



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 898**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A23C 9/123** (2006.01)

**C12R 1/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07711311 .6**

96 Fecha de presentación : **20.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1991660**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2008**

54

Título: **Bacteria de ácido láctico que proporciona una textura mejorada a productos lácteos fermentados.**

30

Prioridad: **24.02.2006 EP 06110394**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.10.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.10.2011**

73

Titular/es: **Chr. Hansen A/S**  
**Bøge Allé 10-12**  
**2970 Hörsholm, DK**

72

Inventor/es: **Janzen, Thomas y**  
**Jensen, Niels, Bang, Siemens**

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 366 898 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

Bacteria de ácido láctico que proporciona una textura mejorada a productos lácteos fermentados.

### CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] La presente invención se refiere a una bacteria novedosa de *Streptococcus thermophilus* (ST) que proporciona una textura mejorada, por ejemplo a un producto lácteo de leche fermentada.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 [0002] Muchas cepas de *Streptococcus thermophilus* sintetizan polisacáridos extracelulares (PSE). Estas moléculas pueden producirse como cápsulas estrechamente asociadas a la célula, o se pueden liberar en el medio en forma de líquido viscoso disuelto (es decir, polisacárido "gelatinoso"). Aunque la presencia de exopolisacáridos no confiere ventajas evidentes para el crecimiento o la supervivencia de *S. thermophilus* en la leche, la producción in situ por medio de esta especie u otras bacterias de ácido láctico de lácteos proporciona típicamente una textura deseablemente "gelatinosa" o viscosa a los productos lácteos fermentados. El trabajo también ha demostrado que la *S. thermophilus* de producción de exopolisacáridos puede mejorar las propiedades funcionales del queso Mozzarella. Para más detalles, véase el artículo revisado de Broadbent et al. (J. dairy Sci. 86:407-423).

15 [0003] WO2004/085607A2 (Rhodia Chimie) describe una cepa de *Streptococcus thermophilus* (ST) que comprende algunos genes específicos y concretos (genes denominados "pse") implicados en la biosíntesis de PSE.

[0004] Hassan et al. (2003 J. dairy Sci. 86:1632-1638) describe dos cepas "gelatinosas" de *Streptococcus thermophilus*, CHCC3534 y CHCC3541. Ambas cepas son sensibles a los fagos.

### RESUMEN DE LA INVENCION

20 [0005] El problema que tiene que resolver la presente invención es dotar de propiedades mejoradas una nueva cepa de *Streptococcus thermophilus*, en particular con respecto a la capacidad de proporcionar una textura mejorada a productos lácteos fermentados, tales como el yogur por ejemplo, y que sea útil para la producción actual de lácteos altamente industrializada, en la que los ataques de fagos son problemáticos.

25 [0006] Como se puede observar en los ejemplos de fabricación más abajo, la nueva cepa de *Streptococcus thermophilus* (ST) descrita en la presente con el número de registro DSM 17876 (también denominada CHCC8833 en la presente) proporciona una textura mejorada (medida como tensión de cizallamiento) en comparación con las cepas pertinentes de ST disponibles en el mercado que se consideran cepas que proporcionan una gran textura y que habitualmente se usan en la industria láctea. La nueva cepa DSM 17876 descrita aquí (ST) no comprende los genes específicos y concretos EPS que se describen en WO2004/085607A2 (Rhodia Chimie) (determinados por un análisis PCR - datos no mostrados). Además, como se ilustra en el ejemplo 2, la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC8833 tiene la ventaja de ser resistente a un gran número de fagos presentes en los productos lácteos.

30 [0007] Por consiguiente, el primer aspecto de la invención se refiere a una bacteria de ácido láctico de *Streptococcus thermophilus* (ST) con el número de registro DSM 17876 o a un mutante de la misma, donde la cepa mutante se obtiene usando la cepa depositada como materia prima, y donde el mutante ha retenido o mejorado las propiedades de textura de DSM 17876.

35 [0008] El segundo aspecto de la invención se refiere a la composición de un cultivo iniciador comprendiendo la bacteria del primer aspecto.

40 [0009] El tercer aspecto de la invención se refiere al método de fabricación de productos de alimentación o de pienso comprendiendo según el segundo aspecto, la adición de una composición de cultivo iniciador a la materia prima de alimentos o producto de alimentación y el mantenimiento de la materia prima inoculada de este modo en condiciones en las que la bacteria es metabólicamente activa.

[0010] La forma de realización de la presente invención se describe más abajo, solo a modo de ejemplo.

### DIBUJOS

45 [0011] Figura 1: Resultado que muestra la textura mejorada (tensión de cizallamiento) de la leche fermentada con la nueva cepa de ST en comparación con las cepas de ST disponibles en el mercado y consideradas como cepas que proporcionan una gran textura. Las cepas se describen en el ejemplo 2. La textura se cuantifica mediante la evaluación de la tensión de cizallamiento medida en Pascales [Pa] mediante un reómetro tal como se describe en el ejemplo 1. La barra indica 1 x S.E.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**Nueva cepa de *Streptococcus thermophilus*

5 [0012] Una muestra de la nueva cepa de *Streptococcus thermophilus* (ST) CHCC8833 se depositó en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) con el número de registro DSM 17876 y fecha de depósito del 11 de enero de 2006. El depósito se hizo según las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes.

[0013] El primer aspecto de la invención se refiere a la nueva cepa descrita aquí o "a un mutante de la misma".

10 [0014] Para el experto en la materia, está claro que usando la cepa depositada como materia prima, el lector experto puede, mediante mutagénesis convencional o técnicas de reislamiento, obtener rutinariamente otros mutantes o derivados de la misma que mantengan las características y ventajas pertinentes descritas aquí. Por consiguiente, el término "un mutante de la misma" del primer aspecto se refiere a las cepas mutantes obtenidas al usar la cepa depositada en forma de materia prima.

15 [0015] Debido a que la leche y las condiciones de las lecherías generalmente no son estériles, los bacteriófagos constituyen una grave amenaza para la producción de productos lácteos. Los fagos infectan las bacterias de ácido láctico y se propagan de manera explosiva, produciendo la muerte celular y en consecuencia, la acidificación y el fallo en la producción. Concretamente, en las industrias lácteas modernas que utilizan tanques de dimensiones muy grandes, los ataques de fagos conllevan grandes pérdidas económicas. Por lo tanto, la industria se esfuerza constantemente en desarrollar nuevos cultivos resistentes a los fagos. Como se ilustra en los ejemplos 1 y 2, la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC8833 (DSM 17876) no sólo proporciona una textura sorprendentemente  
20 alta, sino que, de forma imprevista, CHCC8833 se mostró resistente a todos los fagos de prueba, a diferencia de otras cepas de alta textura.

Cultivo iniciador comprendiendo un BAL tal como se describe en la presente

[0016] La bacteria de ácido láctico (BAL), como se describe en la presente es útil como cultivo iniciador en la producción de alimentos o productos alimenticios.

25 [0017] Normalmente, esta composición de cultivo iniciador comprende las bacterias de forma concentrada, incluyendo concentrados liofilizados, deshidratados o congelados que tienen típicamente una concentración de células viables en un rango de  $10^4$  a  $10^{12}$  UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de la composición incluyendo al menos  $10^4$  UFC por gramo de la composición, tal como al menos  $10^5$  UFC/g, por ejemplo al menos  $10^6$  UFC/g, tal como al menos  $10^7$  UFC/g, por ejemplo al menos  $10^8$  UFC/g, tal como al menos  $10^9$  UFC/g, por ejemplo  
30 al menos  $10^{10}$  UFC/g, tal como al menos  $10^{11}$  UFC/g.

[0018] La composición puede contener otros componentes como crioprotectores y/o aditivos convencionales, incluidos algunos nutrientes como extractos de levadura, azúcares y vitaminas.

35 [0019] Como es normal en la producción de procesos de fermentación bacterianos de ácido láctico para la aplicación de cultivos mixtos de bacterias de ácido láctico, la composición comprende una pluralidad de cepas de la misma especie o de especies diferentes en formas de realización determinadas. Un ejemplo típico de esta combinación útil de bacterias de ácido láctico en una composición de cultivo iniciador es la mezcla de una *Leuconostoc* sp. y de una o más *Lactococcus* subesp. tal como *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* o *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* biovar. *diacetilactis*.

Método de fabricación de alimentos o productos alimenticios

40 [0020] Como se ha dicho anteriormente, un aspecto de la invención se refiere a un método de fabricación de alimentos o productos alimenticios comprendiendo la adición de la composición del cultivo iniciador descrita en este documento a la materia prima de los productos de alimentos o productos alimenticios y el mantenimiento de la así inoculada materia prima en condiciones en las que la bacteria de ácido láctico es metabólicamente activa.

45 [0021] Las materias primas útiles de productos alimenticios incluyen cualquier material sometido de forma convencional a una fase de fermentación bacteriana de ácido láctico, tal como la leche, los materiales vegetales, los productos cárnicos, los zumos de fruta, el mosto, las pastas y las masas.

[0022] Los productos fermentados, que se obtienen con el método, incluyen entre sus ejemplos típicos productos lácteos como la leche, el yogur, y el queso fermentados, comprendiendo también productos de queso fresco o mozzarella y suero de leche.

50 [0023] Para más ejemplos y detalles de los productos alimenticios fermentados correspondientes en la presente, se hace referencia al artículo revisado de Broadbent et al (J. dairy Sci: 86:407-423), en el que los productos de

alimentación fermentados pertinentes se describen en las secciones con título "Application in Yogurt and Fermented Milks" y "Application in Mozzarella Cheese".

- 5 [0024] En otras formas de realización, el material de sustrato es una materia prima para pienso de animales tal como el ensilaje, por ejemplo el pasto, cereales, guisantes, alfalfa u hoja de remolacha de azúcar, donde los cultivos bacterianos se inoculan bien en la cosecha de pienso que se tiene que ensilar para conseguir la conservación del mismo o en productos de desechos animales ricos en proteínas, como despojos animales y despojos de pescado, también con el fin de conservar estos despojos para la alimentación animal.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1: CHCC8833 - textura elevada en una leche fermentada

#### 10 Cepas:

[0025] CHCC8833: Nueva cepa DSM 17876 ST como descrita en este documento.

[0026] *Cepas de referencia:* véase el ejemplo 2.

[0027] Todas las cepas son cepas comerciales generalmente consideradas como cepas de alta textura.

#### Fermentación de la leche

- 15 [0028] Se utilizó un concentrado congelado de las cepas de ST para inocular 200 ml de leche reconstituida con un contenido de materia seca del 9.5%, que se había tratado con calor a 99°C durante 15 minutos en un proceso discontinuo. Los concentrados congelados de CHCC8833 muestran típicamente una concentración de células entre  $1.0^9$  y  $1.10^{10}$  UFC/g. El índice de inoculación era de 1g de concentrado por cada 10l de leche, es decir, entre  $1.10^5$  y  $1.10^6$  UFC/ml de leche. La incubación se produjo a 37°C hasta que el pH alcanzó 4,55, momento en que se produjo la coagulación de la leche. La leche fermentada se enfrió después a 5°C.
- 20

#### Análisis de la textura en la leche fermentada

- [0029] El día después de la incubación, la leche fermentada se dispuso a 13°C y se removió suavemente con una varita equipada de un disco perforado hasta obtener la homogeneidad de la muestra. Las propiedades reológicas de la muestra se evaluaron en un reómetro (StressTech, Instrumentos Reológicos, Suecia) equipado con un sistema de medición coaxial C25.
- 25

- [0030] La prueba de viscosimetría se realizó con índices de cizallamiento que variaban de 0.27 a  $300\text{ S}^{-1}$  en 21 fases. Los índices de cizallamiento fueron aumentando y luego disminuyendo, y se registraron las curvas ascendentes y descendentes de la tensión de cizallamiento (Pascal; Pa) y la viscosidad aparente (Pa\*s). Los tiempos de retraso y de integración fueron de 5 s y 10 s, respectivamente. Para un análisis más detallado, se eligió la tensión de cizallamiento a  $300\text{ S}^{-1}$ .
- 30

#### Resultados y conclusiones

[0031] Las leches fermentadas incubadas con concentrados de cepas de *Streptococcus thermophilus* que se usan habitualmente en la industria láctea (cepas de referencia) resultaron ser menos viscosas (menor tensión de cizallamiento) en comparación con las muestras producidas con CHCC8833 (véase la Figura 1 en este documento).

### 35 EJEMPLO 2: CHCC8833 - perfil de resistencia a fagos

#### Cepas bacterianas:

[0032]

CHCC2389: cepa de *Streptococcus thermophilus* ST143, distribuida en el mercado por Chr. Hansen A/S como F-DVS ST143, material n°.: 200144. CHCC2389 y CHCC3534 (Hassan et al. 2003) son diferentes aislaciones de la misma cepa.

CHCC3021: cepa de *Streptococcus thermophilus* ST10255, distribuida en el mercado por Chr. Hansen A/S como F-DVS de ST-BODY-2, material n°.: 623155.

CHCC3541: cepa de *Streptococcus thermophilus* ST20, distribuida en el mercado por Chr. Hansen A/S como F-DVS ST20X, material n°.: 501696.

CHCC4239: cepa de *Streptococcus thermophilus* ST4239, distribuida en el mercado por Chr. Hansen A/S en cultivo mixto F-DVS ABY-4, material n°.: 675175.

CHCC5086: cepa de *Streptococcus thermophilus* 5086, distribuida en el mercado por Chr. Hansen A/S en cultivo mixto De F DVS YF-LX701, material n°.: 660656.

CHCC5389: cepa de *Streptococcus thermophilus* 5389, distribuida en el mercado por Chr. Hansen A/S en cultivo mixto De F DVS ABY-4, material n°.: 675175

CHCC5581: cepa de *Streptococcus thermophilus* TA40, distribuida en el mercado por Danisco A/S

CHCC8833: cepa de *Streptococcus thermophilus* DSM 17876

#### Prueba de fagos

[0033] La sensibilidad a los fagos de las cepas comerciales de alta textura mencionadas anteriormente se compararon mediante prueba de gotas con una tabla de pruebas de fagos que comprendía 43 aislados de fagos separados.

5 [0034] La prueba de gotas consiste en el método de revestimiento con agar para calcular el número de bacteriófagos en una muestra. El método implica el recubrimiento de la cepa bacteriana que se debe evaluar con la ayuda de un agar blando superior en la superficie de una placa de agar (agar inferior). Las distintas diluciones de los aislados de fagos sin células se añaden por gotas al agar superior. Los fagos individuales van a atacar una célula bacteriana y replicarse liberando partículas de fagos que atacan y lisan bacterias cercanas, lo cual da como resultado zonas (placas) despejadas rodeadas por el crecimiento de cultivos opacos, véase Adams, M.H. (1959). Bacteriophages. Interscience Publisher, Inc., Nueva York.

10

#### Método

[0035] En resumen, 10 ul de un lisado de fago (unidades de formación de placas (UFP) aprox.  $10^9$ /ml) se añadieron por gotas sin diluir y en dilución de 1: 100 a la cepa bacteriana que se tenía que evaluar (cepa huésped) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

15

[0036] El agar usado fue agar M17 (Oxoid CM785) + 2% de lactosa, preparado esencialmente como indicado por el proveedor (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK).

[0037] Se consideró que una zona clara de dilución 1:100 o placas individuales fueron debidas el ataque de un fago y fueron indicativas.

#### Resultados y conclusiones

20

[0038] En los resultados de la prueba de gotas se descubrió que CHCC2389, CHCC3021, CHCC3534, CHCC3541, CHCC4239 y CHCC5086 eran sensibles a los fagos. Anteriormente, ya se había descubierto que CHCC5381 era sensible a los fagos. De manera interesante, se descubrió que ninguno de los fagos atacaba CHCC8833.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Bacteria de ácido láctico de *Streptococcus thermophilus* (ST) con número de registro DSM 17876 o cepa mutante de la misma, donde la cepa mutante se obtiene usando la cepa depositada en forma de materia prima, y donde el mutante ha mantenido o mejorado las propiedades de textura de DSM 17876.
- 10 2. Composición de un cultivo iniciador comprendiendo la bacteria de ácido láctico de la reivindicación 1, preferiblemente en la que la composición del cultivo iniciador tiene una concentración de células viables comprendida en el intervalo de  $10^4$  a  $10^{12}$  UFC por gramo de composición.
- 15 3. Método de fabricación de un alimento o producto alimenticio comprendiendo la adición de la composición del cultivo iniciador de la reivindicación 2 a la materia prima de un alimento o producto alimenticio y el mantenimiento de la materia prima inoculada en condiciones en las que la bacteria de ácido láctico es metabólicamente activa.
- 20 4. Método según la reivindicación 3, en el que el producto alimenticio fermentado es un producto lácteo fermentado.
5. Método según la reivindicación 4, en el que el producto lácteo fermentado es un producto lácteo fermentado seleccionado en la lista que consiste en leche fermentada, yogur, queso, incluyendo productos de queso frescos o mozzarella, y suero de leche.

**FIG. 1**

