

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 885 675**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/135** (2006.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

**A61P 1/14** (2006.01)

**A23L 2/02** (2006.01)

**A23L 2/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2010 PCT/SE2010/050525**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010 WO10132017**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2010 E 10775169 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.07.2021 EP 2432334**

54 Título: **Bebida de zumo probiótica**

30 Prioridad:

**14.05.2009 SE 0950341**

**19.05.2009 US 179457 P**

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

**15.12.2021**

73 Titular/es:

**PROBI AB (100.0%)**

**Ideongatan 1A**

**223 70 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**HOLMGREN, KERSTIN y**

**BIRGER, MARIE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 885 675 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

Bebida de zumo probiótica

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una bebida de zumo de frutas probiótica que tiene buen sabor y una duración larga del producto en almacenamiento. La bebida de zumo de frutas probiótica tiene además efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor.

10

**Técnica anterior**

Las bacterias probióticas se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, afectan beneficiosamente al huésped. *Lactobacilli* y *bifidobacteria* son las bacterias más utilizadas en productos probióticos. Estas bacterias son generalmente seguras, al igual que los probióticos basados en estos organismos. Se ha demostrado que la ingesta de distintas bacterias probióticas tiene beneficios clínicos en diversas situaciones fisiológicas o patológicas. Para que una bacteria cumpla con la definición de probiótico, tiene que ser capaz de sobrevivir y colonizar el intestino, sobrevivir a los duros procedimiento de producción y almacenamiento de los alimentos, pero también tiene que haber pruebas claras de que tiene efectos positivos en la salud del consumidor.

20

Se sabe en la técnica anterior que las bacterias del género *Lactobacillus* metabolizan los ácidos orgánicos presentes en frutas y zumos de frutas. La metabolización provoca la formación de gas tal como el dióxido de carbono. El ácido orgánico, ácido cítrico, está presente en altas concentraciones en los cítricos y zumos de cítricos tales como zumo de naranja y limón. El ácido orgánico, ácido málico, está presente en altas concentraciones en manzanas y zumo de manzana. No ha sido posible fabricar antes un producto de zumo de naranja o zumo de manzana, o similar, con una especie de *Lactobacillus* debido a la gran cantidad de gas producido (dióxido de carbono), provocando una duración del producto muy corta y un cambio de sabor. El desarrollo de gas provoca el hinchamiento del envase, lo que significa que el envase se expande debido a la mayor presión dentro del envase provocada por el dióxido de carbono producido en el mismo. Adicionalmente, el sabor del producto se deteriora debido a la forma gasificada y efervescente que toma el producto en vista de la metabolización de los ácidos orgánicos. La metabolización del ácido málico y el ácido cítrico da como resultado ácido láctico y ácido acético, además de dióxido de carbono, véanse las fig. 1-3, provocando gustos desagradables en el producto. Tanto el zumo de manzana como el de naranja son zumos muy populares para beber en el mundo occidental, especialmente por la mañana. A la vista de los anteriores problemas, no ha sido posible fabricar y distribuir antes un zumo probiótico de manzana o naranja.

25

30

35

ProViva® es un producto probiótico a base de frutas y avena disponible en el mercado que comprende *Lactobacillus plantarum* 299v. Estos productos no pueden contener cantidades demasiado altas de frutas que contengan ácidos orgánicos, ácido cítrico y ácido málico, debido al problema mencionado anteriormente, es decir, la producción de gas. Por tanto, estos productos no incluyen zumos de frutas tales como manzana, naranja o multifrutas. Adicionalmente, ProViva® no es un zumo puro.

40

Naked Juice Company tiene en el mercado un zumo de mango (100 %) tropical probiótico que comprende una especie de *Bifidobacterium* y zumo de manzana, mango, naranja, plátano y piña. Las *Bifidobacterium* son muy sensibles a los ambientes de pH bajo y la mayoría de las bacterias no pueden afrontar un ambiente ácido por debajo de 4 y mueren. El metabolismo de *Bifidobacterium* difiere del de *Lactobacillus*.

45

En el documento US2008/0206403 se describe un método, así como productos alimenticios probióticos, productos a los que se les han disminuido los ácidos orgánicos para reducir la producción de dióxido de carbono del producto alimenticio final. La disminución de los ácidos orgánicos de una fruta se realiza seleccionando una matriz a base de fruta que tenga una acidez natural baja.

50

En el documento US 2007/0128328 se divulga el uso de un inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacterostático que comprende acerola contra bacterias termorresistentes y resistentes a los ácidos (TAB, forma siglada de *thermo-resistant and acid-resistant*) pertenecientes al género *Alicyclobacillus*. Se sabe que las bacterias del género *Alicyclobacillus* son resistentes a la pasteurización general y, por lo tanto, pueden provocar olores indeseables y una disminución de la calidad de los alimentos en un producto pasteurizado final. *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Alicyclobacillus acidocaldarius* son bacterias termoacidófilas, no patógenas, formadoras de esporas que pueden sobrevivir al típico procesamiento térmico de los zumos y concentrados de frutas. Las endosporas bacterianas luego germinan, crecen y provocan el deterioro de los productos alimenticios ácidos.

55

60

Por tanto, sigue existiendo una necesidad dentro del campo técnico de proporcionar bebidas de zumo de frutas probióticas que puedan mantener la supervivencia de las bacterias probióticas en el ambiente ácido de la bebida de zumo de frutas, las bacterias probióticas aún proporcionen efectos beneficiosos en el tubo gastrointestinal y la bebida de zumo de frutas aún tenga un buen sabor y una duración del producto larga, es decir, sin hinchamiento del envase. Actualmente no existe un producto de este tipo en el mercado.

65

Por tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar una bebida de zumo de frutas probiótica con buen sabor y duración del producto larga. La bebida de zumo es más estable y se han resuelto los problemas previos con la producción de gas.

## 5 Sumario de la invención

La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

10 Por tanto, sorprendentemente, ha sido posible fabricar una bebida de zumo de frutas probiótica con buen sabor en conformidad con la presente invención. Se han solucionado los problemas previos con el ácido cítrico y el ácido málico en presencia de una cepa de *Lactobacillus*.

15 Por lo demás, se describe en el presente documento el uso de al menos un reductor de la formación de gas elegido entre acerola, granada, arándano rojo americano, aronia, grosella negra, espino cerval (*buckthorn* en inglés), endrina o saúco, o cualquier combinación de los mismos, para producir una bebida de zumo de frutas probiótica que consiste en, además del reductor de la formación de gas, al menos una especie de bacterias probióticas elegidas de *Lactobacillus* y un zumo de frutas primario, y opcionalmente un zumo de frutas secundario, y opcionalmente agua.

## 20 Breve descripción de los dibujos

En la medida en que cualquiera de los dibujos represente ejemplos que caen fuera del alcance de las reivindicaciones, se incluyen solo a modo de comparación.

25 La Fig. 1 representa la metabolización del citrato (la sal del ácido cítrico) a dióxido de carbono y acetato.

La Fig. 2 representa la metabolización del ácido málico a dióxido de carbono y ácido láctico.

La Fig. 3 muestra la duración del producto de una mezcla probiótica de *Lactobacillus plantarum* HEAL9 y *Lactobacillus paracasei* 8700:2 ( $10^9$  ufc) en un zumo de naranja al que se le añadió el 10 % de acerola (en peso) durante el almacenamiento a 8 °C.

30 La Fig. 4 comparativa representa el dióxido de carbono producido en zumo de manzana en presencia de arándano rojo americano a distintas concentraciones.

La Fig. 5 comparativa representa el dióxido de carbono producido en zumo de manzana en presencia de granda a distintas concentraciones.

## 35 Descripción detallada de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones.

40 Por lo demás, en el presente documento se describe una bebida de zumo de frutas probiótica que consiste en al menos una especie de bacterias probióticas elegida entre *Lactobacillus* y al menos un reductor de la formación de gas elegido entre acerola, granada, arándano rojo americano, aronia, grosella negra, espino cerval, endrina o saúco, o cualquier combinación de los mismos, y un zumo de frutas primario y opcionalmente un zumo de frutas secundario, y opcionalmente agua.

45 En conformidad con los experimentos que se han realizado siguientes, se ha demostrado que los reductores de la formación de gas descritos en el presente documento (incluido el zumo de acerola como se reivindica) reducen la formación de dióxido de carbono en bebidas de zumo en presencia de una cepa de *Lactobacillus* (incluyendo el *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, en combinación con *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434, según se reivindica) y de un zumo de frutas que contiene altas cantidades de ácidos orgánicos, ácido cítrico o ácido málico, por ejemplo, zumo de naranja (como se reivindica) o zumo de manzana (como se describe de otro modo en el presente documento). Como se ha descrito anteriormente y en las fig. 1-3, la cepa de *Lactobacillus* metaboliza estos ácidos orgánicos en dióxido de carbono y ácido acético y ácido láctico, respectivamente, en gran medida en los casos normales. Sin embargo, en conformidad con la presente invención, la producción de dióxido de carbono se ha reducido en presencia del particular reductor de la formación de gas, el zumo de acerola, como se menciona en el presente documento.

55 Por tanto, por las observaciones que se han hecho, se ha descubierto ahora, sorprendentemente, que es posible proporcionar una bebida de zumo de frutas probiótica, que es un zumo de naranja probiótico como se reivindica. La presente invención ha satisfecho una necesidad planteada desde hace tiempo en el ámbito técnico de los probióticos, dado que antes no había sido posible fabricar un producto de la presente invención.

60 En el presente contexto, la expresión "reductor de la formación de gas" pretende describir que la cantidad de gas, preferentemente dióxido de carbono, se reduce en el producto de zumo en comparación con un producto sin la adición del reductor de la formación de gas. Otros indicios del hecho de que se ha reducido la cantidad de dióxido de carbono son que el producto ya no está gasificado ni es efervescente, tal como una bebida gaseosa, y que el hinchamiento del envase no tiene lugar durante la duración del producto del producto. Añadiendo el zumo de acerola reductor de la formación de gas como se reivindica, a un zumo de frutas primario, un zumo de naranja como se reivindica, en

presencia de probióticos de acuerdo con la invención (el *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, en combinación con *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434, como se reivindica) el zumo se transforma a un estado en que el dióxido de carbono no se produce en un grado tan alto como anteriormente. La formación de diacetilo como sabor desagradable también se puede reducir en el presente contexto, especialmente por la presencia del probiótico

5 *Lactobacillus paracasei* en la bebida de zumo (*Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434, según se reivindica). Cuando *Lactobacillus paracasei* metaboliza el citrato, se forma diacetilo. El diacetilo en una bebida de zumo tiene un sabor desagradable. Se ha observado en los experimentos realizados que el sabor desagradable provocado por el diacetilo se ha reducido en una bebida de zumo como se divulga en el presente documento.

10 Por lo tanto, se pueden fabricar un zumo de frutas probiótico definido en las reivindicaciones, con una duración del producto larga y buen sabor.

De acuerdo con la presente invención, el reductor de la formación de gas es el zumo de acerola.

15 Por lo demás, en el presente documento se describen bebidas de zumos de frutas probióticas en donde los reductores de la formación de gas se eligen entre granada, arándano rojo americano, aronia, grosella negra, espinillo, endrino o saúco, o cualquier combinación de los mismos. Estos reductores pueden añadirse en forma de concentrado de fruta o de fruta pura, o en forma de zumo. Si se utiliza un concentrado de fruta del reductor de gas, por ejemplo, acerola, se suele añadir agua al concentrado para que éste se diluya hasta una concentración que sea igual o parecida al zumo de frutas original. El nombre científico de la granada es *Punica granatum* L. El nombre científico de la Acerola es

20 *Malpighia emarginata* DC, pero también se denomina en ocasiones *Malpighiaceae puniceifolia* L. y *M. glabra* L. El nombre científico del arándano rojo americano es *Vaccinium macrocarpon*.

Por lo demás, en el presente documento también se describe una bebida de zumo de frutas probiótica en donde el

25 zumo de frutas primario es un zumo de cítrico, en donde el zumo de cítrico se elige de zumo de naranja, zumo de limón, zumo de pomelo y zumo de lima, o donde el zumo de frutas primario es un zumo de fruto de pepitas, en donde el zumo de frutas de fruto de pepitas se elige de zumo de manzana y zumo de pera.

Las bacterias probióticas en el zumo de frutas probiótico de acuerdo con la presente invención son *Lactobacillus*

30 *plantarum* HEAL 9, DSM 15312, en combinación con *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434.

Por lo demás, en el presente documento se describe una bebida de zumo de frutas probiótica en donde al menos una especie de bacterias probióticas se elige del grupo que comprende *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus paracasei*. Otras especies de *Lactobacillus* también descritas en el presente documento son

35 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus reuteri*.

Por lo demás, en el presente documento también se describe que la al menos una especie de *Lactobacillus plantarum* se elige preferentemente del grupo que comprende *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y

40 *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316.

Las cepas de *Lactobacillus plantarum* mencionadas anteriormente se han depositado en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen von Zellkulturen GmbH. *Lactobacillus plantarum* 299, número de depósito DSM 6595, se depositó el 16 de marzo de 1995. *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316 se depositó el 28 de noviembre de 2002.

45

Las bacterias probióticas en el zumo de frutas probiótico de acuerdo con la presente invención son *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, en combinación con *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434.

50 Por lo demás, en el presente documento se describe que la al menos una especie de *Lactobacillus paracasei* se elige preferentemente del grupo que comprende *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434 y *Lactobacillus paracasei* 02A, DSM 13432. *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434 y *Lactobacillus paracasei* 02A, DSM 13432, se depositaron el 6 de abril de 2000 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen von Zellkulturen GmbH.

55 Por lo demás, en el presente documento también se describe que la al menos una especie de *Lactobacillus rhamnosus* se elige preferentemente de *Lactobacillus rhamnosus* 271, DSM 6594. *Lactobacillus rhamnosus* 271, DSM 6594 y *Lactobacillus plantarum* 299v, número de depósito DSM 9843, se depositaron en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen von Zellkulturen GmbH el 25 de marzo de 1996.

60 La *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, en combinación con *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434, como se reivindica, pueden estar presentes en la bebida de zumo de frutas de acuerdo con la invención en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  UFC por ración (250 ml), preferentemente de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  UFC por ración, y más preferentemente de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC por ración. UFC significa número de unidades formadoras de colonias de

65 bacterias viables por ración.

- 5 Por lo demás, en el presente documento se describe una bebida de zumo de frutas probiótica en donde la al menos una especie de probiótico *Lactobacillus* está presente en la bebida de zumo de frutas en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  UFC por ración (250 ml), preferentemente de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  UFC por ración, y más preferentemente de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC por ración. UFC significa número de unidades formadoras de colonias de bacterias viables por ración.
- 10 Por lo demás, en el presente documento también se describe una bebida de zumo de frutas probiótica en donde el zumo de frutas secundario se elige de zumo de piña, mango, plátano, uva blanca, melocotón, albaricoque, fruta de la pasión, sandía, frambuesa, fresa, arándano azul, mora, kiwi, guayaba o cualquier mezcla de los mismos. Como se describe por lo demás en el presente documento, el zumo de frutas secundario tiene la función de afectar el sabor de la bebida de frutas en un caso en que, por ejemplo, el sabor del reductor de la formación de gas es demasiado distinto.
- 15 Por lo demás, en el presente documento también se describe una bebida de zumo de frutas probiótica en donde la bebida de zumo de frutas contiene adicionalmente agua para proporcionar un producto más diluido y rentable.
- 20 De acuerdo con la presente invención, el zumo de naranja y el zumo de acerola juntos suman el 100 % (p/p) del zumo de frutas, en donde el zumo de naranja está presente en el intervalo del 80-95 % (p/p) y el reductor de la formación de gas está presente en el intervalo del 5-20 % (p/p).
- 25 Por lo demás, en el presente documento se describe una bebida de zumo de frutas probiótica en donde la proporción del zumo de frutas primario puede estar presente en el intervalo de aproximadamente el 50-100 % (p/p), preferentemente aproximadamente el 75-100 % (p/p), y más preferentemente aproximadamente el 90-100 % (p/p), el reductor de la formación de gas puede estar presente en el intervalo de aproximadamente el 0,5-40 % (p/p), preferentemente aproximadamente el 0,5 - 30 % (p/p), y más preferentemente aproximadamente el 0,5-20 % (p/p), el agua puede estar presente en el intervalo de aproximadamente el 0-49 % (p/p), preferentemente aproximadamente el 0-30 % (p/p), y más preferentemente el 0-20 % (p/p), y el zumo de frutas secundario está presente en el intervalo del 0-10 % (p/p), preferentemente el 0-5 % (p/p).
- 30 Por lo demás, en el presente documento también se describe una bebida de zumo de frutas probiótica en donde se añade adicionalmente vitamina C a la bebida de zumo. Esto se hace en casos en los que, por ejemplo, una proporción de la vitamina C en los zumos naturales presente se pierde durante la producción.
- 35 Por lo demás, en el presente documento también se describe una bebida de zumo de frutas probiótica, en donde el zumo de frutas es zumo de manzana y el reductor de la formación de gas es zumo de granada y la cepa de *Lactobacillus* es *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* o *Lactobacillus paracasei*. Por tanto, un zumo de frutas el 100 % de manzana y granada con la adición de bacterias probióticas también se describe por lo demás en el presente documento.
- 40 Por lo demás, en el presente documento también se describe una bebida de zumo de frutas probiótica, en donde el zumo de frutas es zumo de naranja y el reductor de la formación de gas es zumo de acerola y la cepa de *Lactobacillus* es *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, o *Lactobacillus paracasei*. Por tanto, un zumo de frutas el 100 % de naranja y acerola con la adición de bacterias probióticas también se describe por lo demás en el presente documento.
- 45 De acuerdo con la presente invención, la bebida de zumo de frutas es un zumo de frutas al 100 % que contiene, además del 100 % de zumo de frutas, solo probióticos. Un zumo de frutas al 100 % es un líquido que se encuentra de forma natural en la fruta o en el tejido de la fruta. El zumo se prepara exprimiendo o macerando mecánicamente frutas frescas sin la aplicación de calor ni disolventes. Por ejemplo, el zumo de naranja es el extracto líquido del fruto del naranjo. El zumo puede prepararse en casa a partir de frutas y verduras frescas utilizando diversos exprimidores manuales o eléctricos. Muchos zumos comerciales se filtran para eliminar la fibra o la pulpa, pero el zumo de naranja fresco con alto contenido de pulpa es una bebida popular. El zumo puede comercializarse en forma concentrada, en ocasiones congelado, requiriendo que el usuario añada agua para reconstituir el líquido a su "estado original". En la fabricación de un zumo de frutas de la presente invención se puede utilizar un tipo de zumo fresco, así como un tipo
- 50 de zumo concentrado, de modo que el producto de zumo final en ambos casos se encuentre dentro de la definición de un zumo de frutas al 100 % que contenga adicionalmente sólo probióticos. En el contexto actual, esto significaría que se proporciona un zumo de frutas al 100 % de naranja y acerola con las especies probióticas reivindicadas de *Lactobacillus*, en una cantidad como se describe en el presente documento.
- 55
- 60 Por lo demás, se describe en el presente documento un zumo de fruta al 100 % de manzana y granada con una especie probiótica de *Lactobacillus*, como se describe en el presente documento, en una cantidad como se describe en el presente documento.
- 65 La mayoría de los países definen una pureza como criterio para que una bebida se considere un "zumو de frutas". Este nombre se reserva comúnmente para bebidas que son zumo de frutas el 100 % puro. En el presente contexto, el zumo de frutas al 100 % es un zumo de frutas el 100 % puro con la adición de probióticos en las cantidades que se

describen en el presente documento.

En el caso de utilizar un concentrado en el procedimiento de fabricación de la bebida de zumo de frutas de la presente invención, en determinados casos puede ser beneficioso añadir sabores y/o aromas adicionales al producto. Se sabe que en el procedimiento de fabricación de un concentrado de fruta se pierden compuestos volátiles de sabor y el zumo puede tener un sabor plano y a cocido. Añadir tales sabores o aromas adicionales al producto final restablece el sabor fresco del zumo. Dichas adiciones están dentro del alcance de la presente invención ya que la función de estas adiciones es restablecer el sabor original del zumo de frutas al 100 % o de la bebida de zumo de frutas. Mastertaste Inc. EE.UU. fabrica ejemplos de tales sabores adicionales, y los ejemplos que pueden mencionarse en este caso son OR4687 (Orange Juice Flavor Special 4687), OR4692 (Orange Add-back Special 4692), OR4914 (Orange Oil Blend 4914), OR5001 (Orange Aroma), OR5010 (Orange Aroma Premium 10).

### Descripción detallada de las realizaciones de la invención

En la medida en que cualquiera de los siguientes ejemplos quede fuera del alcance de las presentes reivindicaciones, se incluyen únicamente como ejemplos comparativos.

#### Parte experimental

#### 20 Producción de zumo de frutas probiótico

Los distintos componentes de las bebidas de zumo de frutas (reductor de la formación de gas, zumo primario y opcionalmente zumo secundario) se mezclaron a las concentraciones proporcionadas a continuación y se pasteurizaron (85 °C, 15 segundos) y posteriormente se enfriaron a 8 °C. Sin embargo, en una producción a gran escala la pasteurización se haría a 92 °C, 10 segundos.

Después de enfriar la mezcla de zumo de frutas, se añadieron las bacterias liofilizadas (Probi AB) para proporcionar una concentración de entre  $0,1 \times 10^9$  -  $10 \times 10^9$  ufc (unidades formadoras de colonias)/250 ml de zumo. El zumo de frutas probiótico resultante se mezcló bien antes de envasarlo.

Los zumos de frutas se almacenaron a 4 °C u 8 °C para la prueba de estabilidad y evaluación sensorial, durante 10 semanas y 6 semanas, respectivamente.

Para determinar la capacidad de los zumos de frutas para formar dióxido de carbono y mal sabor durante el almacenamiento, se utilizó una prueba de duración del producto acelerada (Skånemejerier, Suecia) (5 días, 25 °C). Esta es una prueba predictiva para evaluar si determinadas mezclas de zumos pueden desarrollar mal sabor y formación de gas. Si la concentración de CO<sub>2</sub> es inferior al 25 %, se considera que el producto no provocará formación de gas cuando se almacene a 4 °C u 8 °C durante 10 semanas y 6 semanas respectivamente.

Se llenaron botellas de plástico de 350 ml con 250 ml de cada zumo de frutas probiótico. A continuación, las botellas se incubaron durante 5 días a 25 °C. Después de los 5 días de incubación se midió la concentración de CO<sub>2</sub> (Check point II, PBI Dansensor) en el espacio libre. Después de finalizar las medidas de CO<sub>2</sub> se abrieron las botellas y se realizó una evaluación sensorial de los zumos. Se realizaron ensayos adicionales de duración del producto en los zumos de frutas en que el dióxido de carbono estaba por debajo del 25 % a 4 °C u 8 °C durante 10 y 6 semanas, respectivamente. El recuento de células se midió de acuerdo con el método convencional utilizado en Skånemejerier, Suecia. Esto incluye analizar las muestras mediante el método de recuento de placas (3 días, 37 °C) en agar MRS el día 14 (Skånemejerier, Suecia).

#### 50 El efecto reductor de los distintos reductores de la formación de gases añadidos en el zumo de naranja sobre las bacterias probióticas.

Se añadieron distintos reductores de la formación de gas (arándano rojo americano, arándano rojo, acerola) a un zumo primario (zumo de naranja) y se añadieron bacterias probióticas después de un tratamiento térmico (véase arriba la configuración experimental). La formación de dióxido de carbono y la evaluación sensorial se midieron en una prueba de duración del producto acelerada después de 5 días de incubación a 25 °C (Tabla 1). Solo la acerola tuvo el potencial de inhibir la formación de gas y de sabor desagradable. Se siguió la estabilidad en el almacenamiento en el zumo de naranja con acerola durante 6 semanas a 8 °C (Fig. 3). Las bacterias permanecieron estables durante toda la duración del producto y no se notó ningún sabor desagradable. La Tabla 1 muestra la evaluación de las propiedades sensoriales y la formación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en zumos con o sin distintos "reductores de la formación de gas" añadidos. Los zumos se inocularon con una cantidad total de  $5 \times 10^6$  ufc/ml de *L. plantarum* HEAL 9 y *L. paracasei* 8700:2.

Tabla 1

Componentes del zumo (% en peso)	evaluación sensorial	CO <sub>2</sub> (%)
100 % de zumo de naranja	+	45
zumo 20 % de arándano rojo americano + 80 % de naranja	+	40
zumo 20 % de arándano rojo + 80 % de naranja	+	38
zumo 10 % de acerola + 90 % de naranja	OK	20
+ indica una viscosidad desagradable del producto OK indica una sensación agradable.		

Se realizaron experimentos adicionales con distintas adiciones de acerola, al 5 %, 10 %, 15 % y 20 % (en peso) al zumo de naranja. Se añadió al zumo un total de  $1 \times 10^9$  ufc de *L. plantarum* HEAL 9 y *L. paracasei* 8700:2 y se midió el dióxido de carbono después de 5 días a 25 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Zumo	pH	CO <sub>2</sub>	Evaluación sensorial
95 % de zumo de naranja /5 % de acerola	3,9	<25 %	OK
90 % de naranja/10 % de acerola	3,8	<25 %	OK
85 % de naranja/15 % de acerola	3,8	<25 %	OK
80 % de naranja/20 % de acerola	3,8	<25 %	OK
+ indica una viscosidad desagradable del producto. Ok indica sensación agradable.			

10 Experimento con la adición de distintas cantidades de zumo de arándano rojo americano o granada al zumo de manzana.

Se añadieron distintas cantidades de reductores de la formación de gas (arándano rojo americano) a las muestras de zumo primario (zumo de manzana). Se realizó una evaluación sensorial y la medición de la formación de dióxido de carbono en el zumo en una prueba de duración del producto acelerada después de 5 días de incubación a 25 °C, véase la Tabla 3. El metabolismo de las bacterias probióticas se ralentizó sin una reducción de su viabilidad en un estrecho intervalo de una adición del 0,75 - 1,5 % de reductor de la formación de gas (arándano rojo americano) (Tabla 3 y Figura 4). Más allá de este intervalo estrecho, las bacterias se vieron inhibidas por el arándano rojo americano o crecieron excesivamente, lo que provocó la formación de un sabor desagradable. Además, se estudió el efecto de otro reductor de la formación de gas añadido (zumo de granada). La adición de zumo de granada ralentizó el metabolismo y la formación de dióxido de carbono, que estaba por debajo del 25 %.

25 La Tabla 3 muestra la formación de dióxido de carbono y la evaluación sensorial y la supervivencia después de 3 semanas a 8 °C en un zumo de manzana probiótico con distinta cantidad de arándanos rojos americanos. Los zumos se inocularon con  $5 \times 10^6$  ufc/ml de *L. plantarum* HEAL 9 y *L. paracasei* 8700:2.

Arándano rojo americano (% en peso)	CO <sub>2</sub> (%)	Evaluación sensorial	UFC después de 3 semanas
0	33	+	
0,25	32	+	5,8E+06
0,5	31	+	3,9E+06
0,75	19	OK	3,5E+04
1,5	16,5	OK	1,9E+02
20	12,4	amargo	
+ indica una viscosidad desagradable del producto. Ok indica sensación agradable.			

La Tabla 3 a)-c) muestra la formación de dióxido de carbono en un zumo de manzana probiótico con distintas cantidades de granada. Los probióticos utilizados en los tres experimentos de zumo de manzana/granada son

*Lactobacillus plantarum* HEAL 9, *Lactobacillus paracasei* 8700:2 o *Lactobacillus rhamnosus* 271.

Tabla 3a *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, 1x10<sup>9</sup> UFC/ración.

Componentes de zumo de frutas (% en peso)	CO <sub>2</sub> (%)	Lp HEAL 9 (UFC/250 ml)
100 % de manzana/	52	6,5x10 <sup>9</sup>
99 % de manzana/1 % de granada	37	6,0 x10 <sup>9</sup>
97 % de manzana/3 % de granada	21	2,5x10 <sup>8</sup>
95 % de manzana/5 % de granada	18	1,7x10 <sup>8</sup>
93 % de manzana/7 % de granada	18	3,3 x10 <sup>8</sup>
90 % de manzana/10 % de granada	18	5,3 x10 <sup>8</sup>

5

Tabla 3b *Lactobacillus paracasei* 8700:2, 1x10<sup>9</sup> Ufc/ración.

Componentes de zumo de frutas (% en peso)	CO <sub>2</sub> (%)	L paracasei (UFC/250 ml)
100 % de manzana/	12	5,00 x10 <sup>9</sup>
99 % de manzana/1 % de granada	9	4,50x10 <sup>7</sup>
97 % de manzana/3 % de granada	9	1,00x10 <sup>7</sup>
95 % de manzana/5 % de granada	7	3,75x10 <sup>6</sup>
93 % de manzana/7 % de granada	7	2,50 x10 <sup>6</sup>
90 % de manzana/10 % de granada	7	<2,50 x10 <sup>6</sup>

Tabla 3c *Lactobacillus rhamnosus* 271, 1x10<sup>9</sup> UFC/ración.

Componentes de zumo de frutas (% en peso)	CO <sub>2</sub> (%)	L rhamnosus (UFC/250 ml)
100 % de manzana/	20	4,00 x10 <sup>9</sup>
99 % de manzana/1 % de granada	8	<2,50 x10 <sup>6</sup>
97 % de manzana/3 % de granada	7	<2,50 x10 <sup>6</sup>
95 % de manzana/5 % de granada	7	<2,50 x10 <sup>6</sup>
93 % de manzana/7 % de granada	7	<2,50 x10 <sup>6</sup>
90 % de manzana/10 % de granada	6	<2,50 x10 <sup>6</sup>

Otras bebidas de zumo de frutas probióticas que se han preparado son las siguientes.

10

Naranja/acerola (100 % de zumo)

Naranja 95 %  
Acerola 5 %

*Lactobacillus paracasei* 8700:2/*Lactobacillus plantarum* HEAL 9 presentes en una cantidad total de 1 x 10<sup>9</sup> UFC/ración

15

Manzana/arándanos rojos americanos (100 % de zumo)

Manzana 99,5 %  
Arándano rojo americano 0,5 %

*Lactobacillus paracasei* 8700:2/*Lactobacillus plantarum* HEAL 9 presentes en una cantidad total de 1 x 10<sup>9</sup> UFC/ración.

20

Impacto de la acerola en el metabolismo de distintas bacterias probióticas en zumo de naranja y zumo de manzana.

Se añadieron distintas cantidades de un reductor de la formación de gas (acerola; el 5, 10, 20 o 30 % en peso) a un zumo primario (zumo de naranja). Después de mezclar el reductor de la formación de gas y el zumo primario, los

zumos resultantes se trataron térmicamente de acuerdo con la configuración experimental anterior. A las mezclas de zumos de frutas se les inocularon a continuación bacterias probióticas (la mezcla de *Lactobacillus plantarum* HEAL 9 y *Lactobacillus paracasei* 8700:2; *Lactobacillus plantarum* HEAL 9; *Lactobacillus plantarum* 299v o *Lactobacillus rhamnosus* 271).

5 Se espera que otros reductores de la formación de gas actúen reduciendo la producción de dióxido de carbono. Por lo tanto, los reductores de la formación de gas aronia, grosella negra, espino cerval o saúco se analizarán en experimentos de bebidas de zumo con cualquiera de los zumos primarios, tales como zumo de naranja, zumo de limón, zumo de pomelo, zumo de lima, zumo de manzana o zumo de pera, en presencia de probióticos.

10 En un experimento adicional, se produjo zumo de naranja con aronia (5 %) o endrina (5 %) y se comparó con un zumo de naranja puro. Se utilizaron *Lactobacillus plantarum* HEAL 9 y *Lactobacillus paracasei* 8700 como probióticos en todos los zumos. La cantidad añadida de cada bacteria fue de  $2 \times 10^6$  UFC/ml.

15 Las UFC se midieron semanalmente y se realizó una evaluación sensorial después de 1 semana y 3 semanas, respectivamente.

	UFC/ml, 1 s	UFC/ml, 2 s	UFC/ml, 3 s	Evaluación sensorial a 1 s	Evaluación sensorial a 3 s
Zumo de naranja	$7,4 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7$	$7,7 \times 10^7$	OK	Formación de gas, diacetilo
Naranja + 5 % de aronia	$6,7 \times 10^6$	$3,7 \times 10^7$	$8,2 \times 10^7$	OK	OK, ácida suave
Naranja + 5 % de saúco	$6,6 \times 10^6$	$3,7 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$	OK	OK, ácida suave

20 El zumo de naranja con el 5 % de aronia o el 5 % de saúco se encontraba bien (*ok*) tanto después de 1 semana como después de 3 semanas, sin producción de gas, a diferencia del zumo de naranja puro que tenía un sabor desagradable a diacetilo después de 3 semanas y también había producido gases indeseables. La aronia y el endrino, respectivamente, inhiben el metabolismo, pero no el crecimiento de los probióticos presentes, como puede observarse en la tabla anterior.

25 Producción a gran escala de zumo de naranja probiótico

Se produjo un zumo de naranja probiótico con y sin el 5 % de acerola a una gran escala de 5000 litros. Se utilizaron como probióticos *Lactobacillus plantarum* HEAL 9 y *Lactobacillus paracasei* 8700.

30 Se siguió la estabilidad del zumo durante varias semanas. Después de la producción, el zumo se envasó en envases de 1 litro y se almacenó a 8 °C.

	UFC/ml al inicio	UFC/ml, 1 semana	UFC/ml, 2 semanas	UFC/ml, 3 semanas	UFC/ml, 4 semanas
Naranja	$4,9 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$	$2,9 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
Naranja + el 5 % de acerola	$2,9 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$5,3 \times 10^5$	$7,9 \times 10^6$	$4,6 \times 10^7$
	Eval. sensorial 1 semana	Eval. sensorial 2 semana	Eval. sensorial 3 semana	Eval. sensorial a 4 semanas	
Zumo de naranja		Gas, diacetilo	Gas, diacetilo	Gas, diacetilo	
Naranja + el 5 % de acerola	OK	OK	OK	OK	

35 La producción a gran escala funciona como se esperaba, es decir, que el zumo de naranja probiótico puro produce el gas indeseable y el diacetilo, mientras que el zumo de naranja con el 5 % de acerola permanece bien (*ok*), sin problemas, con respecto a la producción de gas o diacetilo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una bebida de zumo de frutas probiótica que consiste en zumo de frutas y bacterias probióticas y opcionalmente sabores y/o aromas adicionales, en donde las bacterias probióticas son *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, en combinación con *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434;
- 10 en donde el zumo de frutas consiste en zumo de naranja y un reductor de la formación de gas que es zumo de acerola; y en donde el zumo de naranja y el zumo de acerola juntos suman el 100 % (p/p) del zumo de frutas, en donde el zumo de naranja está presente en el intervalo del 80-95 % (p/p) y el reductor de la formación de gas está presente en el intervalo del 5-20 % (p/p).
2. La bebida de zumo de frutas probiótica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las bacterias probióticas están presentes en la bebida de zumo de frutas probiótica en una cantidad de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^{12}$  unidades formadoras de colonias (UFC) por ración de 250 ml, preferentemente de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^{10}$  UFC por ración de 250 ml, y más preferentemente de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^9$  UFC por ración de 250 ml.

Fig. 1

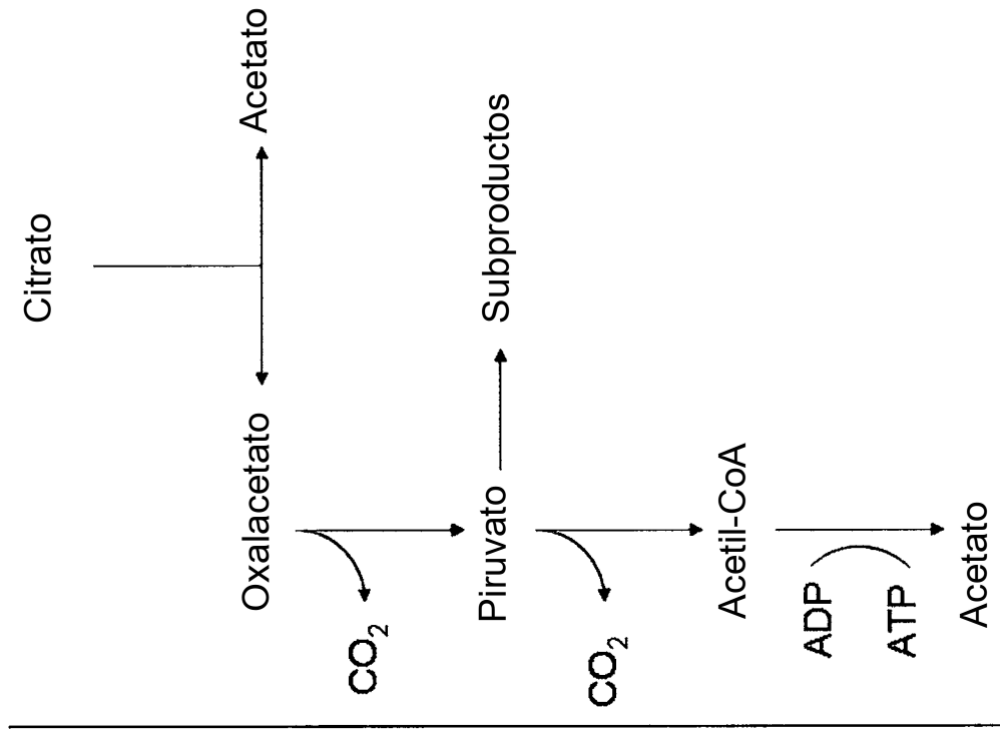


Fig. 2

Fermentación de maloláctico

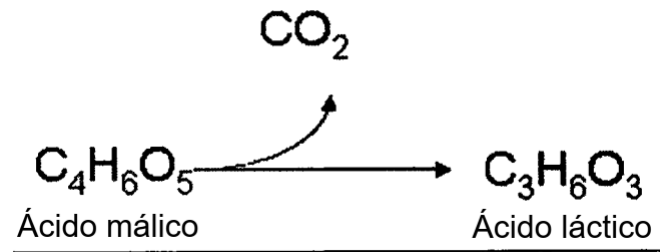


Fig. 3

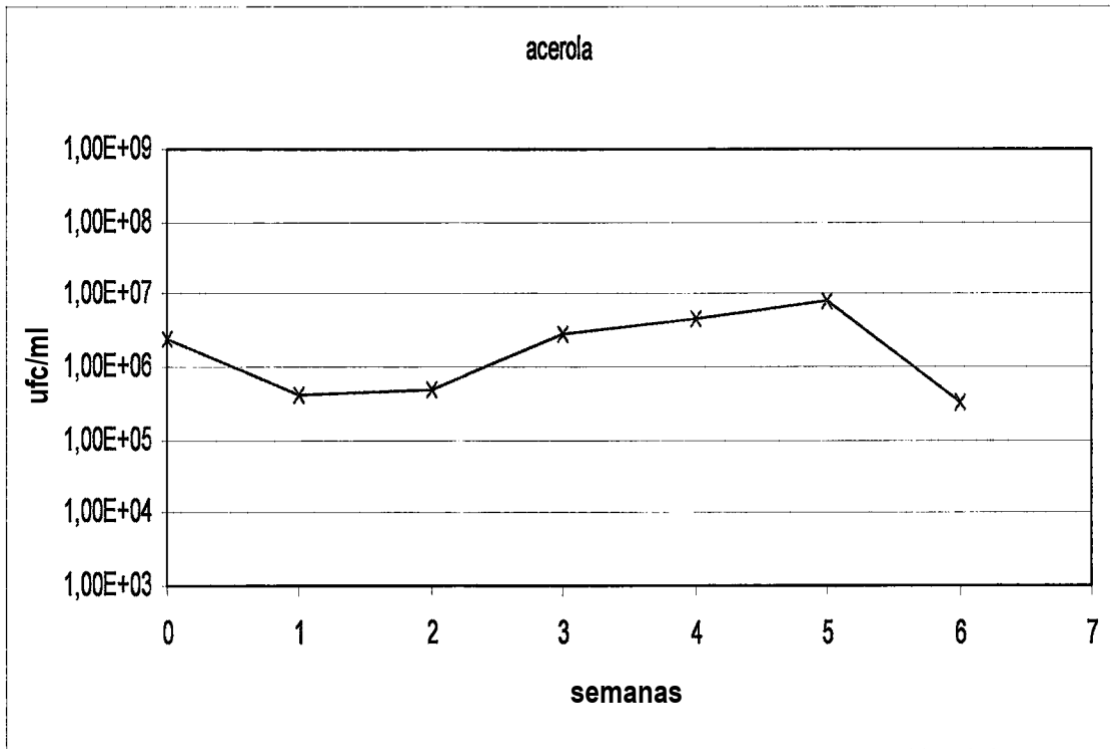


Fig. 4

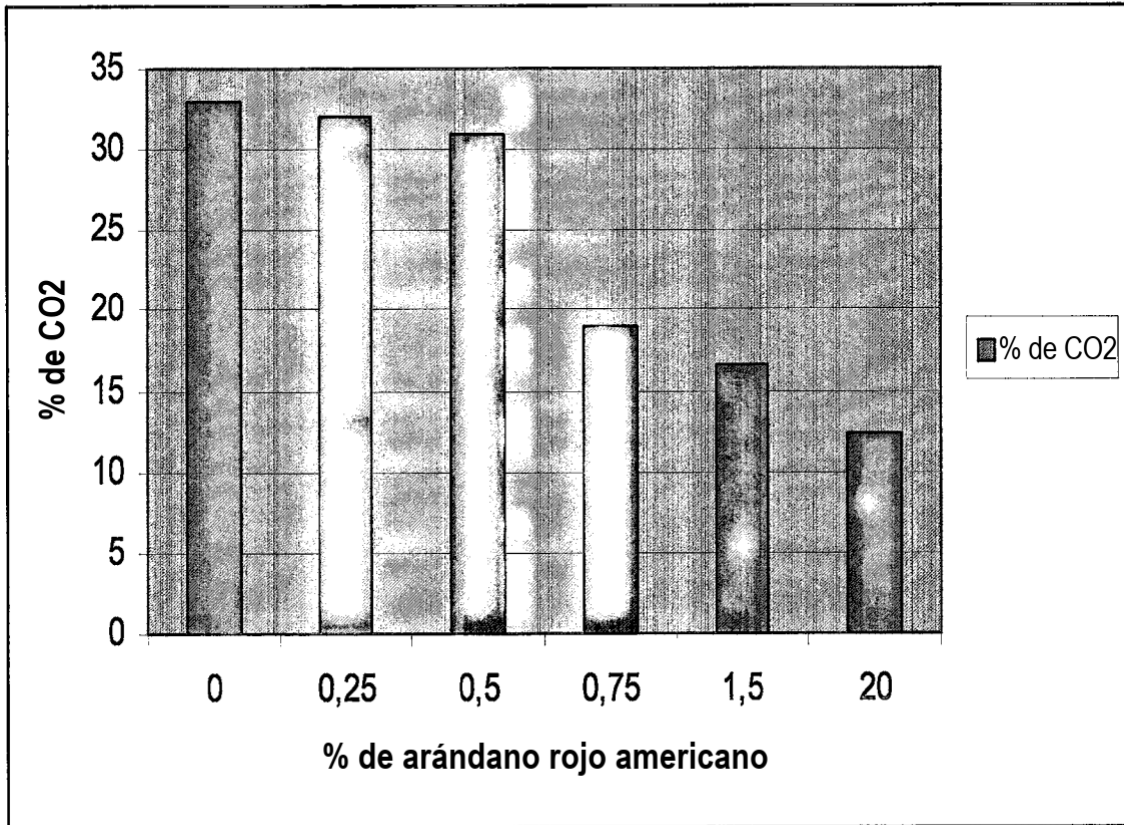


Fig. 5

