

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 331 827**

21 Número de solicitud: 200800304

51 Int. Cl.:
A23C 9/12 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **05.02.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **15.01.2010**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
15.01.2010

71 Solicitante/s:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Martínez-Villaluenga, Cristina;
Cardelle Cobas, Alejandra;
Villamiel Guerra, Mar;
Olano Villén, Agustín y
Corzo Sánchez, Nieves**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Procedimiento de elaboración de leches fermentadas con elevado contenido en oligosacáridos prebióticos, leche fermentada así obtenida.**

57 Resumen:

Procedimiento de elaboración de leches fermentadas con elevado contenido en oligosacáridos prebióticos, leche fermentada así obtenida.

La presente invención describe un procedimiento de elaboración de nuevos productos lácteos de leche fermentada (yogur, kéfir o yogur con bifidobacterias) con alto contenido en carbohidratos prebióticos originados durante un proceso de hidrólisis enzimática de la lactosa previo al proceso fermentativo. El producto resultante aporta, además de las cualidades propias de la leche fermentada, las propiedades prebióticas de los galactooligosacáridos originados ya que las cantidades de estos presentes en el producto final oscila entre 1.5 y 3.0 g/100 ml, lo que supone triplicar el contenido habitual en las leches fermentadas tradicionales. Dicho contenido en galactooligosacáridos permite que un consumo de leche fermentada en cantidades moderadas proporcione un efecto prebiótico.

ES 2 331 827 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de elaboración de leches fermentadas con elevado contenido en oligosacáridos prebióticos, leche fermentada así obtenida.

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector de los alimentos funcionales y la industria láctea, más concretamente a la obtención de leches fermentadas con alto contenido en prebióticos.

Estado de la técnica

En la actualidad el interés de los consumidores por alimentos que proporcionen efectos beneficiosos para la salud, además del aporte de nutrientes que contienen, ha llevado a la industria láctea al desarrollo de leches fermentadas a las que se les incorporan ingredientes funcionales. Entre dichos ingredientes, destacan los denominados prebióticos, definidos como aquellos ingredientes que no son digeridos y llegan al colon donde estimulan el crecimiento o la actividad de un número limitado de bacterias que son consideradas beneficiosas para la salud (Gibson G.R, Roberfroid, M.B Dietary modulation of the human colonic microflora- introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition 125, 1402-1412, 1995).

Entre la gran variedad de ingredientes prebióticos los fructooligosacáridos y los galactooligosacáridos son los más estudiados y actualmente los únicos sobre los que existe evidencia científica de sus propiedades beneficiosas (Goulas, A., Tzortzis, G., Gibson, G.R. Development of a process for the production and purification of α and β -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. Int. Dairy J., 17, 648-656, 2007). Dichos ingredientes, cuando son tomados en la dieta en cantidades de 5-20 g/día han mostrado claramente, en estudios realizados en humanos, un efecto prebiótico ya que estimulan el crecimiento de bacterias beneficiosas tales como bifidobacterias y lactobacilos (Parvez S., Malik, KA, Kang SA, Kim, HY, Probiotics and their fermented products are beneficial for health. Journal of Applied Microbiology, 100(6) 1171-1185, 2006).

También han sido descritas otras propiedades saludables tales como efecto hipocolesterolémico, prevención de cáncer de colon y favorecimiento de la absorción de calcio (Sako, T., Matsumoto, K., & Tanaka, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. International Dairy Journal, 9, 69-80,1999; Perugino, G., Trincone, A., Rossi, M., & Moracci, M., Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. Trends in Biotechnology, 22, 31-37, 2004; Tuohy, K. M., Rouzaud, G. C. M., Brück, W. M., & Gibson, G. R. Modulation of the human gut flora towards improved health using prebiotics- Assessment of efficacy. Current Pharmaceutical Design, 11, 75-90, 2005).

Las leches fermentadas son productos lácteos obtenidos por medio de la fermentación de la leche, que pueden haber sido elaborados a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en su composición por la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica). Pudiendo ser los cultivos de los microorganismos utilizados viables, activos y abundantes en los productos hasta la fecha de duración mínima dependiendo de si han sufrido o no, un tratamiento térmico después del proceso fermentativo.

Los tipos de leche fermentada se diferencian en función del cultivo (o cultivos específicos) utilizado para la fermentación, como son por ejemplo:

- *Yogur*: Cultivos simbióticos de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*.

- *Yogur en Base a Cultivos Alternativos*: Cultivos de *Streptococcus thermophilus* y toda especie *Lactobacillus*.

- *Leche Acidófila*: *Lactobacillus acidophilus*.

- *Kefir*: Cultivo preparado a partir de gránulos de kefir, *Lactobacillus kefir*, especies del género *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter* que crecen en una estrecha relación específica.

Los gránulos de kefir constituyen tanto levaduras fermentadoras de lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) como levaduras fermentadoras sin lactosa (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces exiguus*).

- *Kumys*: *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Kluyveromyces marxianus*.

Podrán agregarse otros microorganismos aparte de los que constituyen el cultivo específico (o los cultivos específicos) especificados anteriormente.

A su vez, existen dos subtipos de leche fermentada concentrada y aromatizada. La primera es un tipo de leche fermentada cuya contenido proteico presenta un mínimo del 5,6%. Dentro de este grupo se incluyen productos tradicionales tales como Stragisto (yogur colado), Labneh, Ymer e Ylette.

ES 2 331 827 A1

Las leches fermentadas aromatizadas contienen un máximo del 50% (w/w) de ingredientes no lácteos (tales como carbohidratos nutricionales y no nutricionales, frutas y verduras así como jugos, purés, pastas, preparados y conservadores derivados de los mismos, cereales, miel, chocolate, frutos secos, café, especias y otros alimentos aromatizantes naturales e inocuos) y/o sabores. Los ingredientes no lácteos pueden ser añadidos antes o luego de la fermentación (CODEX STAN 243-2003). Durante la elaboración de las leches fermentadas, se originan galactooligosacáridos prebióticos en cantidades que oscilan entre 0.26 y 0.71% dependiendo de los microorganismos utilizados (Joung HK, Cheong WJ, Simultaneous quantitative determination of mono-, di-, tri-, tetra-, and pentasaccharides in yogurt products by a simple HPLC system with a refractive index detector. Bull. Korean Chem. Soc. 22, 1, 123-126, 2001; Lamoureux L., Roy, D., Gauthier S. F., Production of oligosaccharides in yogurt containing Bifidobacteria and yogurt cultures. J. Dairy Sci. 85, 1058-1069, 2002; Yadav, H., Jain, S, Sinha P.R.. Formation of oligosaccharides in skim milk fermented with mixed dahi cultures, Lactococcus lactis ssp. diacetylactis and probiotic strains of lactobacilli. Journal of Dairy Research, 74, 1-6. 2007. Dichos contenidos se consideran insuficientes para que un consumo moderado de leche fermentada (250 ml/día) proporcione un efecto prebiótico.

En este sentido y para aumentar el contenido de oligosacáridos en las leches fermentadas que existen en el mercado, se ha llevado el procedimiento descrito en la presente invención, por el cual antes de realizar el proceso fermentativo para la elaboración de la leche fermentada, se lleva a cabo un proceso de hidrólisis enzimática de la lactosa en condiciones que den lugar a la formación de cantidades estimables de oligosacáridos, de modo que un consumo moderado de leche fermentada (250 ml) proporcione un efecto prebiótico apreciable.

Descripción de la invención

Descripción breve

Un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento para la obtención de una leche fermentada con alto contenido en oligosacáridos, caracterizado por comprender las siguientes etapas:

- a) preparación de leche concentrada con un contenido lactosa de al menos, de 80 g/L,
- b) pasteurización,
- c) enfriamiento, preferentemente hasta 60°C,
- d) hidrólisis con una lactasa y agitación,
- e) adición leche líquida y ajuste del extracto seco,
- f) homogenización,
- g) pasteurización,
- h) adición de Fermento de Bacterias Lácticas y/o bifidobacterias,
- i) mantenimiento a 40-45°C preferentemente hasta alcanzar el pH deseado.

Un caso particular de la invención es que en la etapa de hidrólisis del procedimiento se utiliza una lactasa de origen natural, procedente de un microorganismo.

Otro caso más particular de la invención es que el origen de la lactasa es un hongo, preferentemente *Aspergillus oryzae*.

Otro caso más particular de la invención es que el origen de la lactasa es una levadura, preferentemente *Kluyveromyces lactis*.

Otro caso particular de la invención es que en el fermento añadido comprende una mezcla de Lactobacilos y/o Streptococos y/o bifidobacterias.

Otro objeto de la presente invención es una leche fermentada elaborada según el procedimiento de la invención, caracterizado por presentar una cantidad de galactooligosacáridos en el producto final que oscila entre 1.5 y 3.0 g/100 ml.

Descripción detallada

La presente invención consiste fundamentalmente en un nuevo procedimiento para la obtención de un alto contenido en oligosacáridos durante la preparación de nuevos productos lácteos de leche fermentada (yogur, kéfir o yogur con bifidobacterias), cuya novedad radica en un proceso de hidrólisis enzimática previo al proceso fermentativo. En dicha hidrólisis la lactosa es degradada a partir de una lactasa comercial procedente de distintos orígenes naturales, liberándose de esa manera una molécula de D-glucosa y D-galactosa.

ES 2 331 827 A1

Las ventajas que presenta el procedimiento de la invención es que por una parte, es un proceso económicamente viable, ya que se emplean enzimas comerciales comúnmente utilizadas en la industria láctea y el producto resultante de dicho procedimiento, aporta las cualidades propias de la leche fermentada y las propiedades prebióticas de los galactooligosacáridos originados tras dicho proceso, puesto que la cantidad de los galactooligosacáridos presentes en el producto final es superior a 1.5 g/100 ml, lo que supone triplicar el contenido en leche fermentadas comerciales.

La lactasa posee actividades glicosidasa y transglicosidasa de modo que al romper el enlace β -(1-4) entre la lactosa y la glucosa debido a la actividad β -galactosidasa, parte de la lactosa liberada se une a otras moléculas de lactosa dando lugar a la formación de galactooligosacáridos con actividad prebiótica.

Para llevar a cabo el proceso de la presente invención se prepara una leche concentrada bien mediante disolución de leche en polvo en leche líquida o mediante evaporación de leche líquida de modo que el contenido en lactosa de la mezcla sea igual o superior a 80 g/L y a continuación se somete a un proceso de pasteurización. Una vez pasteurizada la leche, se enfría hasta alcanzar temperaturas inferiores a los 60°C y se le añade el enzima (lactasa), manteniéndose en agitación durante varias horas, hasta alcanzar la máxima producción de oligosacáridos.

Una vez hidrolizada la mezcla, se añade leche líquida para ajustar el extracto seco a los porcentajes requeridos según el tipo de leche fermentada que se desee, se homogeniza y se pasteuriza a continuación. A la mezcla enfriada se añaden los cultivos iniciadores cuya naturaleza dependerá del tipo de leche fermentada que se pretenda elaborar. En el caso del yogur tradicional se utilizan los cultivos comerciales compuestos por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* aunque también pueden utilizarse otras bacterias lácticas tales como *Lactococcus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y distintas especies de bifidobacterias. A continuación se incuba a 40-45°C durante varias horas hasta alcanzar un valor de pH que oscila entre 4.8-3.8 y se lleva a cámara frigorífica donde se almacena a temperaturas entre 2-7°C.

La cantidad de galactooligosacáridos presentes en el producto final oscila entre 1.5 y 2.0 g/100 ml, lo que supone triplicar el contenido habitual en las leches fermentadas tradicionales.

La principal característica de esta innovación consiste en que antes de realizar el proceso fermentativo para la elaboración de la leche fermentada, se lleva a cabo un proceso de hidrólisis enzimática de la lactosa en condiciones que den lugar a la formación de cantidades apreciables de oligosacáridos, de modo que un consumo moderado de leche fermentada (250 ml) proporcione un efecto prebiótico.

Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1

Se disuelve leche en polvo en leche líquida hasta alcanzar un contenido de lactosa en la mezcla de 250 g/L. La mezcla se pasteriza a 72°C durante 20 segundos y una vez enfriada se le añaden 2.5 U/ml de Lactozym (lactasa de *Kluyveromyces lactis*) y se mantiene en agitación durante 1.5 horas a 40°C. A continuación se añade leche líquida hasta ajustar el contenido en sólidos totales a un valor aproximado del 13%, se homogeniza y se vuelve a pasteurizar. Una vez enfriado, se inocula con un 1.5% de un cultivo compuesto por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en una proporción 1:1 y se incuba a 43°C durante 4 horas al cabo de las cuales se refrigera a 5°C. El contenido en galactooligosacáridos en el producto final es de 2.0 g/100 ml.

Ejemplo 2

Se prepara la mezcla de leche líquida y leche en polvo como en el ejemplo anterior pero con un contenido final de 200 g/L de lactosa. Una vez pasterizada y enfriada se le añaden 2.5 U/ml de Lactozym (lactasa de *Kluyveromyces lactis*) y se mantiene en agitación durante 2 horas a 40°C. A continuación se añade leche líquida hasta ajustar el contenido en sólidos totales a un valor aproximado del 13%, se homogeniza y se vuelve a pasteurizar. Una vez enfriado, se inocula con un 1.5% de un cultivo compuesto por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en una proporción 1:1 y se incuba a 43°C durante 4 horas al cabo de las cuales se refrigera a 5°C. El contenido en galactooligosacáridos en el producto final es de 1.75 g/100 ml.

Ejemplo 3

Se evapora leche líquida hasta un tercio de su volumen inicial y se pasteuriza como en el ejemplo anterior. Una vez pasterizada y enfriada se le añaden 2 U/ml de Lactozym (lactasa de *Kluyveromyces lactis*) y se mantiene en agitación durante 2 horas a 40°C. A continuación se añade leche líquida hasta ajustar el contenido en sólidos totales a un valor aproximado del 13%, se homogeniza y se vuelve a pasteurizar. Una vez enfriado, se inocula con un 1.5% de un cultivo compuesto por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en una proporción 1:1 y se incuba a 43°C durante 4 horas al cabo de las cuales se refrigera a 5°C. El contenido en galactooligosacáridos en el producto final es de 1.50 g/100 ml.

ES 2 331 827 A1

Ejemplo 4

Una mezcla de leche líquida y leche en polvo un contenido de 200 g/L de lactosa se pasteriza y una vez enfriada se le añaden 2.5 U/ml de lactasa (de *Aspergillus oryzae*) y se mantiene en agitación durante 2 horas a 40°C. A continuación se añade leche líquida hasta ajustar el contenido en sólidos totales a un valor aproximado del 13%, se homogeniza y se vuelve a pasteurizar. Una vez enfriado, se inocula con un 1.5% de un cultivo compuesto por *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium bifidum* y se incuba a 43°C durante 4 horas al cabo de las cuales se refrigera a 5°C. El contenido en galactooligosacáridos en el producto final es de 1.70 g/100 ml.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 331 827 A1

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la obtención de una leche fermentada con alto contenido en oligosacáridos, **caracterizado** por comprender las siguientes etapas:

- a) preparación de leche concentrada con un contenido lactosa, al menos, de 80 g/L,
- b) pasteurización,
- 10 c) enfriamiento, preferentemente hasta 60°C,
- d) hidrólisis con una lactasa y agitación,
- 15 e) adición leche líquida y ajuste del extracto seco,
- f) homogenización,
- g) pasteurización,
- 20 h) adición de Fermento de Bacterias Lácticas y/o bifidobacterias,
- i) mantenimiento a 40-45°C durante 3-4 horas, hasta alcanzar el pH deseado, preferentemente en el rango 4.8-3.8.

25 2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque en la etapa de hidrólisis de d) se utiliza una lactasa de origen natural, preferentemente, procedente de un microorganismo.

30 3. Procedimiento según la reivindicación 2 **caracterizado** porque el origen de la lactasa es un hongo, preferentemente *Aspergillus oryzae*.

4. Procedimiento según la reivindicación 2 **caracterizado** porque el origen de la lactasa es una levadura preferentemente *Kluyveromyces lactis*.

35 5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque el fermento de h) comprende una mezcla de Lactobacilos y/o Streptococos y/o bifidobacterias.

40 6. Leche fermentada elaborada según el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** por presentar La cantidad de galactooligosacáridos presentes en el producto final oscila entre 1.5 y 3.0 g/100 ml.

45

50

55

60

65

70



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 331 827

② Nº de solicitud: 200800304

② Fecha de presentación de la solicitud: 05.02.2008

③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: A23C 9/12 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 4435389 A (MUTA et al.) 06.03.1984, ejemplo 6.	1-6
Y	US 2826503 A (ROBERTS et al.) 11.03.1958, columna 2, líneas 50-57; columna 3, líneas 37-40,56-59; columna 4, líneas 60-63; columna 5, líneas 16-18,40-42.	1-6
A	EP 0323201 A2 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA) 05.07.1989, página 2, líneas 40-47; página 4, línea 27.	1-6
A	JP 60041449 A (YAKULT HONSHA KK) 05.03.1985, (resumen) [on-line] [recuperado 04.12.2009] Recuperada de Base de datos EPODOC/EPO.	1-6
A	EP 458358 A1 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS AND CO., LTD) 27.11.1991, página 2, líneas 30-45.	1-6
A	EP 0529414 A1 (KUBUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA) 03.03.1993, página 2, líneas 40-50; tabla 1.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

29.12.2009

Examinador

J. López Nieto

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23C

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, FSTA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.12.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-6	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 4435389 A	06-03-1984
D02	US 2826503 A	11-03-1958
D03	EP 03223201 A2	05-07-1989
D04	JP 60041449 A	05-03-1985
D05	EP 458358 A1	27-11-1991
D06	EP 0529414 A1	03-03-1993

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención de la solicitud se refiere a un procedimiento para la obtención de leche fermentada con alto contenido en oligosacáridos.

La invención tal y como se recoge en la reivindicación 1-6 cumple con el requisito de novedad. Sin embargo, la reivindicación 1 se refiere a un procedimiento para enriquecer en oligosacáridos una leche que posteriormente se somete a fermentación láctica. Este procedimiento ya es conocido en el estado de la técnica como se demuestra tanto en D01(ejemplo 6) como en D02 (pág.2, lin.40-47; pág.4, lín.27). Por otra parte, ya está descrita en D03 la hidrólisis de la lactosa con lactasa de origen microbiano, siguiendo básicamente las mismas etapas que en el procedimiento reivindicado:

-concentración de la leche de partida (col.2, lin.50-lin.57)

-pasteurización (col.3, lin.37-40; lín.56-59) -hidrólisis con lactasa (col.4, lín.60-63)

-pasteurización (col.5, lín.14-18; lín.40-42)

Resultaría obvio para un experto en la materia aplicar las etapas descritas en D03 al proceso descrito en los documentos D01o D02 de modo que se obtenga un procedimiento para enriquecer una leche en oligosacáridos que posteriormente se somete a fermentación láctica de acuerdo con la reivindicación 1. Los valores de pH , temperatura y tiempos de fermentación a que se refiere el apartado i. son parámetros evidentes que un experto en la materia seleccionaría según las circunstancias, sin el ejercicio de actividad inventiva, para resolver el problema planteado. En consecuencia la reivindicación 1 carece de actividad inventiva.

Tanto D01(ejemplo 6) como D02(tabla 1) describen lactasas de origen microbiano. Por lo tanto, las reivindicaciones 2, 3 y 4 no aportan actividad inventiva a la invención.

La reivindicación 5 se refieren a microorganismos que también son de conocimiento general en el sector lácteo por lo que su utilización no supone actividad inventiva. La reivindicación 6 está basada en el resultado que se pretende conseguir y no en características técnicas o funcionales que supongan actividad inventiva.

Así pues, la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-6 carece de actividad inventiva