

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 154**

51 Int. Cl.:

A23C 19/032 (2006.01)

A23C 19/06 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12N 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2000 E 00969561 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1223813**

54 Título: **Procedimiento para producir queso usando células de Kluyveromyces lactis atenuadas**

30 Prioridad:

28.10.1999 EP 99203555

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

10.07.2013

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
HET OVERLOON 1
6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:

**LORTAL, SYLVIE y
KLEIN, NATHALIE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 412 154 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

Procedimiento para producir queso usando células de *Kluyveromyces lactis* atenuadas

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a un procedimiento para producir queso, análogos de queso y productos derivados de queso, y más particularmente a un método para potenciar la velocidad de formación de gusto, sabor y textura, y/o para ampliar el intervalo de gustos, sabores y texturas.

Descripción de la técnica anterior

10 Los hábitos alimentarios en el Mundo muestran un uso creciente de queso y otros productos lácteos fermentados. Existe una enorme variedad de tipos de queso, análogos de queso y productos derivados de queso, y consiguientemente de métodos de producción para obtener esos productos.

15 La producción de queso comienza con la coagulación de la leche, que es provocada por la acción proteolítica específica que quimosina o enzimas similares, tales como las encontradas en cuajos de origen animal o microbiano. Se añaden bacterias de ácido láctico (es decir, fermentos tales como *Lactococci*) a fin de obtener la acidificación requerida de la leche dependiendo de la tecnología quesera implicada. La cuajada resultante está compuesta principalmente de la caseína junto con las gotitas de grasa de la leche que están atrapadas por inclusión. Una fracción sustancial del cuajo y de las bacterias de ácido láctico también terminan en la cuajada. Tras prensar el suero lácteo para reducir el contenido de agua, el queso joven se somete a un procedimiento de maduración a fin de dar al queso final su gusto, sabor y textura deseados.

20 La formación del gusto, sabor y textura del queso, análogos del queso y productos derivados de queso es un procedimiento que implica reacciones complejas y bien equilibradas entre glicolisis, proteolisis y lipolisis de los componentes de la leche, y la degradación posterior de los aminoácidos. Los productos de degradación de la grasa de la leche y de la proteína (péptidos, aminoácidos libres, di- y monoglicéridos, ácidos grasos libres y compuestos derivados de aminoácidos tales como aminas, cetoácidos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, ácidos y compuestos de azufre) contribuyen todos ellos a las propiedades específicas de gusto, sabor y textura del queso en cuestión.

25 La proteolisis durante la maduración del queso puede ser amplia (Fox, 1989). En el queso duro, el 25-35% de la proteína insoluble de la cuajada se puede convertir en proteína soluble. En las variedades blandas tales como Brie, Camembert o Limburger, alrededor del 80% de la proteína insoluble se puede convertir en compuestos solubles en agua tales como péptidos, aminoácidos y amoníaco (Foster et al. 1983).

30 La formación del sabor en queso, análogos de queso y productos derivados de queso es un procedimiento que implica una cascada de reacciones enzimáticas. Partiendo de aminoácidos, se pueden formar compuestos que incluyen aminas, cetoácidos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, ácidos y compuestos de azufre como productos intermedios y/o sabores finales. La descarboxilación de los aminoácidos da como resultado la formación de las aminas correspondientes, y está catalizada por diversas descarboxilasas de la clase enzimática EC.4.1.1. Los ejemplos específicos son lisina descarboxilasa (EC.4.1.1.18), arginina descarboxilasa (EC.4.1.1.19), histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22), y otras varias. Subsiguientemente, las aminas se pueden convertir en los aldehídos y amoníaco correspondientes mediante desaminación oxidativa que implica enzimas tales como amina oxidasas (EC.1.4.3.6). Los aldehídos se pueden oxidar adicionalmente a los ácidos correspondientes mediante aldehído deshidrogenasas de la clase EC.1.2 (las subclases se forman según el aceptor de electrones y/o de hidrógeno), o se reducen a los alcoholes correspondientes mediante alcohol deshidrogenasas (EC.1.1 – las subclases se forman según el dador de electrones y/o de hidrógeno). Como alternativa, los aminoácidos se pueden convertir vía reacciones de desaminación y transaminación. La desaminación da como resultado los alfa-cetoácidos correspondientes y amoníaco, y requiere la acción de aminoácido oxidasas o deshidrogenasas tales como EC.1.4.1.5 y EC.1.4.3.2. La transaminación también da como resultado los alfa-cetoácidos correspondientes, pero el grupo amino es transferido a otro cetoácido aceptor (por ejemplo alfa-cetoglutarato u oxaloacetato) con una transferencia concomitante del grupo oxígeno desde el cetoácido aceptor al aminoácido. En este caso no se libera amoníaco. Esta reacción requiere la acción de diversas aminotransferasas, también denominadas transaminasas, de la clase enzimática EC.2.6.1. Los cetoácidos formados mediante desaminación y transaminación de aminoácidos se pueden convertir adicionalmente en aldehídos mediante descarboxilación, que implica diversas descarboxilasas de la clase enzimática EC.4.1.1.

55 En procedimientos normales (es decir, no acelerados), la formación del gusto, sabor y textura se efectúa mediante enzimas lácteas endógenas tales como plasmina, y mediante enzimas exógenas tales como el cuajo usado para la coagulación. Además, los cultivos iniciadores, tales como las bacterias de ácido láctico usadas para la acidificación inicial de la leche, también contribuyen a la maduración del queso debido a que una fracción sustancial de las bacterias termina habitualmente en la cuajada. Sus actividades proteolíticas extracelulares y peptidolíticas intracelulares, y las enzimas que degradan adicionalmente los aminoácidos a los compuestos enumerados anteriormente, son capaces de romper la fracción caseínica. Las proteasas, peptidasas, estererasas, lipasas y las enzimas del catabolismo de aminoácidos en las bacterias de ácido láctico se han estudiado ampliamente (Urbach,

1995; Gobbetti et al., 1996; Gao et al., 1997; Law y Haandrikman, 1997). Sin embargo, las de otros fermentos, tales como propionibacterias y flora de la superficie, se han estudiado mucho menos ampliamente.

Una desventaja habitual en la mayoría de los métodos de producción es que el procedimiento de maduración, es decir, el procedimiento de formación de gusto, sabor y textura, se prolonga muchísimo, desde días hasta varios meses, y en algunos casos años. Por razones económicas, es muy deseable un tiempo de maduración más corto. La aceleración de la maduración es muy pertinente para variedades de baja humedad que maduran lentamente, y el trabajo más publicado se ha realizado sobre cheddar (Fox et al., 1996). Además, hay una necesidad industrial de aumentar el intervalo de tipos de gusto, sabor y textura de quesos, análogos de queso y productos derivados de queso.

La potenciación de la velocidad y grado de formación de gusto, sabor y textura, y el aumento del intervalo de gustos, sabores y texturas, se puede lograr añadiendo bacterias adicionales o añadiendo enzimas adicionales.

Cambiando el contenido enzimático de bacterias de ácido láctico en el queso directamente afecta a la velocidad de dicha maduración y al sabor final. Una de las formas más eficaces para incrementar el conjunto de enzimas bacterianas en la cuajada del queso, sin alterar el fermento principal y la obtención del queso, es añadir bacterias de ácido láctico completas que son incapaces de crecer ni de producir cantidades significativas de ácido láctico, pero que todavía pueden suministrar enzimas activas de maduración durante la etapa de maduración. Estos fermentos se denominan "atenuados".

Los fermentos atenuados se pueden preparar mediante diversos tratamientos como calentamiento, congelación, secado por pulverización, liofilización, fragilización usando lisozima o disolventes, o mediante la selección de un tratamiento con mutantes negativos a lactosa (para un repaso reciente, véanse Klein y Lortal). Pettersson y Sjöström dieron a conocer la primera preparación y uso de fermentos atenuados como un aditivo de queso, en 1975. En ese momento, su fin principal fue acelerar la proteólisis y acortar el tiempo de maduración, lo que fue de gran interés económico. Actualmente, en la mayoría de los países desarrollados, la calidad higiénica de la leche es tan elevada que el problema no es sólo acortar el tiempo de maduración sino también mejorar el sabor. Esto es particularmente cierto para nuevos tipos de quesos, tales como aquellos obtenidos de leche UH o baja en grasa, que habitualmente muestran un mal desarrollo del sabor y una textura cauchoide (El Soda et al., 1991). Los fermentos atenuados, si son bien conocidos y se obtienen reproduciblemente, pueden mejorar tanto la velocidad como la calidad de la maduración de los quesos (Fox, 1988; El Soda y Pandian, 1991).

Las enzimas tales como proteasas y lipasas se usan para fabricar queso, análogos de queso y productos derivados de queso en los que la velocidad de formación de gusto, sabor y textura está potenciada, y el intervalo de gustos, sabores y texturas está ampliado significativamente (Conner, 1988; Tye et al. 1988). La Solicitud de Patente Internacional WO 96/38549 describe el uso de una aminopeptidasa de *Aspergillus*, y la memoria descriptiva de la patente europea EP 0167309 describe el uso de una lipasa fúngica. En general, estas enzimas que potencian el sabor se pueden añadir en forma de bacterias atenuadas (véase más arriba), como una pasta (Kosikowski, 1988), como disoluciones (Law, 1980), a través de técnicas de encapsulamiento (Braun y Olson, 1986; Alkhalaf et al, 1988; El Soda et al, 1989), como enzimas solubles con sal (Green, 1985), o como las propias enzimas.

El uso de las proteinasas de *Kluyveromyces lactis* para la maduración del queso se describe en Grieve PA et al, Partial characterization of cheese-ripening proteinases produced by the yeast *Kluyveromyces lactis*, Journal of Dairy Research, vol. 50, nº 4, página 469-480, 1983. La generación del sabor en cuajada de queso cocultivando con levadura seleccionada, tal como por ejemplo *Kluyveromyces lactis*, mohos y bacterias se describe en Martin N et al, Journal of Dairy Science, vol. 82, nº 6, páginas 1072-1080, 1999. El uso de fermentos atenuados para la aceleración de la maduración de los quesos se describe en Fox PF, Food Biotechnology, vol. 2, nº 2, páginas 133-185, 1988-1989 y en Bartels HJ, Johnson ME, Olson NF, Milchwissenschaft, Jahrgang 42, Heft 3, páginas 139-144, 1987.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para producir un queso, un análogo de queso o un producto derivado de queso, procedimiento el cual comprende poner en contacto un queso, un análogo de queso o un producto derivado de queso, o un precursor de cualquiera de los mismos, con una célula de *Kluyveromyces lactis* como se define en las reivindicaciones.

El procedimiento de la invención que produce un queso, un análogo de queso o un producto derivado de queso puede dar como resultado una velocidad potenciada de la formación de gusto, sabor o textura y/o una extensión del intervalo de gustos, sabores o texturas de los productos producidos.

Descripción de la invención

Por el término queso se quiere decir un producto lácteo que pertenece a: una variedad de queso blando, por ejemplo Camembert, Münster o Livarot; una variedad semidura tal como Tomme de Savoie, Gouda, Edam o Mimolette; o una variedad de queso duro tal como Cheddar, Gruyere o los quesos Suizos o Parmesano.

Por la expresión análogo de queso se quiere decir un producto compuesto de: (i) proteína láctea, por ejemplo caseína o caseinato, y/o concentrado proteico de suero de leche coagulado mediante acidificación o mediante tratamiento térmico, y (ii) un agente para dar sabor al queso.

5 Por la expresión producto derivado de queso se quiere decir un queso procesado, por ejemplo una mezcla precalentada de quesos, mantequilla u otros materiales grasos, sales de fusión o cualquier tipo de cuajadas de queso a las que se añaden enzimas a fin de dar propiedades deseadas de textura y sabor.

10 Por el término precursor se quiere decir cualquier sustancia que está presente en el procedimiento de la invención, que finalmente se convertirá en un queso, un análogo de queso o un producto derivado de queso. De este modo, un precursor podría ser leche, mantequilla o cuajadas de queso, por ejemplo. Las células de levadura atenuadas se pueden poner en contacto con un queso, un análogo de queso o un producto derivado de queso, o un precursor de cualquiera de los mismos, en cualquier punto durante la fabricación de uno de esos productos. De este modo, las células de levadura se pueden añadir a la leche, o, como alternativa, se podrían añadir a un queso joven durante la maduración.

15 Por el término maduración se quiere decir la formación de gusto, sabor y textura de un queso, un análogo de queso, o un producto derivado de queso. La maduración implica reacciones complejas y bien equilibradas que incluyen glicolisis, proteolisis y lipolisis de componentes de la leche, y la degradación posterior de aminoácidos en aminas, cetoácidos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, ácido y compuestos de azufre mediante una cascada de reacciones enzimáticas, por ejemplo descarboxilación, transaminación, desaminación, oxidación o reducción.

20 Por el término levadura se quiere decir una categoría no taxonómica de hongos que se define en términos de criterios morfológicos y fisiológicos (P. Singleton, 1994). *Kluyveromyces lactis* es un saprófito unicelular que puede metabolizar hidratos de carbono mediante fermentación, y en el que la reproducción asexual se produce mediante desarrollo de brotes.

25 Por la expresión célula de levadura atenuada se quiere decir una célula de levadura que se ha tratado de tal manera que al menos 80%, preferiblemente más de 90%, y más preferiblemente 99% de las células son exterminadas pero no lisadas, mientras que se retiene más del 50%, más preferiblemente más del 90% de la actividad enzimática intracelular de la célula, que comprende las enzimas de maduración proteasas, peptidasas, lipasas, esterases, descarboxilasas, aldehído deshidrogenasas, amino oxidasas, alcohol deshidrogenasas, aminoácido deshidrogenasas, aminoácido oxidasas, amino transferasa y/o transaminasas. La actividad de aminopeptidasa se puede usar para determinar cuánta actividad enzimática se retiene. La viabilidad de las células se puede medir en CFU/ml cultivando una dilución de las células atenuadas sobre placas de agar YEG adecuadas. Típicamente, en el método de la invención para producir un queso, un análogo de queso o un producto derivado de queso, el queso, análogo de queso o producto derivado de queso se pone en contacto con una población de células, población de células la cual comprende células atenuadas. Típicamente, la población de células comprende al menos 80%, preferiblemente 90%, y más preferiblemente al menos 99% de células atenuadas.

35 Por el término proteasas se quiere decir enzimas que hidrolizan un sustrato proteico de manera endo, y que se clasifican mediante el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular como EC.3.4.21 (serina endopeptidasas), EC.3.4.22 (cisteína endopeptidasas), EC.3.4.23 (aspártico endopeptidasas), EC.3.4.24 (metaloendopeptidasas) o EC.3.4.99 (endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido).

40 Por el término peptidasas se quiere decir enzimas que hidrolizan un sustrato proteico o peptídico de manera exo, es decir, desde el lado N-terminal (por ejemplo aminopeptidasas) o el lado C-terminal (por ejemplo carboxipeptidasas) del sustrato, y que se clasifican mediante el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular como EC.3.4.11 (aminopeptidasas), EC.3.4.13 (dipeptidil- y tripeptidil-peptidasas), EC.3.4.15 (peptidilpeptidasas), EC.3.4.16 (carboxipeptidasas de tipo serina), EC.3.4.17 (metalo-carboxipeptidasas), EC.3.4.18 (carboxipeptidasas de tipo cisteína) o EC.3.4.19 (omega peptidasas).

45 Por el término lipasa o esterasa se quiere decir enzimas que pertenecen a la clase enzimática E.C.3.1.1.

Por el término descarboxilasa se quiere decir enzimas que pertenecen a la clase enzimática EC.4.1.1, y que convierten aminoácidos en sus aminas correspondientes y CO₂, o que convierten alfa-cetoácidos en sus aldehídos correspondientes y CO₂.

50 Por la expresión amina oxidasas se quiere decir enzimas que pertenecen a la clase EC.1.4.3, y que convierten aminas primarias en sus aldehídos correspondientes y amoníaco mediante desaminación oxidativa.

Por la expresión aldehído deshidrogenasa se quiere decir enzimas que pertenecen a la clase enzimática EC.1.2, y que convierten aldehídos en sus ácidos correspondientes en presencia de un aceptor de electrones y/o de hidrógeno tal como NAD⁺ o NADP⁺ (EC1.2.1), un citocromo (EC1.2.2), oxígeno (EC1.2.3) y un disulfuro (EC1.2.4).

55 Por la expresión alcohol deshidrogenasa se quiere decir enzimas que pertenecen a la clase enzimática EC.1.1, y que convierten aldehídos en su alcohol correspondiente en presencia de un dador de electrones y/o de hidrógeno tal como NADH⁺ o NADPH⁺ (EC1.1.1) y un citocromo (EC1.1.2).

Con las expresiones aminoácido deshidrogenasa y aminoácido oxidasa se quiere decir enzimas que pertenecen a la clase enzimática EC.1.4, y que convierten aminoácidos en sus alfa-cetoácidos correspondientes y amoníaco en presencia de un aceptor de electrones y/o de hidrógeno tal como NADH⁺ o NADPH⁺ (EC.1.4.1 - deshidrogenasas), un citocromo (EC.1.4.2 - deshidrogenasas) y oxígeno (EC1.4.3 - oxidasas).

5 Con el término aminotransferasa o transaminasa se quiere decir enzimas que pertenecen a la clase enzimática EC.2.6.1, y que convierten aminoácidos en sus alfa-cetoácidos correspondientes en presencia de otro alfa-cetoácido aceptor de amina y dador de oxo, tal como alfa-glutarato u oxaloacetato.

Ahora se ha encontrado sorprendentemente que las enzimas de *Kluyveromyces lactis*, como parte de células de *K. lactis* atenuadas, son muy eficaces degradando las proteínas de la leche a péptidos y a aminoácidos individuales, así como en la conversión subsiguiente de los aminoácidos individuales a moléculas de sabor tales como aminas, cetoácidos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, ácido o compuestos de azufre.

Por enzimas de levadura se quiere decir enzimas endógenas, como las enzimas que están presentes de forma natural en las células de levadura y cumplen una función natural, por ejemplo la función metabólica en la célula de levadura.

15 Además, se ha encontrado que las células atenuadas de *Kluyveromyces lactis* se pueden usar ventajosamente para potenciar sustancialmente la velocidad de formación de gusto, sabor y textura de queso, análogos de queso o productos derivados de queso, y/o para extender el intervalo de gustos, sabores o texturas de queso, análogos de queso o productos derivados de queso. Se ha encontrado que en el procedimiento para producir quesos, se pueden usar células atenuadas de *K. lactis*.

20 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para producir un queso, un análogo de queso o un producto derivado de queso, método el cual comprende poner en contacto un queso, un análogo de queso y/o un producto derivado de queso, o un precursor de los mismos, con células de *Kluyveromyces lactis* como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, la etapa de puesta en contacto del método de la invención se lleva a cabo en condiciones adecuadas para que se produzca la maduración.

25 Las células de *Kluyveromyces lactis*, adecuadas para uso en un procedimiento de la invención, están preferiblemente atenuadas mediante un tratamiento con microondas.

La célula de levadura para uso en un método de la invención puede ser una levadura modificada de manera que sobreexpresa preferiblemente una proteasa, una peptidasa, una lipasa, una esterasa o una enzima que convierte un aminoácido en un compuesto de sabor de la invención. Una célula modificada para uso en un procedimiento de la invención puede ser una célula genéticamente modificada, por ejemplo una célula recombinante o una célula identificada a través de un cribado de mutagénesis al azar. Las enzimas derivadas de una célula modificada también se pueden usar en el procedimiento de la invención.

Breve descripción de las figuras

35 La Figura 1 muestra la liberación de grupos amino libres durante una degradación cinética de beta-caseína. Para detalles, véase el Ejemplo 4.

La Figura 2 muestra el potenciamiento de la proteólisis en los quesos que contienen la levadura atenuada.

EJEMPLO 1

Cultivo de *Kluyveromyces lactis*

40 Se hizo crecer *Kluyveromyces lactis* en un medio YEG líquido (10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de bactopectona y 20 g/l de dextrosa), pH = 6,5 a 30°C. El cultivo transcurrió en 3 etapas.

Etapa 1 – Preparación de material de inoculación congelado

45 En la primera etapa, se prepararon suspensiones celulares muy densas a fin de usarlas como material de inoculación en fermentaciones subsiguientes. Se inocularon tres botellas de 500 ml, que contienen cada una 330 ml de medio YEG, con una colonia de levadura que procede de una placa de YPD (Extracto de Levadura Peptona Dextrosa). Las botellas se incubaron en un agitador giratorio a 220 rpm durante 48 h a 30°C. Después se añadió glicerol hasta una concentración final de 15%, tras lo cual la suspensión celular se almacenó a -80°C.

Etapa 2 – Precultivo

50 Se llevaron a cabo tres subcultivos a 2% a intervalos de 12 horas. Los primeros dos subcultivos se llevaron a cabo en tubos de 10 ml de medio YEG, y el último se llevó a cabo en una botella de 250 ml que contiene 50 ml de medio YEG.

Etapa 3 – Cultivo a gran escala

Para el cultivo se usaron tres botellas de 500 ml que contienen cada una 330 ml de medio YEG. Para cada botella se usaron cinco mililitros del precultivo (etapa 2 – es decir, 1,5%). A las 12 horas, el cultivo estaba en la etapa de crecimiento casi exponencial, y la OD a 650 nm fue 1,5 a 2. Las células se recogieron mediante centrifugación a 18.900 g durante 20 minutos a 4°C, y se lavaron dos veces con agua destilada estéril fría. Los peletes celulares se almacenaron a -20°C.

EJEMPLO 2

Preparación de un extracto de *Kluyveromyces lactis* libre de células

Peletes celulares congelados, preparados según el Ejemplo 1, se descongelaron en un lecho de hielo y se resuspendieron en 50 ml de agua destilada estéril fría (OD a 650 nm = 30-40), y se destruyeron subsiguientemente a 1000 bares en una celda de presión francesa refrigerada. Las células sin destruir y el desecho celular se eliminaron mediante centrifugación a 39.200 g durante 20 minutos a 4°C, y el sobrenadante recogido se esterilizó mediante filtración (0,45 micrómetros, después 0,20 micrómetros), se distribuyó en viales Eppendorf estériles y se almacenó a -20°C hasta el uso.

El contenido proteico de los extractos libres de células se determinó según el método de Lowry usando seroalbúmina bovina como patrón (Lowry et al 1951). Típicamente, el extracto libre de células tuvo un contenido proteico de 2-4 mg/ml, dependiendo de la cepa.

EJEMPLO 3

Preparación de beta-caseína

A fin de determinar la actividad de peptidasa del extracto de *K. lactis* libre de células y/o bacterias de ácido láctico, se escogió beta-caseína como sustrato debido a que es un sustrato de queso representativo y también a que es la fracción de caseína más hidrolizada en quesos semiduros madurados (Ferranti et al, 1997 y Gouldsworthy et al, 1996).

Se purificó beta-caseína a partir de la leche como se describe en Le Magnen y Maugas (1992). Subsiguientemente, se hidrolizó parcialmente usando las endoproteasas tripsina (EC.3.4.21.4) y quimiotripsina (EC.3.4.21.1), a fin de generar pequeños péptidos que son sustratos más adecuados para las peptidasas en los extractos libres de células descritos en el Ejemplo 2 anterior. La tripsina se escogió debido a que tiene la misma especificidad que la enzima de la leche endógena plasmina (EC.3.4.21.7).

Una disolución de beta-caseína, a 10 mg/ml en agua destilada estéril, se hidrolizó mediante una mezcla de tripsina (5000 K, Novo Industry A/S, Copenhagen, Dinamarca) y quimiotripsina (Sigma), ambas a una relación de enzima/sustrato de 1/1000 (p/p), durante 3 h a 37°C y a pH 7,2, que se mantuvo constante añadiendo NaOH 0,5 M. Después del tiempo indicado, las enzimas se inactivaron calentando la disolución durante 20 minutos a 80°C. La disolución se liofilizó y se almacenó a 4°C hasta el uso (Lemée et al., 1998), Lait, 78, 227-240). El grado final de hidrólisis fue 16%, como se dedujo a partir de la determinación de los grupos amino libres usando el método colorimétrico modificado de la ninhidrina para ensayo de peptidasa como se describe por Doi et al (1981). La mezcla peptídica se caracterizó mediante espectrometría de masas, y contenía 34 péptidos diferentes con pesos moleculares que oscilan de 373-3864.

EJEMPLO 4

Degradación proteolítica de beta-caseína mediante un extracto de *Kluyveromyces lactis* libre de células y algunas bacterias de ácido láctico

Se incubó un mililitro de una disolución que contiene 24,8 μ M preparada según el ejemplo 3 con 125 μ g de proteína citoplásmica de *Kluyveromyces lactis* o bacterias de ácido láctico, y se incubó a 24°C en un tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 5,7. Se tomaron muestras duplicadas a tiempo cero y a 2, 5, 10, 24, 48, 120 y 168 horas. La reacción enzimática se detuvo calentando las muestras en un baño de agua de 100°C durante 20 minutos. Subsiguientemente, las muestras se precipitaron con un volumen de 10 veces de etanol.

La actividad proteolítica del extracto libre de células se determinó analizando el incremento de grupos amino libres según el método de Doi et al (1981), usando metionina como patrón. El grado de proteolisis correspondió a la diferencia entre los grupos amino libres a un cierto tiempo y a tiempo cero, y se expresó en mmoles equivalentes de metionina. La prolina libre no se cuantificó con este método debido a que carece de un grupo amino libre. Como control, se usaron extractos libres de células tratados con calor.

Los aminoácidos libres se identificaron y cuantificaron según lo siguiente: a puntos de tiempo indicados, las muestras hervidas se tomaron y se precipitaron con ácido sulfosalicílico según el método de Mondino et al., (1972). El sobrenadante se analizó mediante cromatografía de intercambio iónico, en la que los aminoácidos libres se detectan mediante derivatización post-columna usando ninhidrina, esencialmente como se describe por Mondino et al. (1972).

La Figura 1 muestra el incremento de grupos amino libres como función del tiempo para el extracto de *K. lactis* libre de células y varias bacterias de ácido láctico. La figura muestra claramente que *K. lactis* es mucho más activo que las bacterias de ácido láctico.

5 La Tabla 1 resume la liberación de aminoácidos individuales tras 168 horas, expresado como porcentaje de la cantidad total de cada aminoácido presente en beta-caseína. La cantidad añadida de proteína del extracto libre de células fue la misma en todas las incubaciones.

10 *K. lactis* es la más activa de todas las cepas ensayadas a la hora de liberar tirosina (112%), fenilalanina (94%), metionina (89%), leucina (91), isoleucina (79%), valina (90%) y la cantidad total de aminoácidos libres (88%). Sólo en el caso de prolina, *Lactobacillus helveticus* fue más eficaz (74%) que *K. lactis* (55%), que todavía fue más activa que las otras 4 cepas.

Tabla 1. Aminoácidos libres tras 168 horas de hidrólisis de beta-caseína mediante extractos libres de células de los microorganismos indicados. Expresado como porcentaje de la cantidad total de cada aminoácido presente en beta-caseína. Los valores que están subrayados y en negrita son los más elevados para un aminoácido dado.

Aminoácido	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2359	<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ-32	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 559	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CIP567	<i>Leuconostoc lactis</i> CNRZ1091	<i>Brevibacterium linens</i> 550
Prolina	55	<u>74</u>	0	38	3	17
Tirosina	<u>100</u>	83	33	52	33	57
Fenilalanina	<u>94</u>	79	31	46	17	64
Metionina	<u>89</u>	72	52	54	42	28
Leucina	<u>91</u>	80	45	41	34	38
Isoleucina	<u>79</u>	72	50	38	31	18
Valina	<u>90</u>	79	46	41	24	18
Aminoácidos totales	<u>88</u>	75	36	43	28	22

15 EJEMPLO 5

Formación de compuestos de sabor mediante extractos de *Kluyveromyces lactis* libres de células y varias bacterias de ácido láctico

20 La formación de compuestos de sabor a partir de aminoácidos se midió incubando una mezcla de aminoácidos con extractos libres de células de los microorganismos indicados. Los aminoácidos se seleccionaron en base a que se sabe que su degradación da como resultado sabores de queso típicos. La composición de la mezcla de incubación fue como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Formación de componentes de sabor del queso; composición de las mezclas de incubación.

Compuesto	Concentraciones
L-Metionina	3,7 mM
L-Isoleucina	7,9 mM
L-Leucina	13,6 mM
L-Valina	13,4 mM
L-Fenilalanina	5,2 mM
L-Tirosina	2,9 mM
Ácido α -cetoglutárico	95,4 mM
Fosfato de piridoxal	50 μ M

Compuesto	Concentraciones
Pirofosfato de tiamina	50 μ M
Extracto libre de células	125 μ g proteína/ml
Tampón de fosfato de sodio	50 mM
pH	5,7
Para las reacciones de transaminasas, se añadió ácido α -cetoglutárico. Se añadieron los cofactores fosfato de piridoxal y pirofosfato de tiamina como cofactores para reacciones de transaminación y reacciones de descarboxilación.	

Las mezclas se incubaron a 24°C, y se tomaron muestras de 5 ml a 0, 24 y 168 horas y se analizaron subsiguientemente mediante HPLC y GC-MS de Espacio de Cabeza; véase la Tabla 3 para un resumen del método analítico usado.

- 5 Las muestras también se sometieron a un ensayo de aspiración nasal que consistió en un juicio semicuantitativo y una descripción cualitativa de los olores de las mezclas. Esto se llevó a cabo mediante un panel de 14 personas usando 4 ml de cada mezcla de incubación por persona.

Tabla 3. Métodos analíticos usados para la separación y la detección de los posibles compuestos presentes en las muestras.

Compuestos	Separación	Detección	Umbral de detección μ g/g)
α -cetoácidos	HPLC	UV	3
α -hidroxiácidos	HPLC	UV	30
Otros ácidos	HPLC	UV	30
Alcoholes	CG	MS	0,002
Aldehídos	CG	MS	0,001

10

Análisis mediante HPLC

Se usó HPLC para el análisis cuantitativo de cetoácidos, hidroxiácidos y otros ácidos no volátiles que se derivaron de los aminoácidos (entre paréntesis) mediante transaminación: ácido α -fenilpirúvico (Phe), ácido para-hidroxifenilpirúvico (Tyr), ácido α -cetoisocaproico (Ieu), ácido α -ceto- β -metilvalérico (Ile) y ácido α -cetoisovalérico (Val). También se midió mediante HPLC el consumo de ácido α -cetoglutárico debido a estas reacciones de transaminación.

15

Justo antes del análisis, las muestras se descongelaron, se homogeneizaron y se diluyeron 10 veces con el eluyente de HPLC (H_2SO_4 0,01 N), y se centrifugaron. Las inyecciones se realizaron usando un colector de fracciones controlado automáticamente. El volumen del bucle fue alrededor de 20 μ l, y los ensayos se realizaron en bucle completo. El volumen para la inyección fue 40 μ l. El volumen de descarga fue 30 μ l. Las condiciones de separación y de detección fueron como sigue: las muestras se inyectaron en una columna de fase inversa Aminex A6 (300 x 7,5 mm, Biorad, Richmond, USA) que se hizo funcionar en condiciones isocráticas a un caudal de 1 ml/min. (bomba de Beckman) y a una temperatura del horno de 55°C. La detección de UV se llevó a cabo a 210 nm usando un detector de Beckman. Todos los datos se analizaron con el sistema de manejo de datos Gold versión 8.1, también proporcionado por Beckman.

20

25

La columna se calibró para cada uno de los compuestos dados en la Tabla 4. Por tanto, se aplicaron varias concentraciones de los compuestos a la HPLC, y se determinó su "coeficiente de respuesta", que es igual a la pendiente de la recta de regresión lineal obtenida tras representar gráficamente la concentración del compuesto estándar frente a la superficie del pico.

Tabla 4. Compuestos no volátiles analizados mediante HPLC

Compuesto	Se origina de
Ácido α -cetoglutarico	-
Ácido α -cetoisovalérico	Valina
Ácido α -ceto- β -metilvalérico	Isoleucina
Ácido α -cetoisocaproico	Leucina
Ácido α -fenilpirúvico	Fenilalanina
Ácido para-hidroxifenilpirúvico	Tirosina
Ácido isobutírico	Valina
Ácido α -hidroxiisovalérico	Valina
Ácido α -hidroxiisocaproico	Leucina
Ácido α -hidroxi- β -metilvalérico	Isoleucina
Ácido isovalérico	Leucina

Los compuestos de sabor derivados de metionina no se pudieron determinar mediante este método de HPLC.

GC-MS

- 5 Con GC-MS, se detectaron los siguientes compuestos volátiles: benzaldehído (a partir de Phe vía reacciones de transaminación, descarboxilación, reducción y otras reacciones)
- 2-metilbutanal (a partir de Ile vía transaminación, descarboxilación),
 - 3-metilbutanal (a partir de Leu vía transaminación y descarboxilación),
 - 2-metilpropanal (a partir de Val vía transaminación/desaminación y descarboxilación),
- 10
- 2-metilpropanol (a partir de Val vía transaminación/desaminación, descarboxilación y reducción),
 - 2-metilbutanol (a partir de Ile vía transaminación/desaminación, descarboxilación y reducción).

Los compuestos volátiles del espacio de cabeza de las muestras se aislaron y analizaron mediante un analizador de espacio de cabeza dinámico Tekmar 3000 (Tekmar Inc., Cincinnati, OH, USA) acoplado a un cromatógrafo de gases HP5890A (Hewlett Packard, Avondale, PA, USA).

- 15 Las muestras se descongelaron justo antes del análisis, se homogeneizaron y se diluyeron diez veces en agua milli-Q hervida. Se pesaron 3 g de la disolución en un rociador no frito de 35 ml. Todas las muestras se purgaron con gas helio ultrapuro 35 ml/min. a 65°C durante 15 min. para aislar los volátiles del espacio de cabeza, que se adsorbieron en una trampa Vocarb 3000 (tubo de acero inoxidable empaquetado con 10 cm de carboxen B, 6 cm de carboxen 1000, 1 cm de Carboxen 1001, Supelco, Bella Fonta, Pa USA). Los compuestos atrapados se desorbieron térmicamente a 250°C durante 4 min., y se criofocaron a -100°C antes de inyectarlos mediante calor a 270°C. Se separaron en una columna capilar HP5 (60 m x 0,32 mm x 1,0 μ m de grosor de película) en las siguientes condiciones:
- 20
- gas portador: helio, 29 cm/s a 35°C;
 - programa de temperatura: 35°C durante 5 min.
- 25
- velocidad de calentamiento: 5°C/min. hasta 140°C, después 15°C/min. hasta 250°C.

- Las otras condiciones de operación fueron: "módulo de control de la humedad": 200°C; tuberías de transferencia y válvulas: 200°C; limpieza de la trampa mediante cocción a 260°C durante 8 min. para eliminar los compuestos residuales. La columna de GC se conectó sin división a la fuente de iones de un espectrómetro de masas cuadrupolar HP7972A (línea de interfaz 280°C), que funciona en el modo de barrido en un intervalo de masas de m/z 25-300 a 2,5 barridos/s. La ionización se llevó a cabo mediante impacto electrónico a 70 eV; la calibración se llevó a cabo mediante autoajuste. La cuantificación se llevó a cabo integrando las áreas de los picos de los cromatogramas
- 30

de iones totales (TIC) usando el software de Hewlett Packard Chemstation. Los compuestos se identificaron tentativamente mediante emparejamiento por ordenador de datos espectrales de masas con aquellos en la Base de Datos Espectral de Masas de Hewlett Packard Chemstation NIST 75K, y comparando sus espectros de masas y tiempos de retención con los de los compuestos estándar.

5 Tabla 5. Formación de compuestos de sabor después de 168 horas a partir de una mezcla de aminoácidos mediante extractos de *Kluyveromyces lactis* (K.lac), *Lactobacillus helveticus* (L.hel) y *Brevibacterium linens* (B.lin), libres de células, o una mezcla (mezcla) de L.hel y K.lac (cada uno 125 µg/ml) frente a una incubación de un blanco (= mezcla de aminoácidos con agua en lugar de extractos libres de células).

Compuesto		Cepa							
		K.lac 106	K.lac 2166	L.hel 735	L.hel CNRZ- 32	B.lin 550	B.lin 100	Mezcla	Blanco
ácido α-cetoglutarico (consumo en mM)		11,7	14,3	21,5	15,8	8,9	14,4	15,1	-1,4
No volátiles	Ácido β-fenilpirúvico (mM)	0,3	0,1	7,4	6,7	3,1	0,2	7,3	0,0
	Ácido para-hidroxifenilpirúvico (mM)	0,1	0,04	2,0	1,7	0,9	0,1	1,9	0,0
	Ácido α-cetoisocaproico (mM)	1,1	0,5	6,2	5,2	0,9	0,3	6,1	0,0
	Ácido α-ceto-β-metilvalérico (mM)	1,1	0,5	1,8	1,8	1,1	0,2	2,2	0,0
	Ácido α-cetoisovalérico (mM)	0,2	0,0	0,7	0,9	0,2	0,0	0,6	0,0
Volátiles	2-metilpropanal (µM)	<u>11,5</u>	1,6	0,0	0,1	0,1	0,0	4,1	0,0
	2-metilpropanol-1 (µM)	0,1	0,0	<u>0,3</u>	<u>0,3</u>	??	??	0,3	0,1
	3-metilbutanal (µM)	<u>38,5</u>	<u>14,8</u>	0,0	0,1	0,1	0,1	91,2	0,0
	2-metilbutanal (µM)	<u>27,9</u>	<u>6,7</u>	0,0	0,1	0,0	0,0	18,1	0,0
	2-metilbutanol-1 (µM)	0,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Sulfuro de dimetilo (µM)	0,1	0,2	0,2	0,3	<u>0,7</u>	<u>1,2</u>	0,4	0,0
	Benzaldehído (µM)	0,9	0,8	<u>30,9</u>	<u>44,1</u>	2,6	1,4	32	0,0
Producción total									

10 Tabla 6. Resultados del ensayo de aspiración de las incubaciones de aminoácidos con extractos libres de células (Tabla 5). De cada mezcla de incubación, había dos tubos en la serie: uno a analizar después de 24 horas, el segundo después de 168 horas. El análisis se llevó a cabo de forma enmascarada, y los tubos se colocaron en un orden aleatorio. Los datos cuantitativos representan el número de personas que dieron la puntuación indicada (nivel de olor bajo, medio o elevado, o ninguno).

Cepa	Nivel de olor después de 24/168 horas				Número de personas: Descripción
	ninguno	bajo	Medio	Alto	
Agua	<u>14/14</u>	0/0	0/0	0/0	-
K.lac 106	0/0	0/0	8/4	<u>6/10</u>	6: Galletita salada de aperitivo de queso - 4: asado/tostado - 3: agradable, ahumado - 2: malteado; desagradable; aldehído; levadura; miel (azúcar caramelizada); apesta

K.lac 2166	0/1	3/4	<u>8/7</u>	3/2	7: Galletita salada de aperitivo de queso - 4: malteado - 3: queso tostado (Camembert) - 2: ahumado; miel (azúcar caramelizada) - 1: agradable; desagradable; apesta; cultivo bacteriano
L.hel CNRZ-32	5/1	<u>9/7</u>	0/4	0/2	4: benzaldehído (amargo) - 2: ácido de queso muy ligero/yogur miel (azúcar caramelizada); levadura - 1: podrido, fétido, cultivo bacteriano
B.lin 550	3/0	<u>10/8</u>	1/6	0/0	9: queso (intenso, cabra, Camembert) - 3 desagradable (a pies) - 2: yogur, , olor a fermentación, rancio - 1: podrido
B.lin 100	2/0	3/0	<u>8/7</u>	1/7	10: queso (viejo) (Camembert; Roquefort) - 5: desagradable a pies - 4: podrido (coliflor) - 2:; ácido repugnante - 1: galletita salada de aperitivo de queso; pan; agradable; yogur; fermentación; humedad; queso maloliente; azufre; mohoso; alcantarillas.
Blanco	10/1	<u>4/9</u>	0/4	0	3: desagradable; queso - 2: extracto de levadura - 1: coliflor; yogur; azúcar caramelizada; cultivo bacteriano; podrido

En la Tabla 5 se resume la formación de α -cetoácidos a partir de aminoácidos. Sólo en el caso de las dos cepas de *Lactobacilli* y de la cepa 550 de *B. linens* hubo una correlación cuantitativa entre la formación de α -cetoácidos y el consumo de ácido α -cetoglutárico. En el caso de las dos cepas de *K. lactis* y AS100 de *B. linens*, aparentemente se formaron productos distintos de aquellos determinados por el análisis de HPLC.

Con respecto a la formación de compuestos volátiles, se observaron diferencias notables entre *K. lactis*, *L. helveticus* y *B. linens*. No se encontraron diferencias cualitativas importantes para las dos cepas diferentes por tipo de microorganismo. La Tabla 3 muestra que ambas cepas de *K. lactis* produjeron muy eficazmente 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, 2-metilpropanal y algo de benzaldehído. *L. helveticus* produjo principalmente benzaldehído y un poco de 2-metilpropanol, mientras que *B. linens* produjo algo de benzaldehído y compuestos de azufre. En el caso de la mezcla de extractos libres de células, se formaron todos los volátiles.

Los resultados del análisis sensorial se resumen en la Tabla 6, y muestran que *K. lactis* fue capaz de producir niveles de olor medios/elevados en comparación de *L. helveticus* (bajo) y *B. linens* (bajo/medio). El panel juzgó positivamente el sabor desarrollado por *K. lactis*, y lo caracterizó predominantemente como un sabor parecido a queso.

Todos los resultados obtenidos demuestran claramente que *K. lactis* es capaz de formar α -cetoácidos y moléculas de sabor a partir de aminoácidos, y por lo tanto que se puede usar con éxito en la etapa de maduración de queso, análogos de queso y productos derivados de queso.

EJEMPLO 6

Obtención de queso a escala piloto

Se llevó a cabo una obtención de queso prensado a escala piloto a fin de validar los resultados previos in vitro con extractos libres de células.

Etapa 1 – Preparación de la leche

Se prepararon 2 cubas de 26 kg de leche a 28 g/kg de materia grasa con polvo de leche desnatada tratado con poco calor y nata no pasteurizada comercial.

En primer lugar, la leche desnatada se preparó con polvo tratado con poco calor: 10 g de polvo en 100 g de agua. El contenido graso de una nata no pasteurizada comercial se midió con el Dairy Lab, y se añadió una cierta cantidad de nata a la leche desnatada para dar como resultado 28 g/kg de materia grasa en la leche.

En nuestro caso, se realizó:

	Cada cuba de 26 de leche reconstituida
Polvo tratado con poco calor	2,17 kg
Agua osmotizada	21,68 kg
Nata no pasteurizada comercial (a 333,7 g/kg de material grasa)	2,15 kg

Etapa 2 – Preparación de *K. lactis* atenuada

Para el cultivo, se usaron 13 botellas de 500 ml que contienen cada una 400 ml de medio YEG. Los peletes celulares se resuspendieron tras la centrifugación final en 260 ml de SDW, y se distribuyeron en 10 * 10 ml en tubos estériles. Todos los tubos se colocaron en un baño de agua a 20°C. Se llevó a cabo un tratamiento de microondas en cada uno, que finalmente se pusieron juntos en una botella estéril y se mantuvieron enfriados antes del uso.

Etapa 3 – Preparación de queso

- Las 2 cubas que contienen cada una 26 kg de leche reconstituida se calentaron a 34°C con un baño de circulación de agua tibia. El pH es 6,65 en las dos cubas.

- A cada cuba se añaden 5,2 ml de una disolución de CaCl₂ 500 mg/l.

- Se añade un fermento de *lactococci* comercial a 4 U/100 l, que representa en nuestro caso 1,04 U para 26 kg de leche. La mezcla se agita y se deja sin agitar hasta que el pH ha alcanzado 6,55 después de alrededor de 80 minutos de incubación. En el mismo momento, en la cuba de ensayo, el fermento atenuado se añade a 1% (p/p), que representa 260 ml de un concentrado tratado con microondas.

- En cada cuba se añaden 9,75 ml de un producto de quimosina diluida 3 veces (Maxiren-600 de DSM). La incubación transcurre durante 30 minutos en una habitación a 28°C hasta que se forma un coágulo firme.

- La cuajada formada se corta dos veces con el equipo especial, y las partículas cortadas se “curan” durante 10 minutos y después se agitan lentamente (velocidad 2 de 5 velocidades totales) durante 10 minutos. En cada cuba se extrae 20% del suero lácteo (5,2 kg) y se sustituye por la misma cantidad de agua desmineralizada a 35°C. La mezcla se agita nuevamente durante 15 minutos a la misma velocidad baja.

- Tras la operación de la segunda agitación, se extrae la fracción de suero lácteo, y el contenido de cuajada de cada cuba se divide en seis moldes redondos. La temperatura de la habitación se fija a 26°C.

- Después de 10 minutos, se aplica en cada molde una presión de 6 g/cm². Después de 15 minutos, los moldes que contienen los quesos se voltean y se aplica la misma presión durante 15 minutos nuevamente. Durante 3 horas, cada 15 minutos, se lleva a cabo la misma operación, y el queso alcanza pH 5,2. La temperatura de la habitación se fija a 16°C, y los quesos de los moldes se acondicionan para la noche a la misma presión.

- Después de 14 horas, los quesos se salmueran en una disolución de NaCl al 15% durante 50 minutos, después se escurren durante 5 horas, se bisecan y se envasan al vacío para madurar a 12°C.

EJEMPLO 7Atenuación de *Kluyveromyces lactis*

Se cultivaron células de *Kluyveromyces lactis* como se describe en el ejemplo 1, y se cosecharon en la fase exponencial temprana en condiciones estériles mediante centrifugación a 18.900 g durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril (SDW). Los peletes celulares se resuspendieron en 100 ml de SDW después de la centrifugación final, y se distribuyeron en 10 * 10 ml en tubos estériles. Todos los tubos se colocaron en un baño de agua a 20°C.

El tratamiento con microondas se llevó a cabo usando un horno de microondas Philips AVM 025 (potencia absorbida: 1200 W/230 V) equipado con un cronómetro y un ajuste de potencia variable. Cada tubo estéril de 10 ml sufrió un tratamiento con microondas de 650 W durante 13 segundos. El tratamiento con microondas no tuvo ningún efecto significativo sobre la actividad de peptidasa, mientras que se exterminó al 99% de las células.

EJEMPLO 8

Validación de nuestro fermento lácteo atenuado en una fabricación de queso a escala piloto, y medida de la proteólisis y formación de compuestos de sabor

Se llevó a cabo un experimento de queso a escala piloto como se describe en el ejemplo 6. La atenuación de *Kluyveromyces lactis* se realizó como se describe en el ejemplo 7. Para el cultivo se usaron 13 botellas de 500 ml que contienen cada una 400 ml de medio YEG (5,2 litros de cultivo en total). Los peletes celulares después de la centrifugación final se resuspendieron en 260 ml de SDW, y se distribuyeron en 10 * 10 ml en tubos estériles. Todos los tubos se colocaron en un baño de agua a 20°C. El tratamiento con microondas se llevó a cabo en cada tubo, que se colocaron al final juntos en una botella estéril mantenida en frío antes del uso.

Las características de los quesos en el día + 1 se describen en la Tabla 8. Las diferentes mediciones se llevaron a

cabo dos veces en mitades de quesos para el blanco y para el queso de ensayo que contiene 1% de *K. lactis* atenuada.

Tabla 8 – Características bioquímicas de los quesos en el día + 1

Día + 1, ensayo 1	Blanco	Queso + K.I
Peso (g)	261 +/- 18	271 +/- 11
pH	4,94	4,94
Materia seca (%)	41,25	40,55
Grasa (%)	19,7	19,7
FDM (%)	47,8	48,6
MFFS (%)	73,2	74
Sal (%)	0,85	0,95
S/M (%)	1,4	1,6
Lactosa residual (g/l)	0,8	0,9
FDM: GRASA EN LA MATERIA SECA		
MFFS: HUMEDAD EN LA SUSTANCIA LIBRE DE GRASA		
S/M: Sal en humedad		

5 Se analizaron muestras de queso en los días +1, +7, +14, +28 y +55 para determinar el nitrógeno total (TN), nitrógeno no proteico (N soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 12%) y nitrógeno no caseínico (nitrógeno soluble a pH 4,6) mediante el método de Kjeldahl (IDF, 1993). La evolución de los índices de maduración en los quesos tanto del control como de ensayo se presenta en la Figura 2, que muestra claramente la potenciación de la proteólisis en los quesos que contienen las levaduras atenuadas.

10 Los índices de maduración se definieron como:

$$IE = \text{NCN}/\text{TN}$$

$$IP = \text{NPN}/\text{TN}$$

Los componentes volátiles neutros se determinaron mediante CG-MS en extractos acuosos de queso en las mismas condiciones como se describe en el ejemplo 5. Los resultados se presentan en la Tabla 9.

15 Tabla 9 – Compuestos volátiles neutros presentes en el día + 1 y en el día + 45 en quesos tanto del control como de ensayo (unidades de área arbitrarias)

	Blanco día + 1	Ensayo día + 1	Blanco día + 45	Ensayo día + 45
Aldehídos				
Acetaldehído	-	38	-	262
3-Metilbutanal	3	10	4	22
Pentanal	3	2	1	4
Benzaldehído	3	1	5	2
Nonanal	1	-	1	1
Alcoholes				
2-Metilpropanol-1	-	53	26	132

	Blanco día + 1	Ensayo día + 1	Blanco día + 45	Ensayo día + 45
3-Metilbutanol-1+				
2-Metilbutanol-1	-	602	133	655
1-Hexanol	2	-	2	3
Ésteres				
Acetato de etilo	2	773	373	774
Propanoato de etilo	-	1	1	5
Acetato de n-propilo	-	-	1	6
Butanoato de etilo	-	20	8	64
Hexanoato de etilo	-	3	2	23
Octanoato de etilo	-	-	-	6

Los dos alcoholes 3-metilbutanol-1 y 2-metilbutanol-1 se coeluyeron, de manera que, en la tabla, las dos áreas que conciernen a ambos compuestos se suman.

5 La Tabla 9 muestra claramente un incremento de compuestos aromáticos como aldehídos, alcoholes y ésteres en el queso de ensayo que contiene la levadura atenuada. Para algunos compuestos, el incremento ya se notó en el día 1. Está claro que hay un efecto positivo sobre la formación de compuestos aromáticos volátiles en el queso debido a la levadura atenuada.

Referencias

- Conner, T. (1988) Advances in accelerated ripening of cheese. *Cult. Dairy Prod. J.* 23, 21-25.
- 10 Doi, E., Shibata, D., y Matoba, T. (1981) Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.* 118, 173-184.
- El Soda, M. y Pandian, S. (1991) Recent developments in accelerated cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 74, 2317-2335.
- 15 El Soda, M., Chen, B., Riesterer, B. y Olson, N. (1991) Acceleration of low-fat cheese ripening using lyophilised extracts or freeze shocked cells of some cheese related micro-organisms. *Milchwissenschaft* 46, 358-360.
- Ferranti *et al.*, (1997) *Lait*, 77, 683-697.
- Foster, E.M., Nelson, F.E., Speck, M.L., Doetsch, R.N. y Olson, J.C. (1983) "Dairy Microbiology" Ridgeview Publishing, Atascadero, California.
- Fox *et al.* (1996) *Anthonie van Leeuwenhoek*, 70:271-297.
- 20 Fox, P.F. (1989) Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Res.* 72, 1379-1400.
- Gao, S., Broadbent, J. R., Johnson, M. E., Weimer, B. C., y Steele, J. L. (1997) Aromatic amino acid catabolism by lactococci. *Lait* 77, 371-381.
- Gobbetti, M., Fox, P. F. y Stepaniak, L. (1996) Esterolytic and lipolytic activities of mesophilic and thermophilic lactobacilli. *Italian Journal of Food Science* 2, 127-137.
- 25 Gouldsworthy *et al.* (1996) *Int. Dairy J.* 6, 781-790.
- Klein, N. y Lortal, S. (1999) attenuated starters: A powerful means to influence cheese ripening - a review. *Int. Dairy J.* presentado para publicación.
- Law, J. y Haandrikman, A. (1997) Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 7, 1-11.
- 30 Lemee, R., Gagnaire, V., y Maubois, J.L. (1998) Strain variability of the cell-free proteolytic activity of dairy propionibacteria towards β -casein peptides. *Lait* 78, 227-240.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Le Magnen, C., Maugas, J.J., (1991) Method and device for obtaining beta casein. Solicitud de Patente Internacional WO92/000017 de EURIAL.

5 Mondino, A., Bongiovanni, G., Fumero, S., y Rossi, L. (1972) An improved method of plasma deproteinisation with sulphosalicylic acid for determining amino acids and related compounds. *J. of Chromatography* 74, 255-263.

Petterson, H. y Sjöström, G. (1975) Accelerated cheese ripening. A method of increasing the number of lactic starter without detrimental effect of the cheese making process and its effect on cheese ripening. *Journal of Dairy Research* 42, 313-326.

10 Tye, T.M., Haard, N.F. y Patel, T.R. (1988) Effects of bacterial protease on the quality of Cheddar cheese. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 21, 373-377.

Shakeel-Ur-Rehman, McSweeney, P.L.H., y Fox, P.F. (1998) Protocol for the manufacture of miniature cheeses. *Lait* 78, 607-620.

Singleton, P. (1994) *Dictionary of Microbiology & Molecular Biology*, página 784, J. Riley & Son, Nueva York.

15 Urbach, G. (1995) Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal* 5, 877-903.

Yvon, M., Berthelot, S., y Gripon, J.C. (1998) Adding α -keto-glutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *Int. Dairy J.* 8, 889-898.

20 Yvon, M., y Gripon, J.C., (1997) Use of keto acids to enhance the flavour of cheese products Solicitud de Patente Internacional WO 9848645 de INRA.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para producir un queso, un análogo de queso o un producto derivado de queso, procedimiento el cual comprende poner en contacto un queso, un análogo de queso o un producto derivado de queso, o un precursor de los mismos, con una población de células de *Kluyveromyces lactis*, población la cual comprende células de *Kluyveromyces lactis* atenuadas, en el que al menos 80% de las células de *Kluyveromyces lactis* en la población están muertas pero no lisadas.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que las células atenuadas en la población han retenido más del 50% de su actividad enzimática intracelular.
- 10 3. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que la actividad enzimática intracelular comprende proteasas, peptidasas, lipasas, esterases, descarboxilasas, aldehído deshidrogenasas, amino oxidasas, alcohol deshidrogenasas, aminoácido deshidrogenasas, aminoácido oxidasas, amino transferasas y/o transaminasas.
4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula de *Kluyveromyces lactis* se modifica de manera que sobreexpresa una proteasa, una pepetidasa, una lipasa, una esterasa, o una enzima que convierte un aminoácido en un compuesto de sabor.
- 15 5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células de *Kluyveromyces lactis* se usan para potenciar la velocidad de la formación de gusto, sabor, y textura del queso, análogo de queso o producto derivado de queso, o para prolongar la velocidad de gustos, sabores y texturas del queso, análogo de queso o producto derivado de queso, o ambos.
- 20 6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para que se produzca la maduración.

Fig. 1

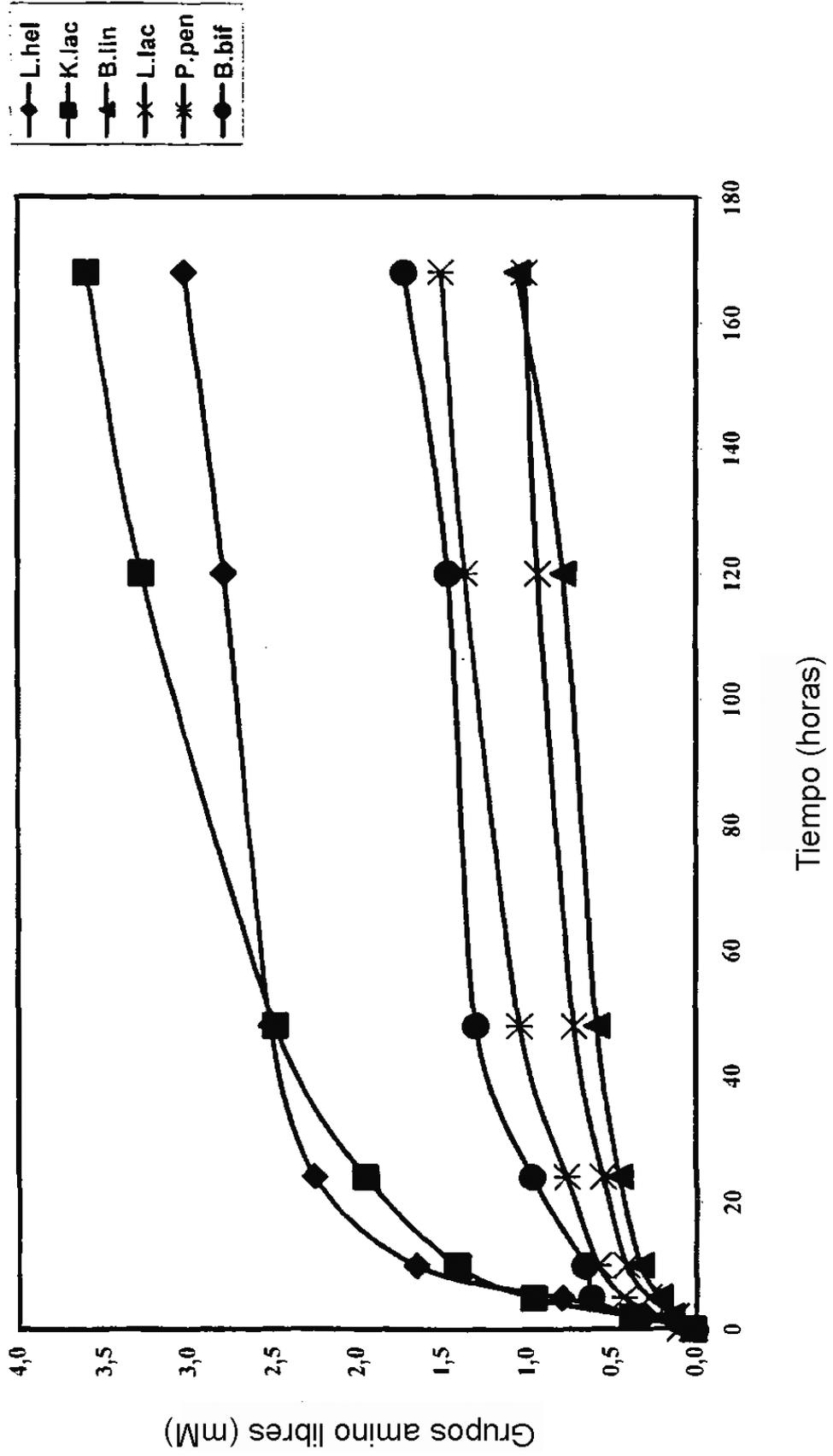


Fig. 2

