

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 978**

51 Int. Cl.:

A23L 2/02 (2006.01)

A23L 2/52 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2012 PCT/EP2012/050930**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012 WO12098254**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2012 E 12700706 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 2665378**

54 Título: **Probióticos en bebidas de frutas**

30 Prioridad:

21.01.2011 EP 11151624
15.03.2011 EP 11158249

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.03.2021

73 Titular/es:

CHR. HANSEN A/S (100.0%)
Bøge Allé 10-12
2970 Hørsholm, DK

72 Inventor/es:

HORNBAEK, TINA;
GOTTLIEB, CAROLINE, TREBBIEN;
THORSEN, TINA, MALLING y
SOMMER, PETER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 811 978 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

Probióticos en bebidas de frutas

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 [0001] La invención presente se relaciona con un método para preparar una bebida de fruta conteniendo una alta cantidad de probióticos vivos. La presente invención además se relaciona con una bebida de fruta probiótica obtenida por dicho método y el uso de bacterias probióticas adaptadas a ácido para la preparación de una bebida de fruta probiótica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 [0002] Se sabe que algunas bacterias tienen propiedades probióticas, es decir, tienen un efecto beneficioso para la salud del huésped cuando se ingieren en cantidades viables adecuadas. En particular, las cepas bacterianas pertenecientes a los géneros Lactobacillus y Bifidobacterium han sido objeto de muchos estudios que demuestran efectos clínicos preventivos en diversos campos y en ciertas funciones fisiológicas. Estos probióticos son generalmente seguros y notablemente capaces de promover el funcionamiento adecuado de la flora intestinal. Además de evidencia clara de que tiene efectos positivos en la salud del consumidor, para que una bacteria cumpla con la definición de probióticos, debe ser capaz de sobrevivir y colonizar los intestinos y sobrevivir a los duros procesos de producción y almacenamiento de los alimentos. La evidencia clínica indica que la dosis diaria de bacterias probióticas debe ser de al menos 10⁹ UFC para garantizar la eficacia de los probióticos.

- 20 [0003] El mercado de productos probióticos continúa creciendo. Los probióticos se han implementado especialmente en productos lácteos en los que las bacterias del ácido láctico están relativamente bien adaptadas al medio. Ahora los zumos de naranja, así como otros tipos de zumos de frutas y bebidas que contienen puré de frutas y zumos de frutas, se han identificado como vehículos importantes de los cultivos probióticos que tienen los beneficios de las frutas y los probióticos.

- 25 [0004] Además, las bebidas de frutas, que no contienen componentes lácteos, son excelentes formas de administración de probióticos hipoalergénicos, como L. casei 431® (Chr. Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

- 30 [0005] Sin embargo, el ambiente bastante ácido de los jugos de frutas causa una gran reducción inicial del recuento celular cuando se agrega un volumen de probióticos de referencia, a por ejemplo un zumo de naranja. Para una aplicación exitosa de cultivos probióticos en bebidas de frutas, se deben asegurar concentraciones apropiadas de células probióticas durante la vida útil. Por lo tanto, aumentar la supervivencia de los cultivos probióticos en el jugo de naranja y otras bebidas de frutas se considera muy crítico.

- [0006] Los métodos para producir una bebida de fruta que contiene cantidades eficientes de Lactobacilos vivos son conocidos en la técnica, como en la patente europea EP 0113055, que se relaciona con un método que comprende poner un jugo de fruta en contacto con un agente sólido para eliminar los componentes bacteriostáticos y luego proliferar lactobacillus en el jugo de fruta a un pH de 4.0 o inferior.

- 35 [0007] Sin embargo, en tales bebidas de frutas es posible observar el crecimiento y/o actividad bacteriana que induce una producción de gas y sabor desagradable que los hace inadecuados para el consumo. La solicitud de patente de EE. UU. US 2005/0220964 describe un proceso para producir una bebida láctea que comprende una mezcla estática en línea de yogur con una preparación de fruta. US 2010/0086646 se relaciona con jugo de plantas frescas y/o productos alimenticios a base de leche que comprenden probióticos vivos y un monoácido débil protonado dietético con un pH entre 3 y 4, este último evitó que los probióticos produjeran un sabor falso y/o gas en el producto alimenticio.

- 40 [0008] La solicitud de patente PCT WO 2010/132017 está dirigido a una bebida de jugo de fruta probiótica que comprende al menos una cepa de bacterias probióticas y al menos un reductor de formación de gases elegido entre acerola, granada, arándano, arqnia, grosella negra, bayas de espinillo amarillo o bayas de saúco. Sheehan et al., describe métodos para evaluar la tolerancia al ácido de cepas de Lactobacillus y Bifidobacterium en jugos de frutas, revelando diferencias extensas entre las diferentes cepas.

- 45 [0009] La adición de monoácidos puede afectar las propiedades organolépticas del producto alimenticio y también se ha visto que afecta negativamente la tasa de supervivencia de las bacterias probióticas. La adición de reductores de la formación de ácido también parece afectar negativamente la tasa de supervivencia de las bacterias probióticas. La adición de agentes para la eliminación de compuestos bacteriostáticos y/o para reducir el sabor falso y/o el gas en el producto alimenticio puede resultar además costosa.

- 50 [0010] Por lo tanto, sigue siendo necesario dentro del campo técnico proporcionar métodos alternativos para producir bebidas de frutas probióticas con un alto valor de probióticos, en donde la bebida de frutas probióticas exhibe un buen sabor sin sabor desagradable y producción de gas, y en donde la bebida de frutas probióticas tiene una larga vida útil. Especialmente, existe la necesidad de métodos que no impliquen la adición de agentes sólidos, monoácidos u otros

compuestos que puedan afectar las cualidades organolépticas de la bebida de fruta.

[0011] La presente invención propone un método alternativo para producir una bebida de fruta que comprende bacterias probióticas que se han adaptado al ácido antes de la inoculación en la bebida de fruta.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 [0012] Un objeto de la presente invención es proporcionar una bebida de fruta probiótica que contenga bacterias probióticas robustas capaces de sobrevivir al ambiente ácido de la bebida de fruta. Es otro objeto de la presente invención proporcionar una bebida de fruta probiótica con un buen sabor. Otro objeto de la presente invención es proporcionar una bebida de fruta probiótica de este tipo que tenga una larga vida útil.

10 [0013] Con el fin de obtener una alta UFC/ml de bacterias probióticas en las bebidas de frutas sin la adición de cantidades excesivas de bacterias probióticas, los inventores de la presente invención han estado trabajando para mejorar la tolerancia al ácido de las bacterias probióticas, haciendo que las bacterias probióticas sean robustas frente a un pH bajo.

15 [0014] La presente invención se basa en el hallazgo de que las bacterias probióticas pueden adaptarse al ácido por propagación sin estabilización del pH durante un cierto período de tiempo sin afectar significativamente el rendimiento resultante en la fermentación.

[0015] Las bacterias probióticas adaptadas al ácido son extremadamente útiles como composiciones probióticas para la adición a bebidas de frutas con un pH bajo (por debajo de 4.2). Combina todas las capacidades beneficiosas de las bacterias probióticas con el alto valor nutricional de las frutas.

20 [0016] El método de la presente invención no implica la adición a la bebida de frutas de compuestos químicos que podrían afectar las cualidades organolépticas de la bebida de frutas probióticas.

[0017] Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una bebida de fruta probiótica, comprendiendo dicho método:

(a) adaptar al ácido al menos una cepa de bacterias probióticas durante la propagación que comprende

25 (i) propagar la al menos una cepa de bacterias probióticas sin estabilización del pH a una temperatura en el intervalo de 25°C a 43°C, en un medio adecuado que tenga un pH inicial de entre 6.0 y 7.0, teniendo dicho medio una composición permitiendo que dicho medio alcance un pH de entre 5.0 y 4.0;

(ii) recolectar al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido;

(iii) concentrar la al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido; y

(iv) opcionalmente congelar o liofilizar la al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido;

30 (b) inocular una bebida de fruta con al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido de la etapa (a); y

(c) opcionalmente envasar la bebida de fruta probiótica.

35 [0018] En una realización preferida, dicho medio en la etapa (i) tiene una composición que permite que dicho medio alcance un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 4,0 después de al menos 8 horas de propagación.

[0019] Un segundo aspecto se refiere a una bebida de fruta probiótica obtenible por el método según el primer aspecto. La invención también relaciona los métodos anteriores con una bebida de fruta probiótica que comprende la cepa *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL431 (*L. casei* 431®).

40 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0020]

La Figura 1 ilustra la acidificación del medio MRS (Difco) por *L. casei* 431®. Las células adaptadas al ácido se cosecharon a pH 5.0, pH 4.5 y pH 4.0 por centrifugación.

La Figura 2 muestra los recuentos celulares de *L. casei* 431® durante la producción a gran escala.

45 La Figura 3 ilustra los recuentos celulares de *L. casei* 431® cuando se agrega a un jugo de fresa /plátano para no adaptado (diamante), alternativamente adaptado a pH 4.0 (triángulo) o pH 5.0 (cuadrado) durante la producción y

luego se agrega en baja (5×10^7 UFC/ml, símbolos cerrados) o alto (1×10^8 UFC/ml, símbolos abiertos) concentraciones.

La Figura 4 muestra los recuentos celulares de *L. casei* 431® cuando se agrega a un jugo tropical para no adaptado (diamante), alternativamente adaptado a pH 4.0 (triángulo) o pH 5.0 (cuadrado) durante la producción y luego se agrega en baja (5×10^7 UFC/ml, símbolos cerrados) o alto (1×10^8 UFC/ml, símbolos abiertos) concentraciones.

5 La Figura 5 muestra los recuentos de células de *L. casei* 431® cuando se agrega a un jugo de fruta roja para no adaptado (diamante), alternativamente adaptado a pH 4.0 (triángulo) o pH 5.0 (cuadrado) durante la producción y luego se agrega bajo (5×10^7 UFC/ml, símbolos cerrados) o alto (1×10^8 UFC/ml, símbolos abiertos) concentraciones.

10 La Figura 6 ilustra los recuentos celulares de *L. casei* 431® cuando se agrega a un jugo de naranja 100% para no adaptado (control), se adapta a pH 4.0, 4.5 o 5.0 durante la producción y luego se agrega en concentraciones de 1.5×10^8 UFC/ml.

La Figura 7 muestra los recuentos celulares de *L. casei* 431® no adaptado (control) y adaptado a pH 4.0, 4.5 o 5.0 durante la producción y luego se almacena como gránulos congelados a -50 °C, y se prueba regularmente la viabilidad en el cultivo descongelado por vertido en placa.

15 La Figura 8 ilustra el recuento celular de *L. casei* 431® no adaptado (control) o adaptado a pH 4.0 durante la producción, almacenado como gránulos congelados a -50 °C durante 6 meses y luego agregado al jugo de naranja almacenado a 8 °C durante período de tiempo indicado en el eje x.

La Figura 9 muestra los recuentos de células de *L. casei* 431® cuando se agrega al jugo de naranja para las células no adaptadas (cuadrado), alternativamente las células adaptadas a pH 4.0 (triángulo) durante la producción y luego se almacenan a 8 °C.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

25 **[0021]** En el presente contexto, el término "jugo de fruta" se refiere al líquido naturalmente contenido en la fruta preparada exprimiendo o macerando mecánicamente frutas frescas sin la presencia de calor y solventes. El "jugo de fruta" puede consistir en jugo de un tipo de fruta o una mezcla de más de un tipo de fruta.

[0022] El término "bebida de fruta" en el presente contexto se refiere a una bebida que tiene un contenido de jugo de fruta de entre 0 y 29%.

[0023] El término "néctar" en el presente contexto se refiere a una bebida que tiene un contenido de jugo de fruta de entre 30 y 99% de jugo de fruta.

30 **[0024]** En el presente contexto, el término "puré" se refiere a frutas preparadas por molido, prensado y/o colado en la consistencia de un líquido espeso o una pasta blanda sin la presencia de calor y solventes. El "puré" está hecho de 100% de fruta en lugar de estar hecho solo con el jugo de la fruta.

35 **[0025]** En el presente contexto, el término "bebida de fruta" se refiere a una bebida que comprende zumo de fruta, concentrado de fruta y / o puré de fruta. El término "bebida de fruta" cubre "jugo de fruta", "bebida de fruta" y "néctar" como se define en el presente documento. La "bebida de fruta" puede ser una que contiene pulpa, o una de la que se ha eliminado la pulpa mediante una operación tal como centrifugación. Las bebidas de frutas pueden contener además, por ejemplo avena, soja, almendras, suero y/o leche no fermentada, por ejemplo en forma de leche en polvo. En una realización particularmente preferida, las bebidas de frutas de la invención no contienen componentes lácteos, como la leche.

40 **[0026]** En el presente contexto, el término (bacteria) "adaptada al ácido" se refiere a bacterias vivas que se hacen tolerantes a pH bajo por exposición gradual a niveles de pH descendentes durante el cultivo. En consecuencia, el proceso de adaptación al ácido de cepas bacterianas probióticas generalmente incluye el cultivo de estas cepas en presencia de niveles de pH gradualmente decrecientes, por ejemplo hasta que se alcanza un pH de entre 4.0 y 5.0. Preferiblemente, las bacterias probióticas que se someten a la adaptación ácida producen ácido durante su propagación que se acumula en el medio. Más preferiblemente, las bacterias probióticas productoras de ácido pertenecen al grupo de bacterias de ácido láctico. Alternativamente, cuando las bacterias probióticas que están sujetas a la adaptación al ácido no producen ácido de forma natural, también se puede reducir el pH mediante la adición externa de un ácido.

50 **[0027]** El proceso de adaptación al ácido se realiza preferiblemente propagando las bacterias probióticas en un medio sin estabilización del pH. La expresión "sin estabilización del pH" significa que no se toman medidas para contrarrestar la disminución gradual del pH. Por ejemplo, en una realización, el medio que se inocula con las bacterias probióticas normalmente no contiene agentes tamponantes que podrían mantener el pH estable tras la formación o adición de ácido. Alternativamente, cuando el medio de partida contiene una cierta concentración de agentes tamponantes, el

cultivo puede continuarse hasta que se agote la capacidad del agente tamponador, y no se agreguen agentes tamponantes adicionales durante el cultivo. En particular, no se agregan compuestos básicos durante el cultivo para neutralizar el pH decreciente.

5 [0028] Por "mal sabor" se entiende un sabor anormal del producto alimenticio. El sabor desagradable es desagradable para el consumidor y, por lo tanto, no se busca. Las llamadas notas "positivas" también pueden detectarse en el producto, como por ejemplo notas del tipo de fruta. Como estos sabores no son desagradables para el consumidor, no están comprendidos en el "mal sabor" según la presente invención.

10 [0029] En el presente contexto, el término "envasado" de la bebida de fruta probiótica se relaciona con el envasado final de la bebida de fruta probiótica para obtener un producto que puede ingerirse, por ejemplo, una persona o un grupo de personas. Por lo tanto, un paquete adecuado puede ser una botella o cartón o similar, y una cantidad adecuada puede ser, por ejemplo 10 ml a 5000 ml, pero actualmente se prefiere que la cantidad en un paquete sea de 50 ml a 1000 ml, tal como de 200 ml a 1000 ml.

15 [0030] El término "bacterias probióticas" se refiere a bacterias viables que se administran en cantidades adecuadas a un consumidor con el fin de lograr un efecto de promoción de la salud en el consumidor. Los probióticos se pueden administrar como una forma de dosificación discreta, p. como cápsulas, suspensiones y similares. Alternativamente, las bacterias probióticas se administran en forma de un alimento o suplemento dietético. Las bacterias probióticas son capaces de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal después de la ingestión y colonizar el intestino del consumidor. Se han usado diferentes tipos de bacterias en la técnica como bacterias probióticas, incluidas las bacterias del género *Lactobacillus*, tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, y *Lactobacillus johnsonii*, el género *Bifidobacterium*, como *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* y similares. También se han descrito cepas probióticas de otros géneros, como *Escherichia* y *Bacillus*.

25 [0031] En el presente contexto, el término "mutante" debe entenderse como una cepa derivada, o una cepa que puede derivarse de una cepa de la invención (o la cepa madre) por medio de, por ejemplo, ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico. El mutante también puede ser un mutante espontáneo. Se prefiere que el mutante sea un mutante funcionalmente equivalente, por ejemplo, un mutante que tiene sustancialmente las mismas propiedades, o mejoradas, (por ejemplo, con respecto al sabor, post acidificación, velocidad de acidificación y/o capacidad para adaptarse al ácido) que la cepa madre. Tal mutante es una parte de la presente invención. Especialmente, el término "mutante" se refiere a una cepa obtenida sometiendo una cepa de la invención a cualquier tratamiento de mutagenización usado convencionalmente, incluido el tratamiento con un mutágeno químico tal como etano metanosulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o un mutante que se produce espontáneamente. Un mutante puede haber sido sometido a varios tratamientos de mutagenización (un solo tratamiento debe entenderse en un paso de mutagenización seguido de un paso de cribado/selección), pero actualmente se prefiere que no más de 20, o no más de 10, o no más de 5, se llevan a cabo tratamientos (o pasos de cribado/selección). En un mutante actualmente preferido, menos del 5%, o menos del 1% o incluso menos del 0.1% de los nucleótidos en el genoma bacteriano se han cambiado con otro nucleótido, o se han eliminado, en comparación con la cepa madre.

40 [0032] En el presente contexto, el término "variante" debe entenderse como una cepa que es funcionalmente equivalente a una cepa de la invención, por ejemplo que tiene sustancialmente las mismas propiedades, o mejoradas, (por ejemplo con respecto al sabor, post acidificación, velocidad de acidificación y/o capacidad para adaptarse al ácido). Dichas variantes pueden identificarse utilizando técnicas de cribado apropiadas.

45 [0033] El uso de los términos "un" y "el" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que de lo contrario se indica aquí o claramente contradicho por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significa "que incluye, pero no se limita a"), a menos que se indique lo contrario.

Implementación y aspectos de la invención.

50 [0034] Cepas de bacterias probióticas, como las de los géneros. *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* Se puede utilizar en bebidas. Sin embargo, son sensibles a ambientes ácidos y el recuento de células viables se reduce rápidamente cuando se inocula en un medio de pH 4.2 o inferior.

55 [0035] Los inventores de la presente invención observaron sorprendentemente que al adaptar una cepa de bacterias probióticas al ácido aumentó significativamente su supervivencia en bebidas de frutas, que generalmente tienen un pH bajo en el rango de 3-4 debido al ácido de la fruta. En las bebidas de frutas, la viabilidad de las bacterias probióticas adaptadas al ácido no se vio afectada esencialmente por el bajo pH durante un almacenamiento en frío de hasta 10 semanas y la alta viabilidad en entornos ácidos se mantuvo durante el almacenamiento congelado de las bacterias.

[0036] Además, no se detectaron sabores desagradables cuando se agregaron las bacterias probióticas adaptadas al

ácido a las bebidas de frutas, como las bebidas de frutas de frutos rojos, frutas tropicales y fresa/plátano.

[0037] Por lo tanto, la presente invención en un primer aspecto se refiere a un método para producir una bebida de fruta probiótica mediante la inoculación de una bebida de fruta con al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido.

5 **[0038]** Ejemplos de bebidas de frutas adecuadas para usar en la presente invención son aquellas que tienen valores de pH bajos, particularmente aquellas que comprenden jugos de frutas cítricas tales como jugo de naranja, jugo de pomelo, jugo de lima y jugo de mandarina y mezclas de los mismos. Otros ejemplos de bebidas de frutas incluyen bebidas de frutas que comprenden zumo de manzana.

10 **[0039]** Las bebidas de fruta adecuadas para el uso en la presente invención pueden, p. sean zumos de frutas, zumos de frutas a partir de concentrados, bebidas de frutas y néctar de frutas que opcionalmente comprenden purés y/o agua de frutas.

15 **[0040]** El contenido total de jugo de fruta y/o puré de fruta en la bebida de fruta está generalmente entre aproximadamente 20% a aproximadamente 99,99% en peso, preferiblemente entre aproximadamente 30% a 95% en peso, más preferiblemente entre aproximadamente 40% a 90% en peso, aún más preferiblemente entre aproximadamente 50% a 80% en peso, y lo más preferiblemente 60% a 70% en peso.

[0041] En una realización, la bebida de fruta de la presente invención no contiene sustancialmente componentes lácteos, pero puede comprender zumo de verduras, concentrado de verduras y/o puré de verduras.

[0042] En una realización, el pH de estas bebidas de frutas está en el intervalo de entre 3,2 y 4,2, preferiblemente entre 3,5 y 3,9.

20 **[0043]** En una realización preferida, la bebida de fruta en su totalidad o en parte está hecha de frutas seleccionadas del grupo que consiste en fresa, plátano, uva, naranja, manzana, mango, durazno, arándano, piña, lima, frambuesa y grosella negra y sus mezclas.

[0044] De acuerdo con una realización preferida de la invención, la bebida de fruta comprende puré de fresa, puré de plátano, jugo de uva, jugo de naranja, puré de mango, puré de durazno y puré de arándano.

25 **[0045]** De acuerdo con otra realización preferida de la invención, la bebida de fruta comprende jugo de piña, jugo de naranja, puré de plátano, puré de mango y jugo de lima.

[0046] Según aún otra realización preferida de la invención, la bebida de fruta comprende puré de frambuesa, jugo de grosella negra, puré de arándano, jugo de uva, puré de fresa y puré de plátano.

30 **[0047]** La al menos una bacteria probiótica se adapta al ácido en un medio adecuado mediante propagación sin estabilización del pH. En una realización, la al menos una bacteria probiótica se propaga sin estabilización del pH a una temperatura en el intervalo de 25 °C a 43 °C, preferiblemente en el intervalo de 25 °C a 40 °C en un medio que tiene un pH inicial de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0, dicho medio tiene una composición que permite que el medio alcance un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 4,0, preferiblemente después de al menos 8 horas de propagación, produciendo así al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido; se cosecha la al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido; la al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido se concentra preferiblemente; y la al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido está opcionalmente congelada o liofilizada.

35

40 **[0048]** El medio utilizado para adaptar el ácido a las bacterias probióticas tiene preferiblemente una composición que permite que dicho medio alcance un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 4,0 durante la propagación de las bacterias probióticas. Esto significa que el pH del medio disminuye debido a la producción de ácido por las bacterias probióticas, o, alternativamente, por una adición continua o gradual de ácido al cultivo. En consecuencia, el medio no contiene ningún componente esencial que se descomponga o se vuelva ineficaz o incluso tóxico a un pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 4.0. Los componentes esenciales del medio son compuestos necesarios para la propagación de bacterias probióticas, como nutrientes, fuentes de carbono y nitrógeno, vitaminas y similares.

45

[0049] El medio utilizado para la propagación en una realización preferida comprende al menos 0,4% de extracto de levadura y al menos 2% de azúcar.

50 **[0050]** Los medios adecuados que pueden usarse para la propagación de bacterias probióticas, en particular bacterias de ácido láctico, son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, si las bacterias probióticas que se usen son bacterias de ácido láctico, se puede usar cualquier medio de cultivo disponible comercialmente para bacterias de ácido láctico, como el medio Lactobacilli MRS (de Man, Rogosa y Sharpe). Un medio MRS ejemplar que puede usarse para la propagación de bacterias probióticas contiene 1,0% de peptona, 0,8% de extracto de carne, 0,4% de extracto de levadura, 2,0% de glucosa, 0,5% de acetato de sodio trihidratado, 0,1% de polisorbato 80 (también conocido como Tween 80) , 0.2% de fosfato de hidrógeno dipotásico, 0.2% de citrato de triamonio, 0.02% de sulfato de magnesio

- heptahidratado y 0.005% de tetrahidrato de sulfato de manganeso, pH de 6.0-7.0 a 25 °C. Cuando se usa este medio para bacterias probióticas que se adaptan al ácido, se prefiere particularmente que el componente de fosfato de hidrógeno dipotásico se omita de modo que el medio no pueda proporcionar un pH estable a pesar de la producción de ácido por las bacterias o por la adición externa de ácido. En una realización aún más preferida, tanto el componente de fosfato de hidrógeno dipotásico como el componente de trihidrato de acetato de sodio se omiten del medio MRS anterior. Sin embargo, como se describe en otra parte de este documento, también es posible mantener componentes de amortiguación en los medios utilizados para las bacterias probióticas que se adaptan al ácido. En este caso, la caída del pH ocurrirá después de que la capacidad del tampón se haya agotado. El cultivo de las bacterias probióticas no incluirá ninguna adición externa de bases.
- 5
- 10 **[0051]** En general, el experto en la materia conocerá los medios adecuados para la propagación de bacterias probióticas. Los medios anteriores, con o sin componentes de tampón, son adecuados para la propagación en cultivos iniciadores, tales como cultivos iniciadores que tienen un volumen de aproximadamente 100 ml, aproximadamente 500 ml, aproximadamente 1000 ml, aproximadamente 2000 ml, aproximadamente 4000 ml o más, como así como para cultivos bacterianos a gran escala, tales como cultivos en un volumen de más de 50 L, más de 100 L, más de 200 L o más de 400 L. Tales cultivos a gran escala se llevarán a cabo típicamente en un fermentador. El uso de un medio adecuado se ejemplifica a continuación en el Ejemplo 1.
- 15
- [0052]** El pH inicial del medio es el pH del medio antes de la adición de bacterias probióticas. En una realización preferida, el pH inicial del medio está entre aproximadamente 6,0 y 7,0, preferiblemente entre aproximadamente 6,2 y aproximadamente 6,6.
- 20
- [0053]** En una realización de la invención, el medio alcanza el pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 4,0, preferiblemente después de al menos 6 horas, al menos 8 horas, al menos 10 horas de propagación de bacterias probióticas, y más preferiblemente después de al menos 12 horas de propagación de bacterias probióticas. En una realización particularmente preferida, el medio alcanza el pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 4,0 después de al menos 8 horas.
- 25
- [0054]** Las bacterias probióticas pueden causar una caída en el pH durante la propagación debido a la producción de ácido láctico durante la fermentación. En una realización preferida, el medio usado en el método de la presente invención permite esta caída de pH, porque no contiene o esencialmente no contiene ningún agente tamponador que mantenga el pH estable a pesar de la formación de ácido láctico durante la propagación.
- 30
- [0055]** Preferiblemente, las bacterias probióticas se propagan sin estabilización del pH a una temperatura en el rango de 25 °C a 43 °C, preferiblemente en el rango de 25 °C a 40 °C, más preferiblemente en el rango de 30 a 40 °C, y lo más preferiblemente a aproximadamente 37°C.
- [0056]** En una realización preferida de la presente invención, la al menos una cepa de bacterias probióticas pertenece al género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*.
- 35
- [0057]** En una realización más preferida de la presente invención, la al menos una cepa de bacterias probióticas pertenece a la especie *Lactobacillus paracasei*. Si se usa *Lactobacillus paracasei*, la temperatura para la propagación es preferiblemente 37 o 38 °C.
- [0058]** La cepa *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL431 (*L. casei* 431®) se depositó de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento de patentes con el American Tissue type Collection Center, 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110, EE. UU el 24 de enero de 1994 con el número de acceso ATCC 55544. La bacteria probiótica conocida está disponible comercialmente en Chr. Hansen A / S, 10-12 Boege Alle, DK-2970 Hoersholm, Dinamarca, con el nombre de producto Probio-Tec® F-DVS *L. casei*-431®, número de artículo 501749, y con el nombre de producto Probio-Tec® C -Polvo-30, Número de artículo 687018.
- 40
- [0059]** En una realización aún más preferida de la presente invención, al menos una cepa de bacterias probióticas se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus paracasei* subsp. cepa *paracasei* CRL431 (*L. casei* 431®) que se depositó en el American Tissue Type Collection Center con el número de acceso ATCC55544, un mutante del mismo y una variante del mismo.
- 45
- [0060]** Los métodos para recolectar y concentrar las bacterias probióticas adaptadas al ácido son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la recolección de las bacterias se puede lograr mediante la centrifugación de los cultivos bacterianos para eliminar el sobrenadante de los medios de cultivo. La centrifugación será lo suficientemente suave como para evitar la ruptura de la bacteria. Los métodos para recolectar células por centrifugación son comúnmente conocidos e incluyen, p. centrifugación a 2000 a 6000 x g durante 2-20 minutos. La bacteria también puede cosecharse mediante otras técnicas que se han descrito en el contexto de la fermentación bacteriana, como la filtración, por ejemplo filtración cruzada filtración. Los métodos para la concentración también son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la concentración de las bacterias se puede lograr mediante centrifugación y resuspensión posterior en un volumen más pequeño, liofilización o técnicas de filtración por membrana, como la filtración a través de columnas o filtros.
- 50
- 55

- [0061]** Generalmente, la bebida de fruta se inocula con al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido en una cantidad (UFC/ml inicial) de aproximadamente 1×10^4 a 1×10^{10} UFC/ml, más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^9 UFC/ml, e incluso más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^8 UFC/ml.
- 5 **[0062]** Sorprendentemente, la viabilidad de las bacterias probióticas es particularmente alta después de la adaptación a las condiciones ácidas descrita anteriormente y se mantendrá alta después de un tiempo de almacenamiento de varios meses a una temperatura de 4-10 °C. La viabilidad de la al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido en una realización es al menos el 50% de la UFC/ml inicial después del almacenamiento durante al menos 30 días a una temperatura de 8 °C en la bebida de fruta, como después al menos 42 días de almacenamiento a una temperatura de 8 °C, como después de al menos 70 días de almacenamiento a una temperatura de 8 °C.
- 10 **[0063]** En una realización preferida, la viabilidad de al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido es al menos el 60% de la UFC/ml inicial, preferiblemente al menos el 70% de la UFC/ml inicial, y más preferiblemente al menos el 80% de la UFC/ml inicial en las condiciones de almacenamiento mencionadas anteriormente.
- 15 **[0064]** La medición del recuento de células viables se realiza cuantificando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en diluciones en serie mediante el recuento de colonias en placas de agar, de acuerdo con los métodos estándar en la técnica. El medio adecuado y las condiciones de incubación se dan en los ejemplos a continuación.
- [0065]** Después de la cosecha y/o concentración, las bacterias adaptadas al ácido opcionalmente se congelan o liofilizan. Por ejemplo, las bacterias probióticas pueden congelarse a aproximadamente -20°C, preferiblemente a aproximadamente -80°C, o menos. El procedimiento de congelación se lleva a cabo preferiblemente lo más rápido posible, preferiblemente mediante congelación por choque, para evitar el daño celular. La congelación de choque puede, por ejemplo se llevará a cabo vertiendo un recipiente que contiene la bacteria en nitrógeno líquido. Por lo tanto, en una realización particularmente preferida, las bacterias probióticas adaptadas al ácido se congelan por choque a aproximadamente -196°C. Los métodos para la liofilización también son bien conocidos en la técnica. Durante la liofilización, el material se congela y luego se reduce la presión circundante para permitir que el agua congelada en el material se sublima directamente desde la fase sólida a la fase gaseosa. Después de congelar o congelar por choque las bacterias adaptadas al ácido, las bacterias pueden almacenarse a aproximadamente -20°C, a aproximadamente -55°C, a aproximadamente -80°C, o en nitrógeno líquido a -196°C. Se prefiere particularmente almacenar las bacterias adaptadas al ácido a aproximadamente -55°C.
- 20 **[0066]** Según una realización, la bebida de fruta probiótica se envasa convenientemente en un paquete sellado que contiene de 10 a 5000 ml del producto, tal como de 50 a 1000 ml o de 200 a 1000 ml.
- 25 **[0067]** En un segundo aspecto, la presente descripción se refiere a una bebida de fruta probiótica obtenible por el método según el primer aspecto de la invención, en la que la bebida de fruta probiótica comprende al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido.
- 30 **[0068]** En una realización, la al menos una cepa de bacterias probióticas está presente en la bebida de fruta en una cantidad de aproximadamente 1×10^4 a 1×10^{10} UFC/ml, más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^9 UFC/ml, e incluso más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^8 UFC/ml después de al menos 30 días de almacenamiento a una temperatura de 8°C, como después de al menos 42 días de almacenamiento a una temperatura de 8°C.
- 35 **[0069]** La medición del recuento de células viables se realiza cuantificando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en diluciones en serie mediante el recuento de colonias en placas de agar, de acuerdo con los métodos estándar en la técnica. El medio adecuado y las condiciones de incubación se dan en los ejemplos a continuación.
- 40 **[0070]** En un tercer aspecto, la presente invención se dirige a un método para obtener un cultivo de una cepa probiótica adaptada al ácido por propagación sin estabilización del pH. En una realización preferida, las bacterias probióticas se propagan sin estabilización del pH a una temperatura en el intervalo de 25°C a 43°C, más preferiblemente en el intervalo de 25°C a 40°C en un medio que tiene un pH inicial de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0, dicho medio tiene una composición que permite que el medio alcance un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 4,0 después de al menos 8 horas de propagación, produciendo así las bacterias probióticas adaptadas al ácido; se cosechan las bacterias probióticas adaptadas al ácido; las bacterias probióticas adaptadas al ácido se concentran; y las bacterias probióticas adaptadas al ácido están opcionalmente congeladas o liofilizadas.
- 45 **[0071]** En una realización preferida, el medio comprende al menos 0,4% de extracto de levadura y al menos 2% de azúcar.
- 50 **[0072]** El pH inicial del medio es el pH del medio antes de la adición de bacterias probióticas. En una realización preferida, el pH inicial del medio está entre aproximadamente 6,2 y aproximadamente 6,6.
- 55 **[0073]** En una realización preferida, el medio alcanza el pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 4,0 después de al menos 10 horas de propagación de bacterias probióticas, preferiblemente después de al menos 12 horas de propagación de bacterias probióticas.

[0074] En una realización preferida, las bacterias probióticas pertenecen a los géneros Lactobacillus o Bifidobacterium.

[0075] En una realización más preferida, la al menos una cepa de bacterias probióticas pertenece a la especie Lactobacillus paracasei.

5 [0076] En una realización aún más preferida, al menos una cepa de bacterias probióticas se selecciona del grupo que consiste en Lactobacillus paracasei subsp. cepa paracasei CRL431 (L. casei 431®) que se ha depositado en la American Tissue Type Collection con el número de acceso ATCC55544, un mutante del mismo y un variante del mismo.

[0077] Un cuarto aspecto se refiere a un cultivo de una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido según el tercer aspecto de la invención.

10 [0078] Un quinto aspecto está dirigido al uso de un cultivo de acuerdo con el cuarto aspecto para la producción de una bebida de fruta probiótica.

[0079] En una realización preferida, la bebida de fruta probiótica tiene un pH de como máximo 4,2. La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

15 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Producción de L. casei 431® adaptada al ácido.

[0080] El medio MRS de Difco (ref. 288110) se inoculó al 1% (V/V) con L. casei 431® de un stock congelado. El cultivo se cultivó durante la noche a 37 °C hasta que el pH fue inferior a 3,9 y se almacenó a 5°C hasta su uso. Este cultivo nocturno se usó para inocular 4 L (1%, V / V) de medio MRS (Difco) y se incubó durante la noche a 37 °C hasta que el pH fue inferior a 3.9 y se almacenó a 5 °C hasta su uso. Este paso de pre-inoculación se realizó para obtener una cantidad suficiente de inóculo para la fermentación. Se inoculó un biorreactor que contenía 400 l de un medio adecuado a 10 °C con todo el volumen de preinóculo. La fermentación se inició aumentando la temperatura a 35 °C y la fermentación fue seguida por el control de la disminución del pH como una indicación del metabolismo de los carbohidratos en la producción de ácido láctico. Durante esta caída del pH, las células se adaptan gradualmente al pH bajo. Las células adaptadas al ácido se cosecharon a pH 5.0, 4.5 y 4.0 por centrifugación. El tiempo de fermentación fue entre 10-17 horas dependiendo del punto de cosecha (Figura 1).

[0081] La masa celular concentrada se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido (-196 °C) y se almacenó a -55 °C hasta su uso.

Ejemplo 2. Optimización de los criterios de cosecha para L. casei 431® adaptada al ácido

[0082] Para obtener un número máximo de células viables, el criterio de recolección óptimo se determinó de la siguiente manera. Se inoculó un biorreactor con preinóculo y se inició la fermentación como se describe en el ejemplo 1. Se tomaron muestras de fermentado cada 30 minutos desde las 11 horas posteriores a la inoculación (correspondiente a pH 4.5) hasta que el pH fue inferior a 4.0 y la viabilidad se evaluó mediante determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) (Figura 2). La UFC se determinó vertiendo en placas diluciones diez veces apropiadas en agar MRS seguido de incubación anaeróbica durante 3 días a 37 °C.

[0083] Los recuentos de células aumentaron hasta 12 h después de la inoculación (correspondiente a un pH de 4,24) y 15 permanecieron en un nivel constante durante toda la fermentación. Esto indica que las células son robustas y siguen siendo viables incluso cuando el pH cae por debajo de 4.0. Se determinó un pH <4.0 como el criterio de cosecha óptimo que proporciona una cantidad suficiente de células viables y adaptadas al ácido dentro de un tiempo de proceso factible.

Ejemplo 3. Supervivencia y calidad organoléptica de varias bebidas de frutas añadidas L. casei 431® adaptadas

45 [0084] L. casei 431® producido según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 se usó para la inoculación de diferentes bebidas a base de frutas compuestas de los siguientes ingredientes:

Jugo de fresa y plátano (pH 3.75)

[0085]

50 31% puré de fresa

26% Puré de banana

Jugo de uva, jugo de naranja, puré de mango, puré de melocotón y puré de arándanos hasta 100%

Jugo tropical (pH 3.88)

5 [0086]

32% jugo de piña

32% zumo de naranja

26% Puré de banana

7% puré de mango

10 3% jugo de lima

Jugo de frutas rojas (pH 3.55)

[0087] 16% de diferentes frutas rojas (puré de frambuesa, jugo de grosella negra, puré de arándanos) Jugo de uva, puré de fresa y puré de plátano hasta 100%.

15 [0088] El F-DVS del cultivo probiótico se diluyó en peptona salina para asegurar que el recuento inicial de células de 5×10^7 o 1×10^8 Se obtuvieron UFC/ml al agregar un inóculo de 1% v/v a los cartones de los diferentes jugos de frutas. Los jugos se inocularon con *L. casei* 431® adaptado a pH 4.0 o pH 5.0 y, como control, el *L. casei* 431® no adaptado. Como control para el análisis sensorial, se inocularon cartones con el mismo volumen de peptona salina. Los jugos inoculados se almacenaron protegidos de la luz a 8 °C. Los recuentos de células de *L. casei* 431® se determinaron regularmente vertiendo en placas diluciones diez veces apropiadas en agar MRS seguido de incubación anaeróbica durante 3 días a 37 °C. Las evaluaciones sensoriales fueron realizadas durante el almacenamiento por un panel de 3 evaluadores sensoriales entrenados.

25 [0089] Los recuentos celulares de *L. casei* 431® en los diferentes jugos se ilustran en las Figuras 3, 4 y 5. Las bacterias *L. casei* 431® adaptadas al ácido no se vieron afectadas por el almacenamiento durante al menos 30 días en un ambiente ácido de pH 3.5-3.9 mientras que no la bacteria *L. casei* 431® adaptada tenía una viabilidad 1000 veces menor en las bebidas de frutas.

30 [0090] Las evaluaciones sensoriales durante el almacenamiento de 30 días no mostraron cambios organolépticos en ninguna de las bebidas de frutas agregadas *L. casei* 431® en comparación con las mismas bebidas de frutas añadieron un volumen correspondiente de peptona salina.

Ejemplo 4. Supervivencia de *L. casei* 431® en jugo de naranja cuando se adapta a tres valores de pH diferentes

35 [0091] *L. casei* 431® producido según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 se usó para la inoculación de jugo de naranja 100% (pH 3,8). F-DVS del cultivo probiótico se diluyó en peptona salina para asegurar que el recuento inicial de células de 1.5×10^8 Se obtuvieron UFC/ml añadiendo un inóculo de 1% v / v a cartones de zumo de naranja. Los jugos fueron inoculados con *L. casei* 431® adaptado a pH 4.0, pH 4.5 o pH 5.0, y como control, el no adaptado *L. casei* 431®. Los jugos se almacenaron protegidos de la luz a 8 °C durante 42 días y se tomaron muestras regularmente para determinar el recuento celular vertiendo en placas diluciones apropiadas de 10 veces en agar MRS seguido de incubación anaeróbica durante 3 días a 37 °C.

[0092] Como se ilustra en la Figura 6, los recuentos celulares de *L. casei* 431® fueron bastante constantes cuando se adaptaron a pH 4.0, 4.5 o 5.0 durante la producción, mientras que se observaron reducciones significativas en el recuento celular para los no adaptados *L. casei* 431®.

45 **Ejemplo 5. Estabilidad de adaptada *L. casei* 431 durante el almacenamiento congelado.**

[0093] *L. casei* 431@ producidos de acuerdo con el ejemplo 1 se almacenaron como gránulos congelados a -50 °C, y se evaluaron regularmente para determinar su viabilidad. Los recuentos de células se determinaron en cultivo descongelado vertiendo 5 placas de diluciones apropiadas de 10 veces en agar MRS seguido de incubación

anaeróbica durante 3 días a 37 °C. Como se ilustra en la Figura 7, los recuentos de células tanto de los no adaptados como de los *L. casei* 431@ adaptados a pH 4.0, 4.5 o 5.0 durante la producción fueron muy constantes durante al menos 6 meses cuando se almacenaron a -50 °C.

5 **Ejemplo 6. Supervivencia de *L. casei* 431@ en jugo después de un almacenamiento congelado a largo plazo.**

10 **[0094]** Después de 6 meses de almacenamiento a -50 °C como gránulos congelados, se determinó la supervivencia en jugo de naranja al 100% para el lote de *L. casei* 431 adaptado a pH 4.0 durante la producción. F-DVS del cultivo probiótico se diluyó en peptona salina para asegurar que el recuento inicial de células de 10⁸ Se obtuvieron UFC/ml agregando un inóculo de 1% (v / v) a cartones de jugo de naranja. Como control, se agregaron otros cartones de jugo de naranja 100% no adaptado *L. casei* 431@ almacenado durante 6 meses a -50 °C. Los jugos fueron almacenados a 8 °C protegidos de la luz y regularmente muestreados para *L. casei* 431@ determinaciones de recuento celular vertiendo en placas una dilución de 10 veces apropiada en agar MRS seguido de incubación anaeróbica durante 3 días a 37 °C.

15 **[0095]** Como se ilustra en la Figura 8, los recuentos celulares de *L. casei* 431@ fueron bastante constantes cuando se adaptaron a pH 4.0 durante la producción, se almacenaron durante 6 meses a -50 °C y luego se almacenaron en frío en jugo de naranja durante 6 semanas. Por el contrario, se observaron reducciones significativas del recuento celular para los no adaptados *L. casei* 431@ cuando se almacena durante 6 meses a -50 °C y se agrega al jugo de naranja. Esto ilustra que la buena supervivencia en naranja de *L. casei* 431@ adaptado a pH 4.0 durante la producción se mantiene incluso después de un largo almacenamiento congelado del cultivo a -50 °C.

20

Ejemplo 7. Estabilidad de almacenamiento a largo plazo de adaptadas *L. casei* 431@ en jugo de naranja 100%.

25 **[0096]** *L. casei* 431@ producido de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 se usó para la inoculación de jugo de naranja al 100% (pH 3,8). El F-DVS del cultivo probiótico se diluyó en peptona salina para asegurar que el recuento inicial de células de aprox. Se obtuvieron 1e08 UFC/ml añadiendo un inóculo de 1% v/v a cartones de zumo de fruta. Los jugos fueron inoculados con *L. casei* 431@ adaptado a pH 4.0 o como control, el 'control' no adaptado *L. casei* 431@. Los jugos de naranja se almacenaron protegidos de la luz a 8 °C durante 70 días y se tomaron muestras regularmente para la determinación del recuento celular vertiendo en placas diluciones apropiadas de 10 veces en agar MRS seguido de incubación anaerobia durante 3 días a 37 °C.

30 **[0097]** Como se ilustra en la Figura 9, los recuentos celulares de *L. casei* 431@ fueron bastante constantes cuando se adaptaron a pH 4.0 durante la producción y luego se almacenaron en frío en jugo de naranja por hasta 10 semanas. Por el contrario, se observaron reducciones significativas del recuento celular desde el primer punto de muestreo a las 3 semanas de almacenamiento para los no adaptados *L. casei* 431@ cuando se almacena en frío en jugo de naranja. Esto ilustra la supervivencia superior de *L. casei* 431@ adaptado a pH 4.0 en jugo de naranja incluso hasta 10 semanas de almacenamiento en frío.

35

Referencias

[0098]

Patente Europea EP 0113055

40 Solicitud de patente de EE. UU. US 2010/0086646

Solicitud de patente PCT WO 2010/132017

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una bebida de fruta probiótica, dicho método comprende:

(a) adaptar al ácido al menos una cepa de bacterias probióticas durante la propagación que comprende

(i) propagar la al menos una cepa de bacterias probióticas sin estabilización del pH a una temperatura en el intervalo de 25 °C a 43 °C, en un medio adecuado que tenga un pH inicial de entre 6,0 y 7,0, teniendo dicho medio una composición permitiendo que dicho medio alcance un pH de entre 5,0 y 4,0;

(ii) recolectar al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido;

(iii) concentrar la al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido; y

(iv) opcionalmente congelar o liofilizar la al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido;

(b) inocular una bebida de fruta con al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido de la etapa (a); y

(c) opcionalmente envasar la bebida de fruta probiótica.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que la adaptación al ácido en la etapa (a) comprende propagar al menos una cepa de bacterias probióticas sin estabilización del pH a una temperatura en el intervalo de 25°C a 40°C.

3. Un método según la reivindicación 1, en el que dicho medio en la etapa (i) comprende al menos 2% de azúcar y 0,4% de extracto de levadura.

4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa (b) la bebida de fruta se inocula con al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido en una cantidad (UFC inicial por ml de bebida de fruta) de 1×10^4 a 1×10^{10} UFC por ml de bebida de fruta, más preferiblemente en una cantidad de 1×10^5 a 1×10^9 UFC por ml de bebida de fruta, y aún más preferiblemente en una cantidad de 1×10^6 a 1×10^8 UFC por ml de bebida de fruta.

5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la viabilidad de al menos una cepa de bacterias probióticas adaptadas al ácido es al menos 50% de la UFC inicial por ml de bebida de fruta después del almacenamiento durante al menos 30 días a una temperatura de 8 °C en la bebida de frutas, tal como después de al menos 42 días de almacenamiento a una temperatura de 8 °C, tal como después de al menos 70 días de almacenamiento a una temperatura de 8 °C.

6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pH de la bebida de fruta probiótica está en el rango de 3,2 a 4,2, tal como en el rango de 3,5 a 3,9.

7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la al menos una cepa de bacterias probióticas se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la bebida de fruta probiótica comprende del 20% al 99,99% en peso de jugo de fruta y / o puré de fruta.

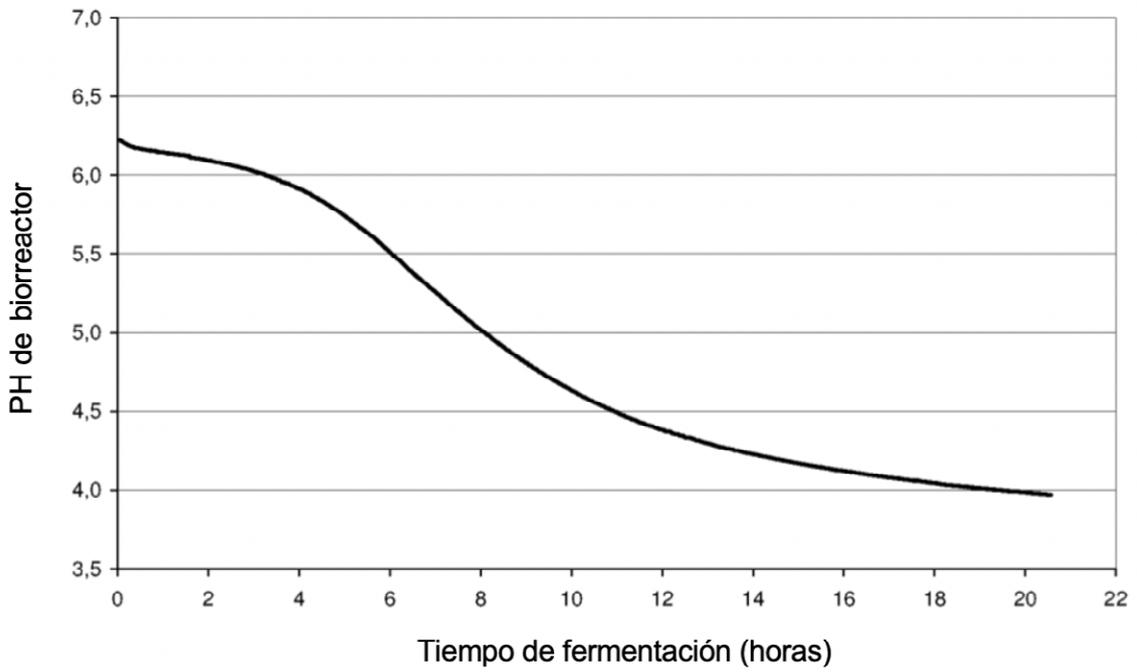


Figura 1

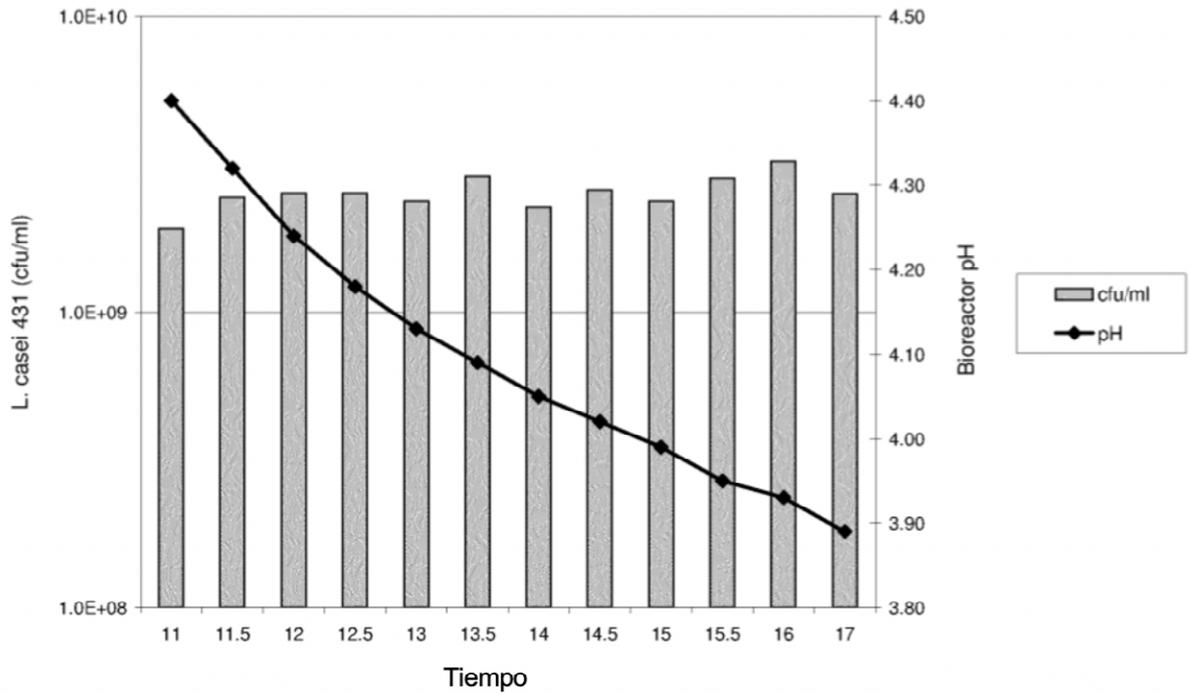


Figura 2

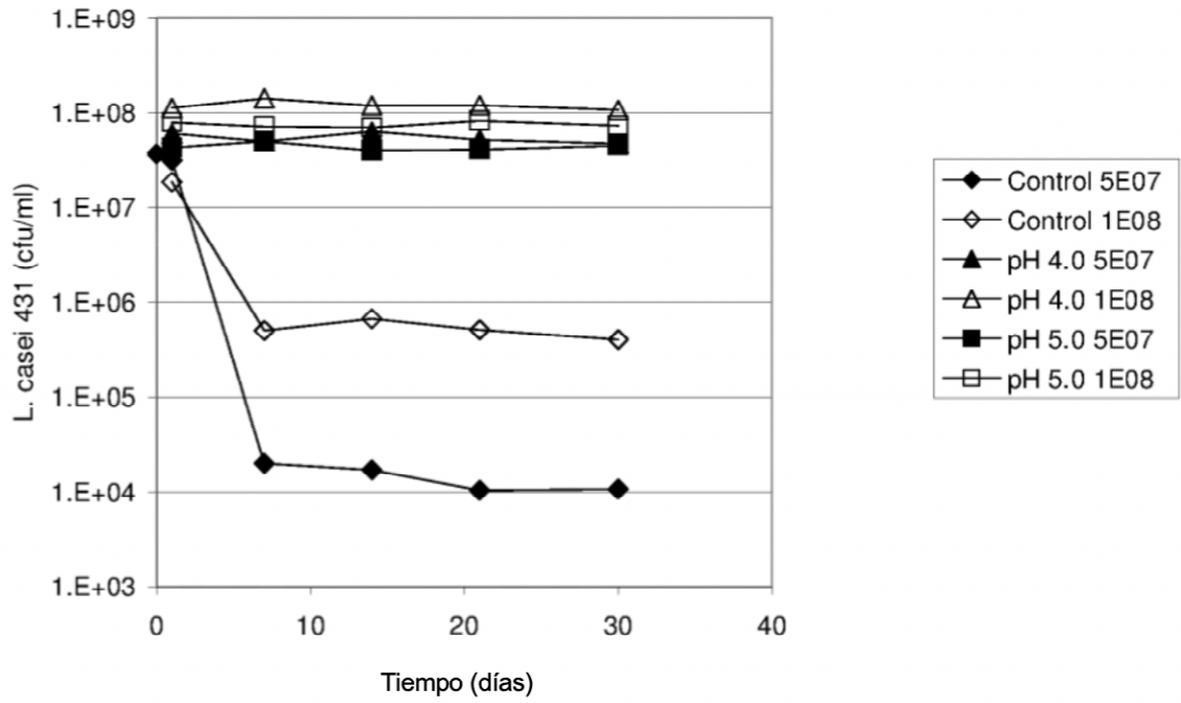


Figura 3

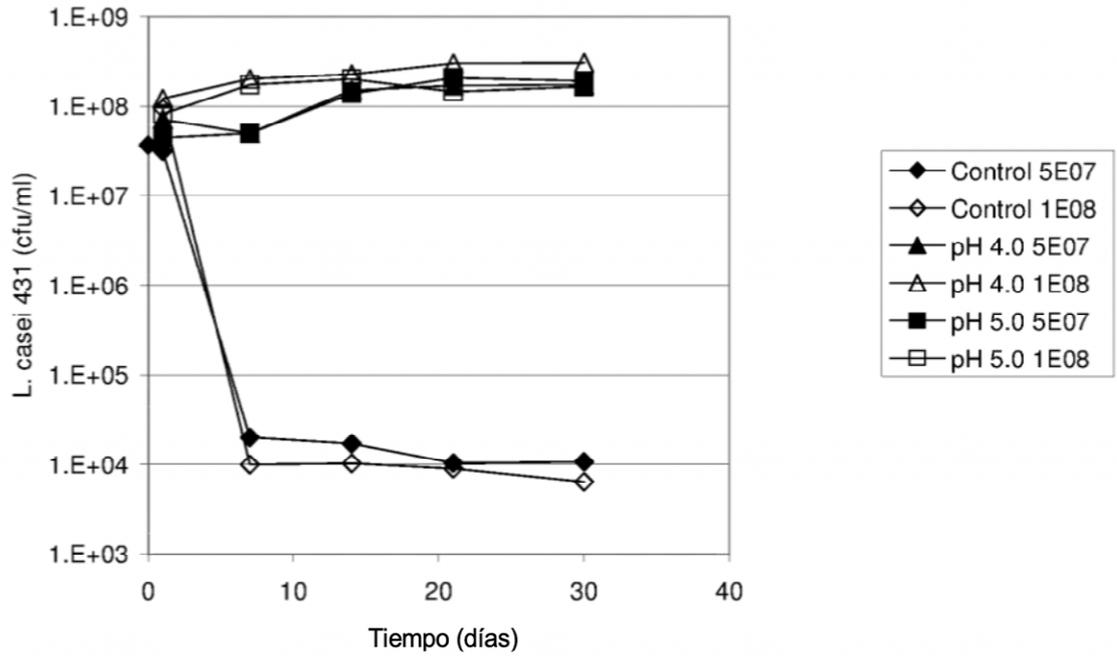


Figura 4

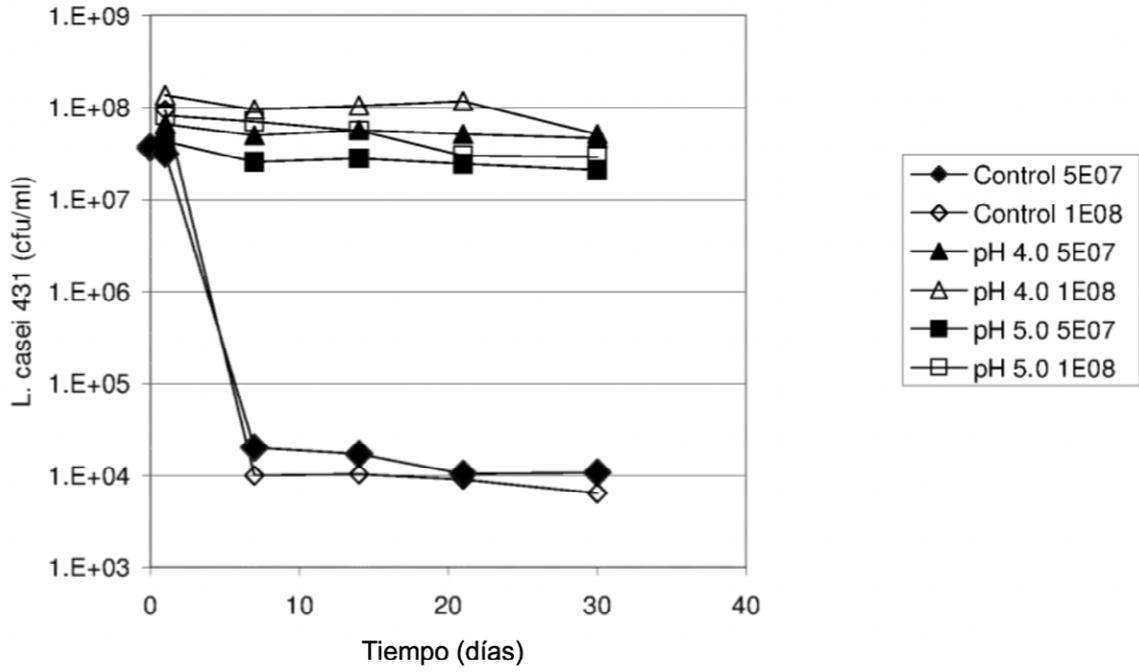


Figura 5

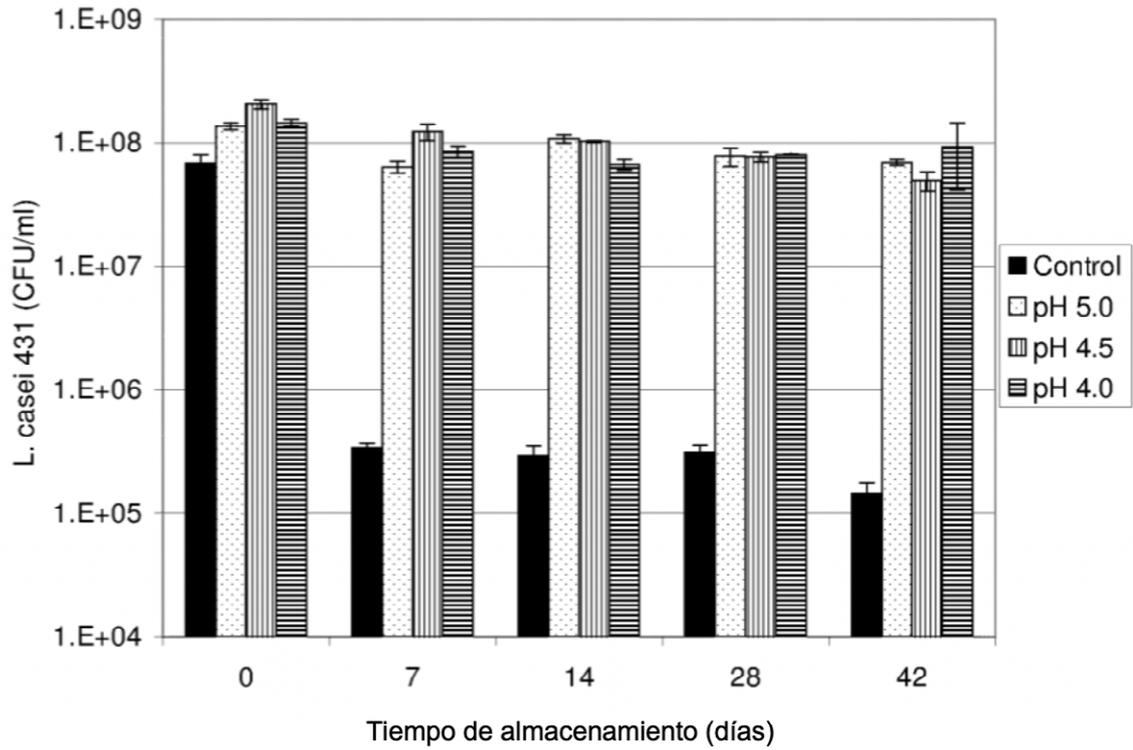


Figura 6

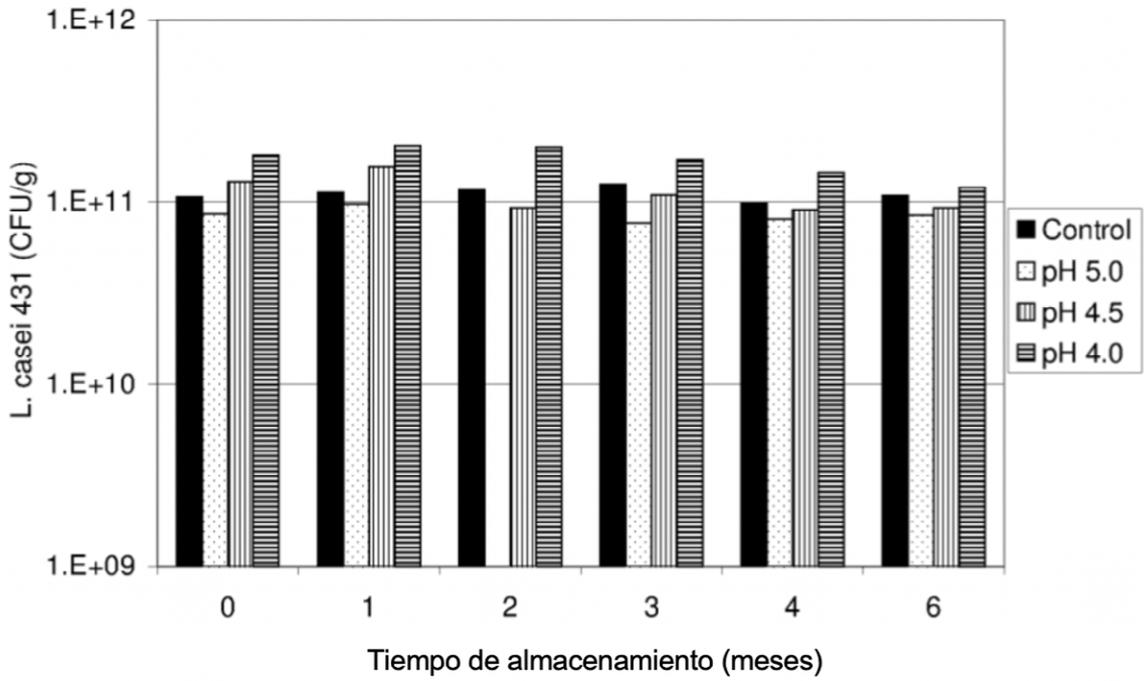


Figura 7

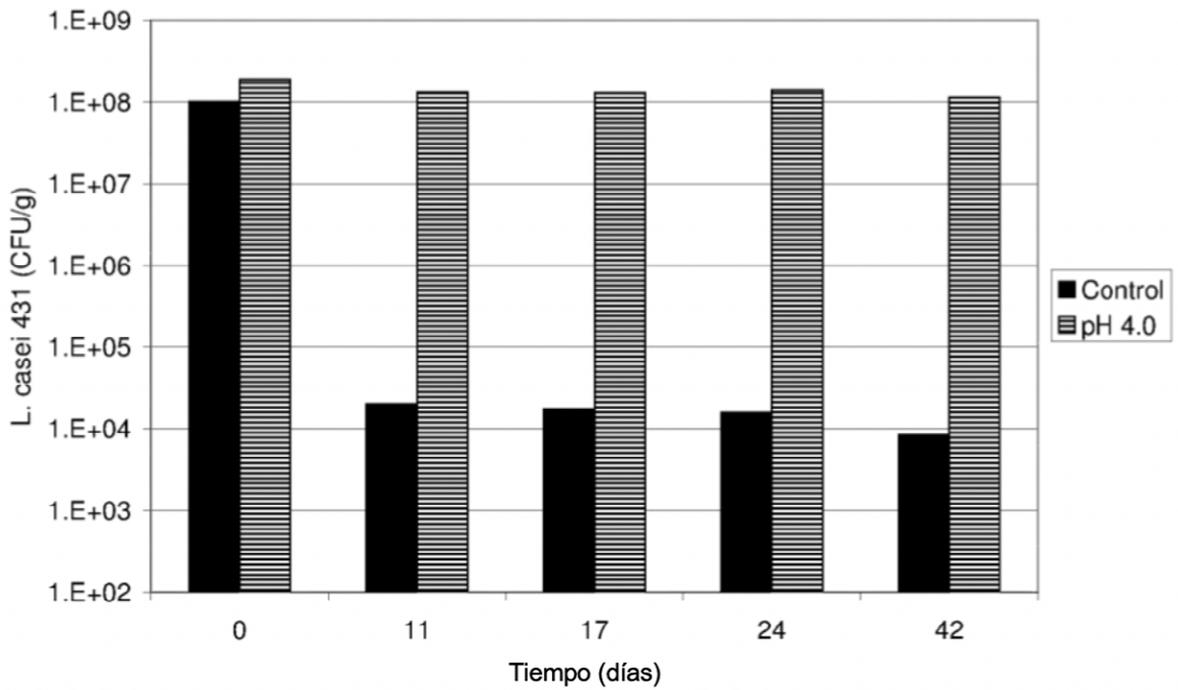


Figura 8

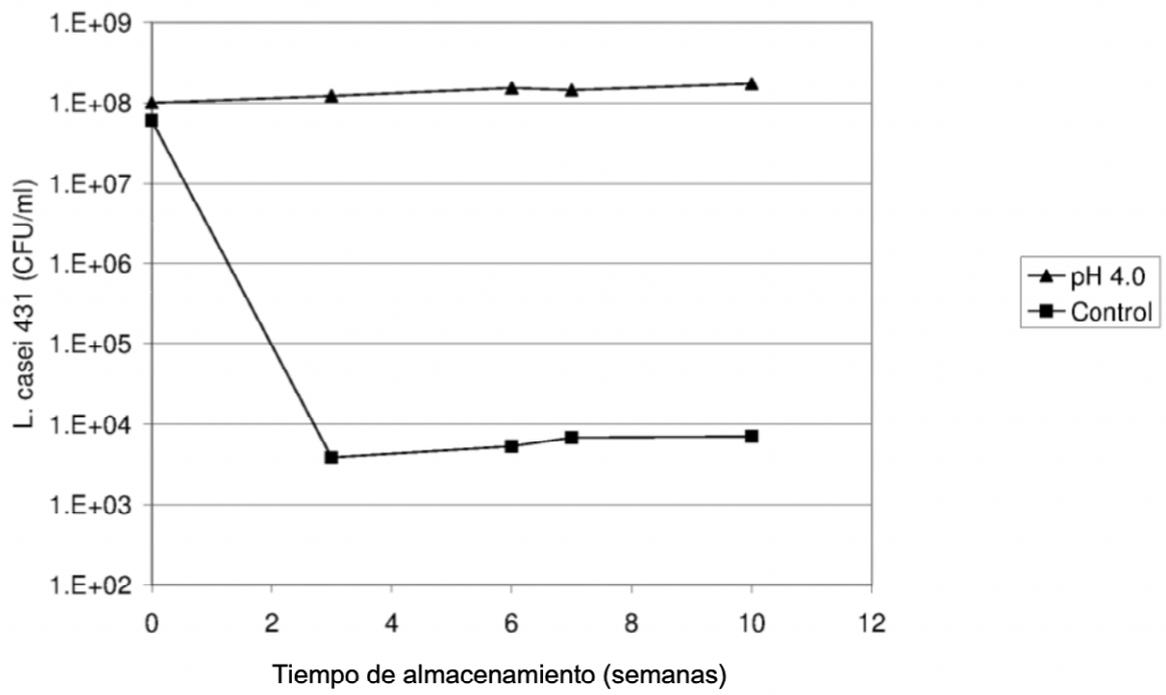


Figura 9