como se usa en esta invención, el término "lácteo fermentado" debe interpretarse como un producto o composición que es el producto de la fermentación acidificante de una composición a base de leche mediante un cultivo de partida de la fermentación de microorganismos, en particular, bacterias, preferentemente bacterias de ácido láctico. Como se usa en esta invención, el término "leche fermentada" debe interpretarse como un producto o composición derivado de leche mediante la acción acidificante de al menos una bacteria de ácido láctico. En consecuencia, como se usa en esta invención, un producto lácteo fermentado puede ser, por consiguiente, una leche fermentada, como un yogurt (por ejemplo, un yogurt firme, batido o bebible), o un queso fresco, tal como un queso blanco o un "petit- Suisse". También puede ser una leche fermentada colada, tal como un yogurt colado (por ejemplo, un yogurt concentrado o estilo griego).

Los términos "leche fermentada" y "yogurt" o "yoghurt" reciben sus significados habituales en el campo de la industria láctea, es decir, productos adecuados para el consumo humano y que se originan a partir de la fermentación láctica acidificante de un sustrato de leche. Estos productos pueden contener ingredientes secundarios tales como frutas, vegetales, azúcar, etc. La expresión "leche fermentada" se puede usar para hacer referencia a leches fermentadas que no sean yogurts, por ejemplo, "Kéfir", "Kumtss", "Lassi", "Dahi", "Leben", "Filmjolk", "Villi", "leche de acidophilus".

El término "yogurt" o "yoghurt", como se usa en esta invención, debe interpretarse como leche fermentada obtenida mediante la fermentación láctica acidificante de bacterias de ácido láctico termofílicas específicas tales como *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (a la que también se hace referencia como *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*), que debe estar en estado vivo en el producto terminado en una UFC mínima. En ciertos países, las reglamentaciones permiten la adición de bacterias de ácido láctico adicionales al yoghurt, tales como, entre otras, cepas de *Bifidobacterium* y/o *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus casei*. Estas

cepas de bacterias de ácido láctico adicionales pretenden otorgar varias propiedades al producto terminado, como la proporción de cualidades organolépticas, favoreciendo el equilibrio de la flora intestinal o modulando el sistema inmune.

5 Como se usa en esta invención, el término "composición láctea fermentada colada" debe interpretarse como una composición láctea fermentada que ha estado sujeta a un procedimiento de separación de suero ácido posterior a la fermentación.

Como se usa en esta invención, la expresión "que puede servirse con cuchara" debe interpretarse como un sólido o semi sólido que puede consumirse por medio de una cuchara u otro utensilio.

10 Como se usa en esta invención, el término "fermentación" debe interpretarse como el metabolismo de una sustancia por microorganismos, por ejemplo, bacterias, levaduras u otros microorganismos.

Como se usa en esta invención, el término "ufc" o "UFC" debe interpretarse como la abreviación del término "unidad formadora de colonias".

15 Como se usa en esta invención, el término "CNCM I-" seguido de un número de 4 dígitos debe interpretarse como la referencia a una cepa depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) 25 rue du Docteur Roux, París, Francia, bajo el Tratado de Budapest, con un número de acceso correspondiente a dicho número de 4 dígitos, por ejemplo, CNCM 1-4993.

20 Como se usa en esta invención, la referencia a una cepa o especie bacteriana debe interpretarse como que incluye funcionalmente bacterias equivalentes derivadas de las mismas, como ser, entre otras, bacterias mutantes, variantes o bacterias genéticamente transformadas. Estas cepas mutantes o genéticamente transformadas pueden ser cepas en las que uno o más genes endógenos de la cepa madre ha(n) sido mutados, por ejemplo, a fin de modificar algunas de sus propiedades metabólicas (por ejemplo, su capacidad de fermentar azúcares, su resistencia a la acidez, su supervivencia al transporte en el tracto gastrointestinal, sus propiedades de post-acidificación o su producción de metabolitos). También pueden ser cepas resultantes de la transformación genética de la cepa madre para adicionar uno o más genes de interés, por ejemplo, a fin de dar a dichas cepas genéticamente transformadas características fisiológicas adicionales, o para permitirles expresar proteínas de interés terapéutico o profiláctico que uno desea administrar a través de dichas cepas. Estas cepas mutantes o genéticamente transformadas pueden obtenerse de la cepa madre por medio de técnicas convencionales para una mutagénesis aleatoria o dirigida a un sitio y la transformación genética de bacterias, o por medio de la técnica conocida como "barajamiento del genoma". En el presente texto, las cepas, las mutantes y las variantes derivadas de una especie o cepa madre se considerarán como abarcadas por la referencia a dicha especie o cepa madre, por ejemplo, las frases "*Lactobacillus rhamnosus*" y "CNCM I-4993" deben interpretarse como que incluyen cepas, mutantes y variantes derivadas de las mismas.

35 En consecuencia, como se usa en esta invención, la referencia a la cepa bacteriana especificada mediante un número de acceso o depósito debe interpretarse como que abarca las variantes de la misma que tengan al menos el 95 % de identidad (véase: Stackebrandt & Goebel, 1994, Int. J. Syst. Bacteriol. 44:846-849). En una realización particularmente preferida, dicha variante tiene al menos un 97 % de identidad con la secuencia de ARNr 16S de dicha cepa específica, más preferentemente al menos el 98 % de identidad, más preferentemente al menos el 99 % o más identidad.

40 Como se usa en esta invención, el término "sustancialmente puro", cuando se usa en referencia a una cepa bacteriana, se refiere al porcentaje de dicha cepa bacteriana en relación con el contenido total del microorganismo. Sustancialmente puro puede ser de al menos alrededor del 99,99 %, al menos alrededor del 99,90 %, al menos alrededor del 99,50 %, al menos alrededor del 99,00 %, al menos alrededor del 95,00 %, al menos alrededor del 90,00 %, al menos alrededor del 85,00 % o al menos alrededor del 75,00 %.

Como se usa en esta invención, una "bacteria de ácido láctico" es una bacteria grampositiva, tolerante al ácido, generalmente no esporulante ni respirante, ya sea con forma de vara o coco, que es capaz de fermentar azúcares en ácido láctico.

45 La presente invención se refiere a una cepa novedosa de *Lactobacillus rhamnosus*, composiciones que comprenden dicha cepa y a procedimientos para la preparación de dichas composiciones.

Lactobacillus rhamnosus

50 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*. La cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de la invención se caracteriza por ser capaz de secretar al menos 150 partes por millón (ppm) de acetoina, preferentemente al menos 200 partes por millón (ppm) de acetoina, y más preferentemente al menos 250 partes por millón (ppm) de acetoina. En una realización, la *Lactobacillus rhamnosus* se caracteriza por ser capaz de secretar entre 150 y 500 partes por millón (ppm) de acetoina. Se prefiere particularmente que la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de la invención sea capaz de secretar al menos 20 partes por millón (ppm) de diacetilo, preferentemente al menos 30 partes por millón (ppm) de diacetilo, más preferentemente al menos 40 partes por millón (ppm) de diacetilo. En una realización, la *Lactobacillus rhamnosus* se caracteriza por ser capaz de secretar entre 20 y 100 partes por millón (ppm) de diacetilo. Los procedimientos para la medición de la secreción de diacetilo y acetoina son

conocidos en la técnica, típicamente como se proporciona en esta invención la secreción de los mismos se mide mediante cromatografía de gases del sobrenadante después de al menos 16 horas de cultivo en un medio a base de leche. En una realización preferida, la presente invención proporciona una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* caracterizada por ser capaz de secretar al menos 250 ppm de acetoina y al menos 20 ppm de diacetilo.

La presente invención proporciona la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993. Esta cepa ha sido aislada de la naturaleza y depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) (Instituto Pasteur, 25 Ruedu Docteur Roux, París, Francia) bajo el Tratado de Budapest el 1 de julio de 2015, bajo el número de referencia CNCM I-4993. El depósito se hizo según el Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para el Objeto del Procedimiento de Patente, como se proporciona en el mismo, el solicitante pide que una muestra de los microorganismos depositados solo se ponga a disposición de un experto independiente, hasta la fecha en la que pueda concederse la patente. En una realización, la presente invención proporciona la cepa aislada *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993, preferentemente dicho aislado es sustancialmente puro.

Composiciones de la invención

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993. Preferentemente, la composición comprende al menos 10^6 , más preferentemente al menos 10^7 y más preferentemente al menos 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) de *Lactobacillus rhamnosus*

CNCM I-4993 por gramo (g) de composición según las realizaciones de la invención.

En las realizaciones, la composición comprende de 10^5 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (UFC) de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 por gramo (g) de composición según las realizaciones de la invención. En realizaciones adicionales, la composición comprende de 10^6 a 10^{11} unidades formadoras de colonias (UFC) de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 por gramo (g) de composición según las realizaciones de la invención.

La bacteria, como se proporciona en esta invención, es adecuada para su uso en composiciones comestibles, en consecuencia, en una realización, la presente invención proporciona una composición adecuada para el consumo o la ingesta humana, preferentemente por vía oral. En consecuencia, la composición comprende o consiste en materia comestible. Particularmente se prefiere que las composiciones de las realizaciones de la invención estén sustancialmente libres de materias patógenas o toxicogénicas. La composición según las realizaciones de la invención puede ser un medicamento o una composición farmacéutica. En una realización particularmente preferida, la composición según la invención puede ser una composición no terapéutica, preferentemente una composición nutracéutica, una composición nutricional y/o una composición alimenticia. Particularmente se prefiere que la composición alimenticia sea una composición alimenticia fermentada, preferentemente una composición láctea fermentada. Las composiciones adicionales según las realizaciones de la invención también incluyen aditivos alimenticios, ingredientes alimenticios, fórmulas nutricionales, alimentos para bebés, fórmulas de leche maternizada y fórmulas de seguimiento para bebés.

La composición puede comprender incluso cepas adicionales de *Bifidobacterium* y/o bacterias de ácido láctico; típicamente 2, 3, 4 o más cepas adicionales. Los ejemplos de *Bifidobacterium* que pueden usarse incluyen, entre otras, *Bifidobacterium animalis* (por ejemplo, *Bifidobacterium animalis* subesp. *animalis* o *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis*); *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*; *Bifidobacterium bifidum*. Los ejemplos de bacterias de ácido láctico que pueden usarse incluyen, entre otros, *Lactobacilli* (por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus delbrueckii*, en particular, *L. delbrueckii* subesp. *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* subesp. *lactis* o *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*). Preferentemente, la composición comprende además *Lactobacillus* y/o *Streptococcus*. Para la preparación de yogur, la composición típicamente comprende *Lactobacillus bulgaricus* (a la que también se hace referencia como *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*) y *Streptococcus thermophilus*, opcionalmente con microorganismos adicionales, tales como especies probióticas u otras especies, entre otras, que pueden proporcionar cualidades organolépticas deseables o de otro tipo a la composición, por ejemplo, cepas adicionales de *Lactococcus lactis*.

En consecuencia, en una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 y comprende además al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus*, al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* y opcionalmente una o más cepas de *Lactococcus lactis* y/o *Bifidobacterium*.

Composiciones lácteas

En una realización, la presente invención proporciona una composición láctea, preferentemente una composición láctea fermentada. La composición láctea de la invención comprende leche, preferentemente leche fermentada. Preferentemente, la composición comprende al menos alrededor del 30 % (p/p) de leche, más preferentemente al menos alrededor del 50 % (p/p) de leche e incluso más preferentemente al menos alrededor del 70 % (p/p) de leche. En las realizaciones, la composición comprende del 30 % al 100 % (p/p) de leche. En las realizaciones, la composición comprende del 50 % al 100 % (p/p) de leche. En las realizaciones, la composición comprende del 70 % al 100 % (p/p) de leche. Preferentemente, dicha leche es una leche vegetal y/o animal, más preferentemente de soja, almendras,

avena, cáñamo, escanda, coco, arroz, cabra, oveja, yegua o vaca, y más preferentemente se trata de leche de vaca. Preferentemente, dicha(s) leche(s) se somete(n) a un tratamiento con calor, típicamente de pasteurizado, a fin de asegurar su esterilidad. Preferentemente, dicho tratamiento con calor se efectúa antes de la preparación de la composición láctea fermentada.

5 Preferentemente, dicha leche comprende uno o más de una leche desnatada, parcialmente desnatada o no desnatada. Preferentemente, dicha leche o leches pueden estar en forma líquida, en polvo y/o concentrada. En una realización, dicha leche comprende además componentes de leche preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en crema, caseína, caseinato (por ejemplo, caseinato de calcio o de sodio), proteínas de suero notablemente en la forma de un concentrado (WPC), proteínas de leche notablemente en la forma de un concentrado (MPC), hidrolisatos de proteína de leche y mezclas de los mismos. En una realización, dicha mezcla comprende además jugos de plantas y/o frutas. En una realización, dicha leche o leches pueden estar enriquecidas o fortificadas con componentes de leche adicionales u otros nutrientes, como vitaminas, minerales, oligoelementos u otros micronutrientes, entre otros.

10 Preferentemente, la composición láctea comprende por encima de alrededor de 0,3 g por cada 100 g en peso de ácido láctico libre, más preferentemente encima de alrededor de 0,7 g o 0,6 g por cada 100 g en peso de ácido láctico libre. En las realizaciones, la composición comprende de 0,3 a 0,7 gramos por cada 100 g en peso de ácido láctico libre.

15 Preferentemente, la composición láctea comprende un contenido de proteína al menos equivalente a aquel de la leche o leches de la o las cuales deriva, preferentemente al menos alrededor del 2,5 %, y más preferentemente al menos alrededor del 3 % o 3,5 % (p/p). Preferentemente, la composición tiene un pH igual o inferior a 5, preferentemente entre alrededor de 3 y alrededor de 4,5 y más preferentemente entre alrededor de 3,5 y alrededor de 4,5.

20 Preferentemente, la composición láctea tiene una viscosidad inferior a 200 mPa.s, más preferentemente inferior a 100 mPa.s y más preferentemente inferior a 60 mPa.s, a 10 °C, a una velocidad de cizallamiento de 64 s⁻¹. En las realizaciones, la composición tiene un intervalo de viscosidad de 1 a 200 mPa.s, de 1 a 100 mPa.s o de 1 a 60 mPa.s, a 10 °C, a una velocidad de cizallamiento de 64 s⁻¹. En las realizaciones, la composición tiene un intervalo de viscosidad de 10 a 200 mPa.s, de 10 a 100 mPa.s o de 10 a 60 mPa.s, a 10 °C, a una velocidad de cizallamiento de 64 s⁻¹. En las realizaciones, la composición tiene un intervalo de viscosidad de 30 a 200 mPa.s, de 30 a 100 mPa.s o de 30 a 60 mPa.s, a 10 °C, a una velocidad de cizallamiento de 64 s⁻¹.

25 La composición láctea fermentada según las realizaciones de la invención es preferentemente un producto seleccionado de entre el grupo que comprende yogurt, yogurt firme, yogurt batido, yogurt vertible, yogurt bebible, yogurt congelado, kéfir, suero de leche, quark, crema agria, queso fresco y queso. En una realización, la composición según las realizaciones de la invención es una composición bebible, más preferentemente una bebida de leche fermentada, tal como, entre otras, una bebida de yogurt, kéfir, etc. En una realización alternativa, la composición según las realizaciones de la invención es una composición que puede servirse en cucharadas, como un yogurt firme o batido, o un equivalente del mismo.

30 En una realización, la composición láctea fermentada es una composición láctea fermentada colada. La composición láctea fermentada colada preferentemente tiene los siguientes contenidos (% en peso):

- de 8,5 % a 11,0 % de proteína de leche
- de 0,0 % a 8,0 % de grasa, por ejemplo, de 0,0 % a 3,5 % o de 3,5 % a 8,0 %
- de 0,00 % a 4,20 % de lactosa, por ejemplo, de 2,80 % a 4,20 %

El pH de la composición láctea fermentada colada puede ser, por ejemplo, de entre 3,80 y 4,65.

35 Preferentemente, la composición, según las realizaciones de la invención, puede almacenarse, transportarse y/o distribuirse a una temperatura de entre 1 y 10 °C durante al menos alrededor de 30 días, al menos alrededor de 60 días o al menos alrededor de 90 días, desde el empaquetado, y permanecer adecuada para su consumo.

40 En las realizaciones, las composiciones lácteas de la invención comprenden al menos 10⁵ ufc/g, más preferentemente al menos 10⁶ ufc/g, tal como al menos 10⁷ ufc/g, por ejemplo, al menos 10⁸ ufc/g, tal como al menos 10⁹ ufc/g, por ejemplo, al menos 10¹⁰ ufc/g, tal como al menos 10¹¹ ufc/g de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 por gramo de la composición láctea. En las realizaciones, las composiciones de la invención comprenden de 10⁵ a 10¹² o de 10⁶ a 10¹⁰ de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 por gramo de composición.

45 Preferentemente, la composición es un producto empaquetado que comprende al menos 10⁶, más preferentemente al menos 10⁷ y más preferentemente al menos 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC) de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 por gramo (g) de composición según las realizaciones de la invención posteriormente al almacenamiento, transporte y/o distribución a una temperatura de 1 a 10 °C durante al menos alrededor de 30 días, al menos alrededor de 60 días o al menos alrededor de 90 días desde el empaquetado.

50 En las realizaciones, la composición es un producto empaquetado que comprende de 10⁵ a 10¹² o de 10⁶ a 10¹⁰ unidades formadoras de colonias (UFC) de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 por gramo (g) de la composición

según las realizaciones de la invención posteriormente a su almacenamiento, transporte y/o distribución a una temperatura de 1 a 10 °C durante al menos alrededor de 30 días, al menos alrededor de 60 días o al menos alrededor de 90 días desde el empaquetado.

5 En las realizaciones, la composición láctea comprende además una preparación intermedia. Las preparaciones intermedias son conocidas para los expertos en la materia. Típicamente se usan para modificar el sabor, la sensación en boca y/o la textura de una composición láctea, por ejemplo, una composición láctea fermentada. También pueden usarse para introducir algunos aditivos, por ejemplo, nutrientes. Típicamente comprenden agentes endulzantes, saborizantes, modificadores de color, cereales y/o frutas. Las preparaciones intermedias de frutas son, por ejemplo, pastas o preparaciones de frutas. Los saborizantes incluyen, por ejemplo, saborizantes de frutas, saborizantes de vainilla, saborizantes de caramelo, saborizantes de café, saborizantes de chocolate.

10 Las preparaciones de fruta típicamente comprenden frutas, como se usa en esta invención, el término "fruta" se refiere a cualquier forma de fruta, incluyendo, por ejemplo, frutas enteras, piezas, purés, concentrados, jugos de fruta, etc.

15 La preparación o pasta intermedia típicamente comprende un agente estabilizante, que tiene al menos un estabilizante. El agente estabilizante puede comprender al menos dos estabilizantes. Dichos estabilizantes son conocidos para los expertos en la materia. Típicamente, ayudan a evitar la separación de fases de los sólidos, por ejemplo, de frutas o extractos de fruta, y/o a evitar la sinéresis. Típicamente proporcionan cierta viscosidad a la composición, por ejemplo, una viscosidad (viscosidad Bostwick a 20 °C) de entre 1 y 20 cm/min, preferentemente de entre 4 y 12 cm/min.

20 El estabilizante o el sistema de estabilización puede ser, por ejemplo, un almidón, una pectina, una goma guar, xantana, un carragenano o una goma de algarrobo, o una mezcla de las mismas. La cantidad del sistema estabilizante se encuentra típicamente entre el 0,5 y el 5 % en peso.

La preparación intermedia puede comprender típicamente modificadores organolépticos. Dichos ingredientes son conocidos para los expertos en la materia.

Los modificadores organolépticos pueden ser, por ejemplo, agentes endulzantes que no sean azúcar, agentes colorantes, cereales y/o extractos de cereales.

25 Los ejemplos de agentes endulzantes son ingredientes a los que se hace referencia como endulzantes de alta intensidad, como sucralosa, acesulfame K, aspartamo, sacarina.

Los ejemplos de frutas incluyen, por ejemplo, fresa, durazno, albaricoque, mango, manzana, pera, frambuesa, arándano, mora, fruta de la pasión, cereza y mezclas o asociaciones de las mismas, tal como durazno-fruta de la pasión.

30 Las frutas pueden proporcionarse, por ejemplo, como:

- cubos de fruta congelada, por ejemplo, cubos de frutas de 10 mm, por ejemplo, cubos de fruta Quick Frozen individuales, por ejemplo, cubos de fresas, durazno, albaricoque, mango, manzana, pera o mezclas de los mismos,

- cubos asépticos de frutas, por ejemplo, cubos de fruta de 10 mm, por ejemplo, cubos de fresa, durazno, albaricoque, mango, manzana, pera o mezclas de los mismos,

35 - purés de fruta, por ejemplo, purés de fruta concentrados de 2 a 5 veces, preferentemente 3 veces, por ejemplo, purés de frutas asépticas, por ejemplo, fresa, durazno, albaricoque, mango, frambuesa, arándanos o manzana, o mezclas de los mismos,

- purés de fruta única asépticos, por ejemplo, de fresa, frambuesa, durazno, albaricoque, arándano o manzana, o una mezcla de los mismos,

40 - frutas enteras congeladas, por ejemplo, frutas enteras Quick Frozen individuales, por ejemplo, arándanos, frambuesa o moras enteras congeladas, o mezclas de las mismas,

- mezclas de los mismos.

45 Los ingredientes y/o componentes de la preparación intermedia y las cantidades de los mismos pueden ser típicamente tales que la composición tenga un grado brix de 1 a 65 brix, por ejemplo, de 1 a 10 brix, o de 10 a 15 brix, o de 15 a 20 brix, o de 20 a 25 brix, o de 25 a 30 brix, o de 30 a 35 brix, o de 35 a 40 brix, o de 40 a 45 brix, o de 45 a 50 brix, o de 50 a 55 brix, o de 55 a 60 brix, o de 55 a 60 brix o de 60 a 65 brix.

Una preparación de fruta puede comprender, por ejemplo, fruta en una cantidad del 30 % al 80 % en peso, por ejemplo, del 50 al 70 % en peso.

50 La preparación intermedia puede comprender agua. Se menciona que una parte del agua puede venir de los ingredientes usados para preparar la preparación de fruta, por ejemplo, de frutas o extractos de fruta o de una solución de ácido fosfórico.

La preparación de fruta puede comprender agentes de modificación de pH, tal como ácido cítrico. La preparación de fruta puede tener un pH de entre 2,5 y 5, preferentemente de 2,8 a 4,2.

Típicamente, una preparación de fruta puede adicionarse en una cantidad del 5 al 35 % en peso con referencia a la cantidad total de composición. En las realizaciones, la composición de la invención comprende hasta alrededor del 30 % (p/p) de dicha preparación intermedia, por ejemplo, hasta alrededor del 10 %, 15 %, 20 %, 25 % (p/p). En una realización, la composición según las realizaciones de la invención comprende entre un 1 % y un 30 % (p/p) de dicha preparación intermedia. En realizaciones alternativas, la composición según las realizaciones de la invención comprende entre un 1 % y un 25 % (p/p) de dicha preparación intermedia. En realizaciones alternativas adicionales, la composición según las realizaciones de la invención comprende entre un 1 % y un 20 % (p/p) de dicha preparación intermedia. En realizaciones adicionales, la composición según las realizaciones de la invención comprende entre un 1 % y un 15 % (p/p) de dicha preparación intermedia. En incluso otras realizaciones adicionales, la composición según las realizaciones de la invención comprende entre un 1 % y un 10 % (p/p) de dicha preparación intermedia.

Preferentemente, la composición, según las realizaciones de la invención se proporciona en un contenedor sellado o sellable que contiene alrededor de 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 200, 300, 320 o 500 g o alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 12 oz de producto en peso.

En las realizaciones, la composición, según las realizaciones de la invención, se proporciona en un contenedor sellado o sellable que contiene alrededor de 50 a 500 g, de 60 a 500 g, de 70 a 500 g, de 75 a 500 g, de 80 a 500 g, de 85 a 500 g, de 90 a 500 g, de 95 a 500 g, de 100 a 500 g, de 105 a 500 g, de 110 a 500 g, de 115 a 500 g, de 120 a 500 g, de 125 a 500 g, de 130 a 500 g, de 135 a 500 g, de 140 a 500 g, de 145 a 500 g, de 150 a 500 g, de 200 a 500 g, de 300 a 500 g, de 320 a 500 g o 500 g de producto en peso. En las realizaciones, la composición, según las realizaciones de la invención, se proporciona en un contenedor sellado o sellable que contiene alrededor de 1 a 12, 2 a 12, 3 a 12, 4 a 12, 5 a 12, 6 a 12 o 12 onzas de producto en peso.

Composiciones de inóculos

La bacteria, como se describe en esta invención, es útil como cultivo de partida en la preparación de composiciones alimenticias, tal como productos lácteos fermentados. En consecuencia, en una realización, la presente

Invención proporciona un inóculo que comprende *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 que es adecuado para la preparación de productos lácteos fermentados. El inóculo de la invención es adecuado para la inoculación directa de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 en una composición que comprende leche para proporcionar los productos lácteos fermentados de la invención, típicamente sin la necesidad de una etapa de cultivo anterior a dicha inoculación directa.

Típicamente, el inóculo comprende además excipientes o vehículos, cuya selección se encuentra dentro del alcance del experto en la materia, pero puede incluir tampones o medios de cultivo. El inóculo puede comprender adicionalmente componentes adicionales tales como crioprotectores, conservantes y/o aditivos, incluyendo nutrientes tales como extractos de levadura, cisteína, azúcares y vitaminas.

Típicamente, el inóculo es para su uso en la preparación de productos lácteos fermentados, en consecuencia, en una realización, el inóculo de la invención puede proporcionarse a la composición láctea en cantidades de hasta alrededor de 500 mg/l.

Típicamente, el inóculo está fresco, congelado, seco o liofilizado. El inóculo puede estar en forma líquida, seca, secada por aspersión o sólida. Se prefiere particularmente que el inóculo se encuentre en forma líquida. El inóculo puede descongelarse y/o dispersarse en líquido (por ejemplo, en agua) antes de la inoculación en una composición que comprende leche.

En las realizaciones, el inóculo comprende al menos 10^9 ufc, por ejemplo, al menos 10^{10} ufc, tal como al menos 10^{11} ufc de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 por gramo de la composición del inóculo. En las realizaciones, el inóculo comprende de 10^9 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (UFC), o más preferentemente de 10^{10} a 10^{12} unidades formadoras de colonias (UFC) de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 por gramo de inóculo.

Típicamente, el inóculo que comprende *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 es sustancialmente puro.

En una realización adicional, la presente invención proporciona una mezcla o kit de partes del inóculo de la invención junto con el inóculo de *Bifidobacterium* y/o bacterias de ácido láctico.

Los ejemplos de *Bifidobacterium* que pueden usarse incluyen, entre otras, *Bifidobacterium animalis* (por ejemplo, *Bifidobacterium animalis* subesp. *animalis* o *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*. Los ejemplos de bacterias de ácido láctico que pueden usarse incluyen, entre otras, *Lactobacilli* (por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus delbrueckii*, en particular, *L. delbrueckii* subesp. *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 subesp. lactis o *Lactococcus lactis subesp. cremoris*). Preferentemente, la mezcla del inóculo comprende además *Lactobacillus* y/o *Streptococcus*. Para la preparación de yogurt, la mezcla del inóculo típicamente comprende *Lactobacillus bulgaricus* (a la que también se hace referencia como *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus*) y *Streptococcus thermophilus*, opcionalmente con microorganismos adicionales, tales como especies probióticas u otras especies, entre otras, que pueden proporcionar cualidades organolépticas deseables o de otro tipo a la composición, por ejemplo, *cepas adicionales de Lactococcus lactis*.

En consecuencia, en una realización, la presente invención proporciona una mezcla de inóculo que comprende un inóculo de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 y comprende además al menos un inóculo de *Lactobacillus bulgaricus*, al menos un inóculo de *Streptococcus thermophilus* y opcionalmente uno o más inóculos de *Lactococcus lactis* y/o *Bifidobacterium*.

Procedimientos para la preparación de productos lácteos fermentados

La bacteria, como se proporciona en esta invención, es adecuada para su uso en la preparación de productos lácteos fermentados. En consecuencia, en un tercer aspecto, la presente invención también se refiere al uso pretendido de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 para la preparación de una composición alimenticia.

La presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de un producto lácteo fermentado que comprende inocular una composición a base de leche con *L. rhamnosus* CNCM I-4993 y fermentarla.

En consecuencia, en una realización, la presente invención proporciona un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

i) proporcionar una mezcla que comprende:

a) leche

b) *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993

ii) la fermentación de dicha mezcla a fin de proporcionar un producto lácteo fermentado.

Preferentemente, los productos lácteos fermentados se preparan usando leche que ha estado sujeta a un tratamiento con calor al menos equivalente a la pasteurización. Preferentemente, dicho tratamiento con calor se efectúa antes de la preparación de la composición.

Típicamente, la leche se pasteuriza mediante las siguientes etapas sucesivas:

1) estandarización de sustancias grasas de la materia prima a fin de obtener una sustancia estandarizada,

2) enriquecimiento con materia seca de la sustancia estandarizada obtenida en la etapa anterior, a fin de obtener una sustancia enriquecida,

3) precalentamiento de la sustancia enriquecida obtenida en la etapa anterior, a fin de obtener una sustancia de partida,

4) pasteurización y mantenimiento de la sustancia de partida obtenida en la etapa anterior, a fin de obtener una sustancia pasteurizada y mantenida,

5) una etapa opcional de homogeneización de la sustancia pasteurizada y mantenida obtenida en la etapa anterior, a fin de obtener una sustancia pasteurizada, mantenida y opcionalmente homogeneizada,

6) enfriamiento inicial de la sustancia pasteurizada, mantenida y opcionalmente homogeneizada obtenida en la etapa anterior, a fin de obtener una sustancia de partida pasteurizada que ha sido mantenida, opcionalmente homogeneizada y enfriada.

Como se usa en esta invención, "estandarización de sustancias grasas" se interpreta como una etapa de traer la cantidad de grasas presentes en la sustancia de partida a un nivel predeterminado. El enriquecimiento con materia seca involucra la adición de proteínas y sustancia grasa a fin de modificar la firmeza de la cuajada.

Como se usa en esta invención, "mantenimiento" se interpreta como un calentamiento rápido y mantenimiento de la temperatura de la leche que hace posible destruir la flora microbiana vegetativa, incluyendo las formas patógenas. Su duración típica es de 4 a 10 minutos, en particular de 5 a 8 minutos y, en particular, de aproximadamente 6 minutos.

Como se usa en esta invención, "homogeneización" se interpreta como la dispersión de las sustancias grasas en la sustancia tipo leche en pequeños glóbulos de grasa. La homogeneización se efectúa, por ejemplo, a una presión de 100 a 280 bares, en particular de 100 a 250 bares, en particular, de 100 a 200 bares, en particular, aproximadamente 200 bares. Esta etapa de homogeneización es puramente opcional. La misma se encuentra ausente, en particular, en el procedimiento de producción de productos con sustancias 0 % grasas.

Típicamente, un producto lácteo fermentado se prepara mediante un cultivo de leches a una temperatura adecuada con microorganismos adecuados, a fin de proporcionar una reducción en el pH, preferentemente a un pH igual o inferior a 5, preferentemente entre alrededor de 3 y 4,7; más preferentemente entre 3,5 y alrededor de 4,7. El pH se puede ajustar controlando la fermentación por el microorganismo y deteniéndola cuando sea adecuado, por ejemplo, mediante enfriamiento.

Según una realización adicional del procedimiento para la preparación de un producto lácteo fermentado, como se definió anteriormente, la mezcla que comprende leche y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4993 comprende además al menos una, dos, tres, o más cepas de *Bifidobacterium* y/o bacterias de ácido láctico. La selección de cepas de *Bifidobacterium* adecuadas está dentro del alcance del experto en la materia y es típicamente una bacteria de ácido láctico probiótica. Los ejemplos de *Bifidobacterium* que pueden usarse incluyen, entre otras, *Bifidobacterium animalis* (por ejemplo, *Bifidobacterium animalis* subesp. *animalis* o *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis*); *Bifidobacterium longum*; *Bifidobacterium breve*; *Bifidobacterium bifidum*.

La selección de cepas de bacterias de ácido láctico adecuadas está dentro del alcance del experto en la materia y es típicamente una bacteria de ácido láctico termofílica. Los ejemplos de bacterias de ácido láctico que pueden usarse incluyen, entre otros, *Lactobacilli* (por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus delbrueckii*, en particular, *L. delbrueckii* subesp. *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* subesp. *lactis* o *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*). Típicamente, se puede usar 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 yogurt, esta típicamente incluye *Lactobacillus bulgaricus* (a la que también se hace referencia como *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*) y *Lactobacillus rhamnosus*, opcionalmente con microorganismos adicionales, tales como especies probióticas u otras especies, entre otras, que pueden proporcionar cualidades organolépticas deseables o de otro tipo a la composición, por ejemplo, *Lactococcus lactis*.

En consecuencia, en una realización, la mezcla comprende además al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus*, al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* y opcionalmente una o más cepas de *Lactococcus lactis* y/o *Bifidobacterium*.

Las temperaturas adecuadas para la fermentación de leche son típicamente de alrededor de 36 a 44 °C y la temperatura se mantiene durante un tiempo de incubación suficiente para proporcionar la reducción deseada en el pH. Para la preparación de un producto lácteo fermentado, la temperatura al inicio de la fermentación es típicamente de alrededor de 36 a 43 °C, en particular de alrededor de 37 a alrededor de 40 °C, la temperatura al final de la fermentación es típicamente de alrededor de 37 a alrededor de 44 °C, en particular de alrededor de 38 a alrededor de 41 °C. El tiempo de fermentación es típicamente de alrededor de 6 a alrededor de 11 horas.

Posteriormente a la fermentación, la leche fermentada se enfría. Opcionalmente, puede efectuarse una etapa de enfriamiento intermedio de la leche fermentada, a fin de proporcionar una leche fermentada previamente enfriada con una temperatura de entre alrededor de 22 y alrededor de 4 °C. Típicamente, el tiempo de enfriamiento intermedio es de alrededor de 1 hora hasta alrededor de 4 horas, en particular, de alrededor de 1 hora y 30 minutos a alrededor de 2 horas. La leche fermentada previamente enfriada se almacena típicamente hasta 40 horas o menos.

Preferentemente, una etapa de enfriamiento final de la leche fermentada se efectúa de manera tal que la temperatura al inicio del enfriamiento final sea inferior a 22 °C y la temperatura al final del enfriamiento final sea de alrededor de 4 a 10 °C. El producto enfriado, a continuación, se puede almacenar, transportar y/o distribuir a una temperatura de alrededor de 1 a 10 °C durante al menos alrededor de 30 días, al menos alrededor de 60 días o al menos alrededor de 90 días.

Según una realización adicional, el procedimiento para la preparación de un producto lácteo fermentado, como se definió anteriormente, comprende opcionalmente una etapa de agitar a una presión de al menos 20 bares, o efectuar una suavización dinámica, a fin de obtener una composición que tenga la viscosidad deseada, típicamente una viscosidad de hasta 20 mPa.s. Las operaciones de agitación o suavización dinámica proporcionan cierto cizallamiento a la composición, lo que típicamente permite una caída en la viscosidad. Dichas operaciones son conocidas para el experto en la materia y pueden efectuarse con equipos adecuados convencionales. Esta etapa se efectúa típicamente a una temperatura fría, por ejemplo, a una temperatura de 1 a 20 °C. Sin intención de estar sujeto a ninguna teoría, se cree que aplicar cierto cizallamiento a una temperatura fría, típicamente mediante la agitación a alta presión o efectuando una suavización dinámica, puede llevar a una formación de gel fluido dentro de la composición, que proporciona estabilidad mejorada incluso a una baja viscosidad de hasta 20 mPa.s.

De manera alternativa, según una realización adicional, el procedimiento para la preparación de un producto lácteo fermentado, como se definió anteriormente, comprende opcionalmente una etapa de eliminación de suero ácido a fin de proporcionar una "composición láctea fermentada colada". En esta etapa, una composición de suero ácido se separa de la cuajada que resulta de la coagulación de la proteína debido a la acidificación durante la fermentación. Por consiguiente, uno obtiene:

- un producto lácteo fermentado, que típicamente comprende el coágulo de proteínas, al que se hace referencia como una composición láctea fermentada colada, y
- un subproducto de suero ácido

5 Dichas etapas de separación son conocidos para el experto en la materia, por ejemplo, en procedimientos para hacer "yogures griegos". La separación se puede efectuar, por ejemplo, mediante ósmosis inversa, ultrafiltración o separación centrífuga. La etapa de separación puede efectuarse, por ejemplo, a una temperatura de desde 30 a 45 °C.

Según una realización adicional, el procedimiento para la preparación de un producto lácteo fermentado, como se definió anteriormente, comprende opcionalmente una etapa de adición de una preparación intermedia, como se describió antes, la cual se efectúa antes o después de la fermentación, comprendiendo típicamente dicha preparación intermedia una preparación de frutas y/o cereales y/o aditivos tales como saborizantes y/o colorantes.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes Figuras y Ejemplos no limitantes.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los niveles de acetoina y diacetilo en partes por millón (PPM) producidos por 20 cepas bacterianas probadas según el Ejemplo 1.

15 La Figura 2 muestra el perfil sensorial global de los productos de prueba y de control evaluado por el consumidor según el Ejemplo 3. Cada característica sensorial se evalúa en una escala de 1 a 5, y el gráfico muestra el promedio de los 11 probadores: A = notas lácteas, B = dulzor, C = acidez, D = espesor en boca, E = espesor en cuchara. El gráfico gris oscuro representa el producto de control, el gráfico gris claro representa el producto de prueba.

20 La Figura 3 muestra el perfil de sabor de notas lácteas de los productos de prueba y de control evaluado por el consumidor según el Ejemplo 3. El eje X muestra la frecuencia de identificación de una característica de nota láctea especificada en los 11 probadores. Las notas lácteas se proporcionan en el eje Y: A = lechoso, B = acidez de yogurt, C = cremoso, D = caseoso, E = mantecoso. Las barras gris oscuro representan el producto de control, las barras gris claro representan el producto de prueba.

25 La Figura 4 muestra la cinética de acidificación de leche de los productos de control y de prueba preparados según el Ejemplo 3. El tiempo en horas se proporciona en el eje X, el pH se representa en el eje Y. El gráfico gris oscuro representa el producto de prueba, el gráfico gris claro representa el producto de prueba.

La Figura 5 muestra la cinética de acidificación de leche del Lote 1, efectuada según el Ejemplo 2. El tiempo en minutos se proporciona en el eje X, el pH se representa en el eje Y.

EJEMPLOS

30 Ejemplo 1: Selección de cepas

Un total de 65 cepas de *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium* se cribaron para la producción de acetoina y diacetilo. Las cepas incluían 37 *Bifidobacterium*, 3 *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* y 25 *Lactobacillus* (4 *L. delbrueckii*, 1 *L. helveticus*, 1 *L. amylovorus*, 3 *L. johnsonii*, 6 *L. paracasei*, 8 *L. rhamnosus* y 2 *L. plantarum*).

35 La leche reconstituida se preparó mezclando 110 g de polvo de leche desnatada (Aria) por litro de agua permutada y pasteurizada a 95 °C durante 45 minutos. Cada cepa creció en leche durante 16 horas a 37 °C y la producción de acetoina y diacetilo se analizó mediante una cromatografía de gases con sistema de espacio de cabeza usando un Autosystem XL GC equipado con un detector de ionización de llama (Perkin Elmer,

Waltham, EE.UU.). La concentración de acetoina y diacetilo (ppm) en las muestras se determinó usando factores de respuesta que venían de los estándares.

40 De las 65 cepas probadas, solo 20 pudieron producir al menos 6 ppm de acetoina.

Los resultados para estas 20 cepas se proporcionan en la Figura 1. Como se puede ver, la cepa de la invención fue la mejor productora tanto de acetoina como de diacetilo. La cantidad combinada de acetoina y diacetilo producida fue más de dos veces la cantidad de la siguiente mejor cepa.

Ejemplo 2: Fermentación de la leche

45 La leche reconstituida se preparó mezclando 112 g de polvo de leche desnatada (Aria) por litro

de agua permutada y pasteurizada a 99 °C durante 30 minutos. Las cepas de bacteria se proporcionaron en la forma de pastillas congeladas, la *L. rhamnosus* CNCM I-4993 fue suministrada por Danone. Las cepas se inocularon en leche reconstituida después de la descongelación. La fermentación se efectuó a 37 °C y se monitoreó usando una sonda de pH. La *L. rhamnosus* CNCM I-4993 se probó en 2 lotes, consistiendo cada lote en 3 pruebas individuales a varias velocidades de inoculación.

Resultados

	Fase de latencia (minutos)	pH a la máxima velocidad de acidificación	Tiempo para un pH 4,5 (minutos)
<u>Lote 1 Prueba 1</u> Inoculación 0,01 % volumen	445	5,61	1948
<u>Lote 1 Prueba 2</u> Inoculación 0,02 % volumen	353	5,59	1652
<u>Lote 1 Prueba 3</u> Inoculación 0,01 % volumen	443	5,54	1852
<u>Lote 2 Prueba 1</u> Inoculación 0,01 % volumen	416	5,90	988
<u>Lote 2 Prueba 2</u> Inoculación 0,02 % volumen	328	5,80	940
<u>Lote 2 Prueba 3</u> Inoculación 0,01 % volumen	428	5,46	1632

Las curvas de acidificación del Lote 1 se proporcionan en la Figura 5.

Ejemplo 3: Preparación del producto de leche fermentada y evaluación sensorial.

5 Se preparó un producto de leche fermentada mediante la fermentación de una base de leche pasteurizada (6,64 % de polvo de leche desnatada; 93,06 % de leche; 0,3 % de concentrado de proteína de suero) con un cultivo de partida de yogurt estándar (*L. delbrueckii*, *S. thermophilus* y extracto de levadura) como producto de control. El fermento del producto de control fue suplementado con *L. rhamnosus* CNCM I-4993 para preparar un producto de prueba mediante la fermentación de dicha base de leche. La cinética de fermentación se proporciona en la Figura 4, como se puede ver, el producto de prueba tuvo una velocidad inicial de acidificación más alta.

La evaluación sensorial fue efectuada por 11 probadores que evaluaron las notas lácteas del perfil de sabor y el perfil sensorial global de los productos de prueba y de control. Los probadores evaluaron las notas lácteas de las características organolépticas (A), el dulzor (B), la acidez (C), el espesor en boca (D) y el espesor en la cuchara (E) en una escala del 1 al 5. Los valores promedio para todas las características se usaron para generar puntuaciones de valores promedio para cada característica, estos resultados se proporcionan en la Figura 2. La Figura 3 muestra la frecuencia de identificación de las características a través del panel. Estos resultados demuestran que el producto de prueba era más espeso en la cuchara y en la boca. La adición de la cepa de la invención también cambió el perfil de sabor del producto lácteo fermentado, proporcionando un producto que era claramente más cremoso, caseoso y mantecoso, pero que también era percibido como menos lechoso, mientras que proporcionaba un buen nivel de acidez que se considera estándar en los productos de leche fermentada, tales como el yogurt.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* depositada en la CNCM bajo el número de referencia I-4993.
2. Una composición que comprende al menos 10^5 UFC/g de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de la reivindicación 1.
- 5 3. Una composición según la reivindicación 2, en la que dicha composición es un producto lácteo.
4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es una composición fermentada.
5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos una, dos, tres o más cepas de *Bifidobacterium* o bacterias de ácido láctico.
- 10 6. Una composición según la reivindicación 2, en la que dicha composición es un inóculo.
7. Una composición según las reivindicaciones 5 o 6, en la que dicha composición es fresca, está congelada, seca o ha sido liofilizada.
8. Un procedimiento para la preparación de un producto lácteo fermentado que comprende
 - i) proporcionar una mezcla que comprende:
 - 15 a) leche
 - b) *L. rhamnosus* CNCM I-4993
 - ii) la fermentación de dicha mezcla a fin de proporcionar un producto lácteo fermentado.
9. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el que la mezcla comprende al menos una, dos, tres o más cepas de *Bifidobacterium* o bacterias de ácido láctico.
- 20 10. Una composición según la reivindicación 5 o un procedimiento según la reivindicación 9, en la que dichas cepas comprenden al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* y al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus*.
11. Una composición o procedimiento según la reivindicación 10 que comprende además una o más cepas seleccionadas de entre el grupo que consiste en *Lactococcus lactis* y/o *Bifidobacterium*.

25

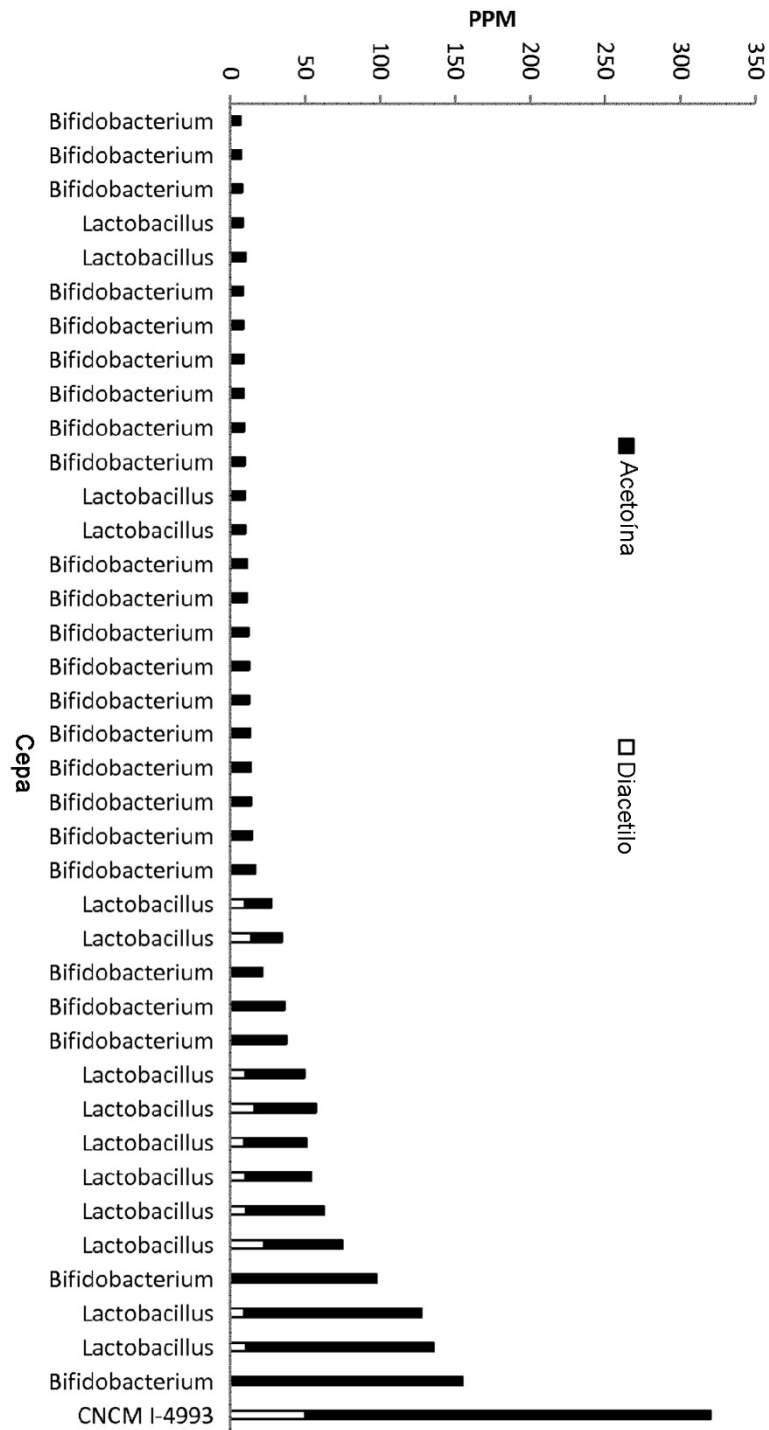


FIGURA 1

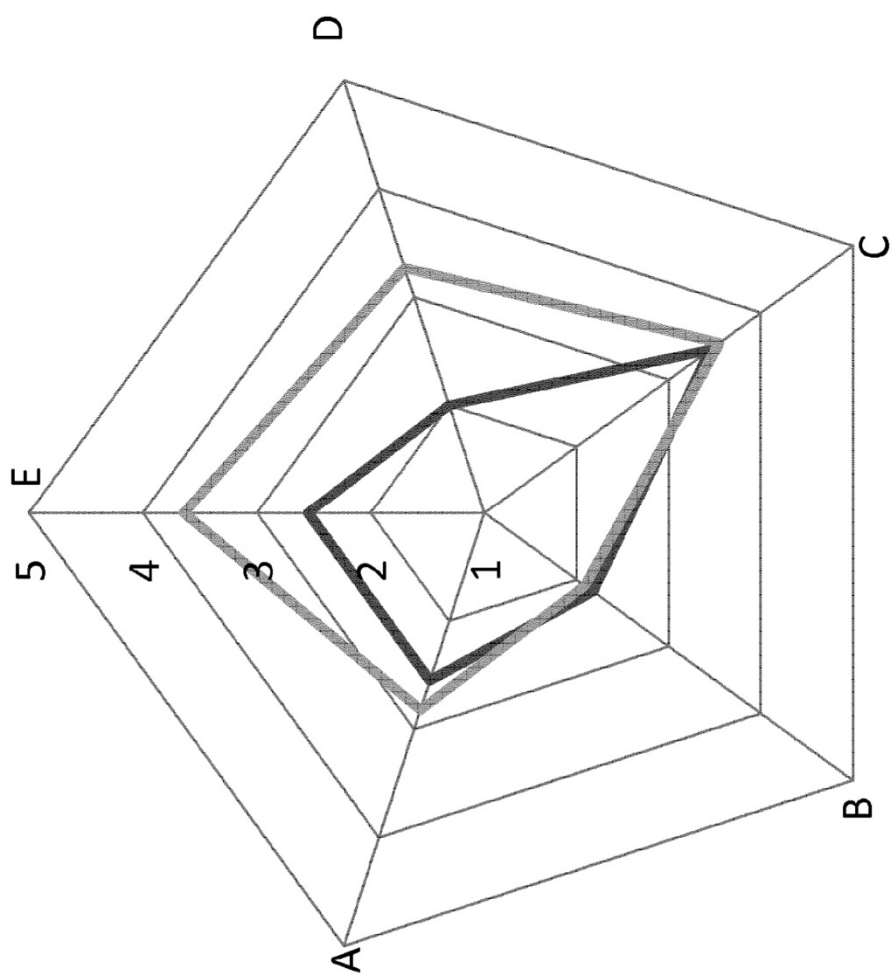


FIGURA 2

Figura 3

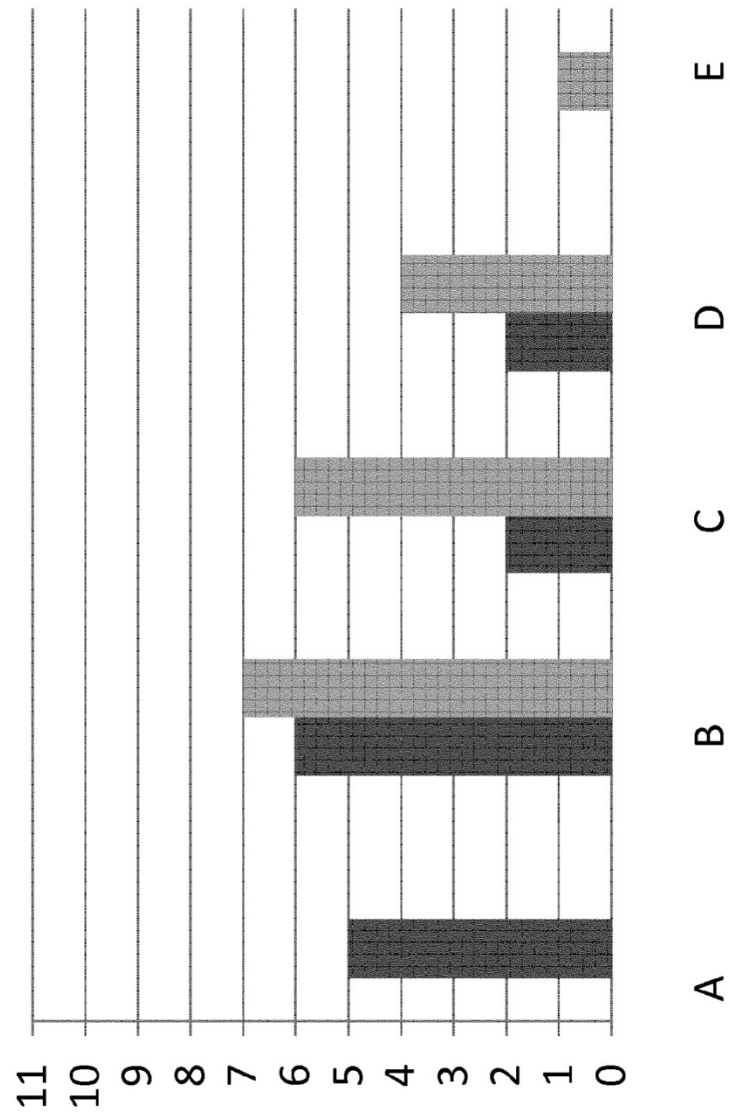


Figura 4

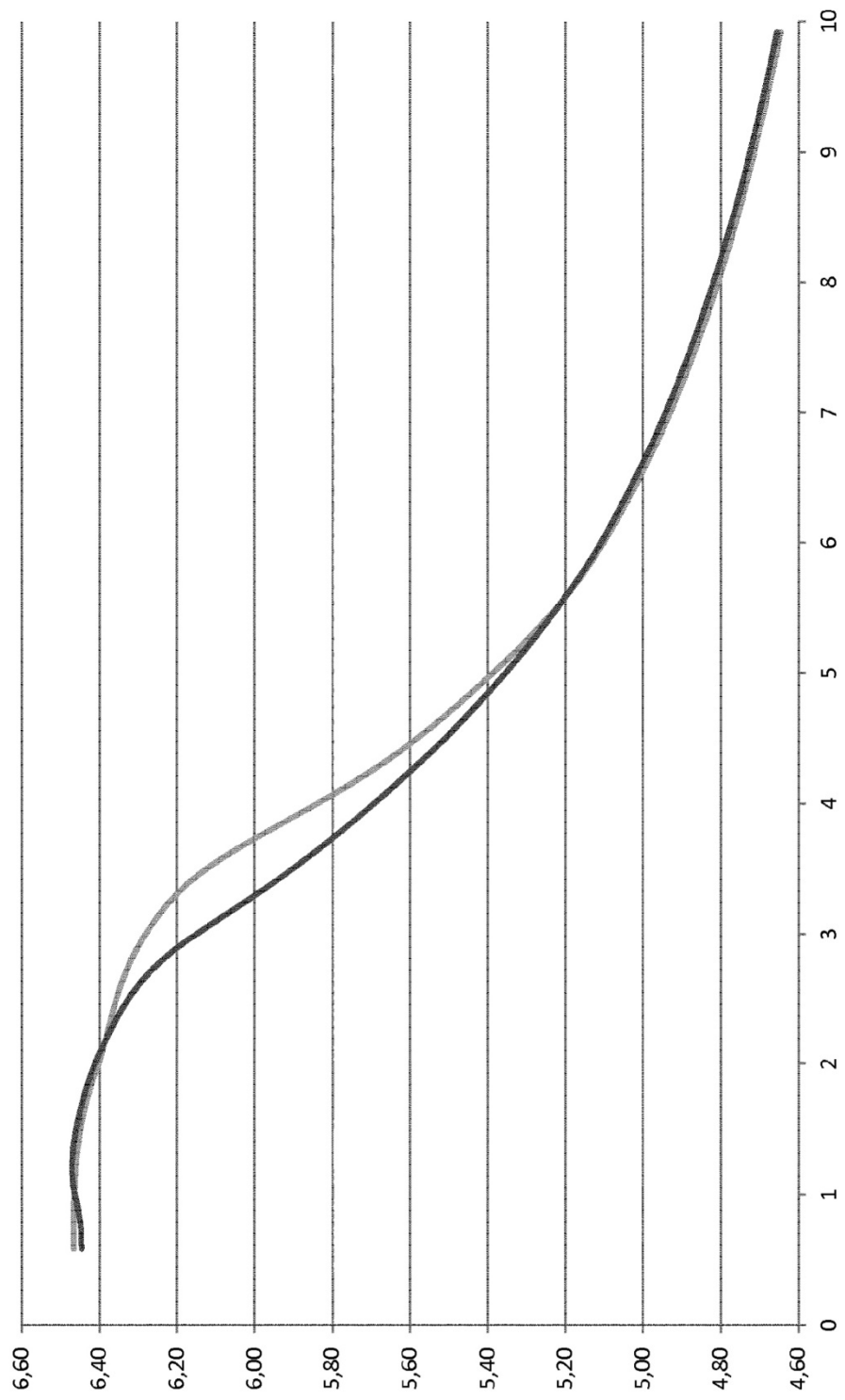


FIGURA 5

