

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 542**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/00** (2006.01)

**C12N 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2004 E 04703147 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 1587909**

54 Título: **Almacenamiento estable de cultivos congelados de bacterias de ácido láctico**

30 Prioridad:

**22.01.2003 EP 03001442**

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

**30.10.2013**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BISGAARD-FRANTZEN, HANS;  
KRINGELUM, BØRGE WINDEL y  
KNAP, INGE**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 427 542 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

Almacenamiento estable de cultivos congelados de bacterias de ácido láctico.

5 **Campo de la invención:**

[0001] La presente invención se refiere a un almacenamiento de un cultivo congelado estable de bacterias de ácido láctico (LAB) que comprende LAB que son capaces de utilizar sacarosa, tiene un peso de al menos 50 g de material congelado y un contenido de bacterias viables de al menos  $10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado.

**Antecedentes de la invención:**

[0002] Los microorganismos están implicados en la producción de alimentos y productos alimenticios incluyendo la mayoría de productos lácteos. Así, cultivos bacterianos, en particular cultivos de bacterias que generalmente se clasifican como bacterias del ácido láctico son esenciales en la producción de todos los productos lácteos fermentados, queso y mantequilla. Los cultivos de tales bacterias se pueden denominar cultivos iniciadores e imparten características específicas para varios productos lácteos mediante la realización de varias funciones.

[0003] Los cultivos lácteos iniciadores comerciales generalmente están compuestos por ácido láctico y ácido cítrico bacterias fermentadoras del ácido láctico. En el presente contexto, la expresión "bacterias del ácido láctico" designa un grupo de bacterias microaerófilas o anaeróbicas, no móviles, catalasa negativas, Gram positivas, que fermentan el azúcar con la producción de ácidos incluyendo el ácido láctico como el ácido producido predominantemente, ácido acético, ácido fórmico y ácido propiónico. Las bacterias del ácido láctico más útiles industrialmente se encuentran entre las especies de *Lactococcus*, especies de *Streptococcus*, especies de *Enterococcus*, especies de *Lactobacillus*, especies de *Leuconostoc* y especies de *Pediococcus*.

[0004] Las cepas de cultivos lácteos iniciadores de bacterias del ácido láctico comúnmente utilizadas generalmente se dividen en organismos mesofílicos cuya temperatura de crecimiento óptimo es de aproximadamente 30 °C y organismos termofílicos cuya temperatura de crecimiento óptimo se encuentra en el rango de aproximadamente 40 a aproximadamente 45°C.

Organismos típicos del grupo mesofílico incluyen *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis biovar. diacetylactis* y *Lactobacillus casei* subesp. *casei*. Entre las especies bacterianas termofílicas del ácido láctico se incluyen *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

[0005] Los cultivos lácteos iniciadores también se clasifican según su composición de especies específicas y el uso industrial preferido. Un cultivo iniciador puro sólo comprende una única especie y un cultivo mixto comprende dos o más especies diferentes. Los cultivos comerciales mixtos mesofílicos pertinentes incluyen:

"Cultivo tipo O" que comprende *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*.

"Cultivo tipo D" que comprende *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subesp. *lactis biovar. diacetylactis*.

45 "Cultivo tipo L" que comprende *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris*.

"Cultivo tipo LD" que comprende *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis biovar. diacetylactis* y *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris*.

50 [0006] Un *cultivo tipo O* se utiliza para hacer queso sin agujeros (Cheddar, Cheshire, Feta). Un *cultivo tipo D* se utiliza para hacer mantequilla. Un *cultivo tipo L* se utiliza sólo para queso con agujeros pequeños (queso cottage) y productos lácteos cuajados con baja producción de CO<sub>2</sub>. Un *cultivo tipo LD* se utiliza para hacer queso con tamaños de agujero normales, productos lácteos coagulados (cuajada) y mantequilla agria. Comercialmente, un cultivo tipo LD es uno de los cultivos mixtos más utilizados habitualmente.

55 [0007] Los cultivos comerciales mixtos termofílicos pertinentes incluyen:

"Cultivo de yogur" que comprende *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus*.

"Cultivo termofílico de queso" que comprende *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus helveticus*.

60 [0008] Un *cultivo de yogur* se utiliza para hacer yogur y quesos italianos especiales. Un *cultivo termofílico de queso* se utiliza para hacer queso emmental y quesos italianos especiales.

[0009] Los cultivos iniciadores comerciales se pueden distribuir comúnmente como cultivos congelados. Los cultivos congelados altamente concentrados son muy interesantes comercialmente ya que tales cultivos se pueden inocular directamente en la leche sin una transferencia intermedia. En otras palabras, tales cultivos congelados altamente concentrados comprenden tantas bacterias que las lecherías no tienen que hacer iniciadores internos a granel. Un "iniciador a granel" es definido aquí como un cultivo iniciador propagado en la central lechera para su inoculación en la leche. Los cultivos altamente concentrados se pueden denominar cultivos direct vat set (DVS).

[0010] Para comprender bacterias suficientes, un cultivo pertinente comercial congelado altamente concentrado generalmente tiene un peso de al menos 50 g y un contenido de bacterias viables de al menos  $10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por g.

[0011] Otra presentación de los cultivos iniciadores DVS comerciales altamente concentrados es como cultivos secados por congelación o liofilizados en forma de polvo. En esta forma, el iniciador se puede enviar sin refrigeración.

[0012] El artículo de F.J. Chavarri et al (Biotechnology letters, vol 10, 1,11- 16 (1988), "Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus Lactis* strains") describe que la viabilidad de almacenamiento de un cultivo puro de *Streptococcus lactis* congelado se podría mejorar por adición de un 5% de lactosa o un 5% de sacarosa. La lactosa o sacarosa actuaron como agentes crioprotectores. *Streptococcus lactis* es un nombre anterior de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*.

[0013] De forma similar, el artículo de R. Cárcoba et al (Eur Food Res Technol (2000) 211,433 - 437, "Influence of cryoprotectants on the viability and acidifying activity of frozen and freeze-dried cells of the novel starter strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 5180") describe que la viabilidad de almacenamiento de un cultivo congelado puro de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* podría ser mejorada por adición de diferentes agentes crioprotectores tales como azúcares (lactosa, sacarosa y trehalosa), ácido glutámico y gelatina.

[0014] Los presentes inventores no son conocedores de ningún cultivo comercial congelado altamente concentrado disponible que comprenda cantidades significativas de agentes crioprotectores.

[0015] EP259739 describe diferentes agentes crioprotectores adecuados para cultivos liofilizados. Un cultivo en forma de polvo liofilizado es físicamente diferente, de forma significativa, de un cultivo congelado entre otras razones debido a que un polvo liofilizado contiene una cantidad de agua significativamente menor, en comparación con un cultivo congelado. Por consiguiente, se entiende que el experto en la materia prima facie no consideraría que un agente crioprotector específico descrito como útil para un cultivo liofilizado fuera similarmente útil también para un cultivo congelado.

[0016] WO00/39281 (Chr. Hansen A/S) describe un cultivo iniciador líquido estabilizado por diferentes agentes crioprotectores. En la página 5, líneas 5-7 se puede leer "la expresión "cultivo iniciador líquido" se refiere a cultivos iniciadores de líquido no congelado que presentan una fase líquida, p.ej. una fase acuosa, en un contenido que se encuentra típicamente en el rango de 50-90% en peso". Consecuentemente, el cultivo líquido descrito en WO00/39281 es un cultivo no congelado.

#### Resumen de la invención:

[0017] Antes de la presente invención, los presentes inventores creían que no había problemas significativos de estabilidad de almacenamiento en relación con los cultivos altamente concentrados y congelados de bacterias del ácido láctico comercialmente pertinentes. Como se ha dicho anteriormente, los presentes inventores no son conocedores de ningún cultivo congelado altamente concentrado comercial disponible que contenga cantidades significativas de agentes crioprotectores.

[0018] Antes de la presente invención, se han realizado estudios de estabilidad partiendo de cultivos comerciales altamente concentrados de bacterias del ácido láctico que ya habían sido congelados durante 2-3 meses. Por ejemplo, se hicieron estudios en viejos *cultivos tipo LD* congelados durante 2-3 meses. Estos estudios no mostraron ninguna degradación significativa de la actividad de los *cultivos tipo LD* durante un periodo de un año a temperaturas inferiores a  $-45^{\circ}\text{C}$ . Consecuentemente, se creyó que los *cultivos tipo LD* comerciales pertinentes no presentaban problemas de estabilidad de almacenamiento de forma significativa.

[0019] Para analizar la estabilidad durante las primeras semanas de almacenamiento por congelación diferentes *cultivos tipo O* fueron analizados desde el primer día de almacenamiento por congelación. No mostraron ninguna reducción significativa de actividad ni durante las primeras semanas ni durante los siguientes 12 meses. Por consiguiente, estos datos confirman esencialmente que no debería haber problemas de estabilidad de almacenamiento en relación con los cultivos congelados altamente concentrados comercialmente pertinentes.

[0020] A pesar de ello, los presentes inventores continuaron investigando en cuestiones de estabilidad de diferentes y pertinentes cultivos comerciales congelados y, después de un número de estudios, identificaron que, por ejemplo, *cultivos tipo LD* congelados presentan una pérdida de actividad significativa en las primeras 1-3 semanas de almacenamiento por congelación. Después de estas semanas, la pérdida adicional de actividad fue relativamente insignificante, de acuerdo con los resultados previos conocidos anteriormente descritos.

[0021] En resumen, el trabajo de los presentes inventores ha identificado problemas de estabilidad de almacenamiento, hasta ahora no reconocidos, en relación con algunos tipos de cultivos pertinentes comerciales congelados y altamente concentrados de bacterias del ácido láctico, tales como por ejemplo *cultivos tipo LD* congelados comercialmente disponibles.

[0022] Una vez identificado este problema, los presentes inventores podrían empezar a tratar de resolver el problema. Como se describe en este caso lo resolvieron por adición de agentes crioprotectores a los cultivos congelados altamente concentrados pertinentes.

[0023] Como se ha dicho anteriormente un *cultivo tipo O* comprende *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* y un *cultivo tipo LD* comprende *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis biovar. diacetilactis* y *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris*.

[0024] El *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* presente en el *cultivo tipo LD* es capaz de utilizar sacarosa. El *cultivo tipo O* no comprende bacterias que sean capaces de utilizar sacarosa.

[0025] Consecuentemente, sin limitarse a la teoría, se cree que los problemas de estabilidad aquí identificados se refieren a cultivos comerciales pertinentes altamente congelados que comprenden bacterias capaces de utilizar sacarosa.

[0026] Como se ha dicho anteriormente, para comprender bacterias suficientes un cultivo congelado comercial pertinente altamente concentrado generalmente tiene un peso de al menos 50 g y un contenido de bacterias viables de al menos  $10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por g. Los cultivos puros de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* descritos en los artículos de F.J. Chavarri et al y R. Carboba et al (ver arriba) no se consideran en el presente contexto cultivos congelados comerciales pertinentes altamente concentrados ya que están hechos en escala más pequeña y comprenden una cantidad significativamente menor de gramos de cultivo congelado.

[0027] Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a un cultivo congelado de bacterias de ácido láctico (LAB) que comprende LAB que son capaces de utilizar sacarosa y es un cultivo mixto mesofílico que consiste en bacterias mesofílicas cuya temperatura de crecimiento óptimo es de aproximadamente 30 °C, tiene un peso de al menos 50 g de material congelado y un contenido de bacterias viables de al menos  $10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado, caracterizado por el hecho de que el cultivo congelado comprende entre un 0,5% y un 80% de un agente crioprotector medido como p/p del material congelado.

[0028] El agente crioprotector debería añadirse preferiblemente a las bacterias viables antes de ser congeladas.

[0029] Por consiguiente, en un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para hacer un cultivo congelado de bacterias de ácido láctico (LAB) que comprende LAB que son capaces de utilizar sacarosa, tiene un peso de al menos 50 g material congelado y un contenido de bacterias viables de al menos  $10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado que comprende los pasos siguientes:

- (i) añadir un agente crioprotector a las bacterias viables para conseguir un mínimo de 50 g de material con un contenido de bacterias viables de al menos  $10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material y que contenga el agente crioprotector en una cantidad entre un 0,5% y un 80% medido como p/p del material,
- (ii) congelar el material para obtener material congelado, y
- (iii) embalar el material congelado de una manera adecuada.

[0030] Un tercer aspecto de la invención se refiere a usar el cultivo de bacterias de ácido láctico (LAB) congelado como se ha descrito anteriormente en un proceso para hacer un alimento o producto de alimentación.

**Definiciones:**

[0031] Antes de una discusión de las formas de realización detalladas de la invención se proporciona una definición de los términos específicos relacionados con los aspectos principales de la invención.

[0032] El término "LAB capaces de utilizar sacarosa" denota LAB que son capaces de fermentar la sacarosa del azúcar con la producción de ácidos.

[0033] El término "material" del cultivo denota las sustancias pertinentes del cultivo incluyendo las bacterias viables y agente crioprotector. El posible embalaje no está incluido. Consecuentemente, el peso del material del cultivo no incluye el peso del posible embalaje.

5

[0034] El término "embalaje" debe entenderse de forma general. Denota que el cultivo de bacterias de ácido láctico (LAB) congelado debería ser embalado para ser proporcionado al usuario. Se puede embalar en una botella, un envase tetraédrico, etc.

10

[0035] El término "un agente crioprotector" denota una sustancia que es capaz de mejorar la estabilidad de almacenamiento del cultivo congelado. En el presente contexto éste puede ser un único agente crioprotector específico o puede ser dos o más agentes diferentes. Por consiguiente, el porcentaje p/p del agente(s) crioprotector en el material de cultivo debería entenderse como la suma de la cantidad de agente(s) crioprotector. Una vía preferida para determinar si una sustancia es un agente crioprotector capaz de mejorar la estabilidad de almacenamiento del cultivo congelado es dividir un cultivo, como se describe en este caso, en dos muestras, añadir una cantidad específica del agente crioprotector a una de ellas, congelar ambas y medir la actividad de acidificación de la leche de los cultivos en el mismo día de la congelación y periódicamente durante un año bajo almacenamiento por congelación. Si el cultivo con agente crioprotector ha mejorado la actividad de acidificación de la leche observada durante el periodo de almacenamiento la sustancia es un agente crioprotector. Un ensayo de actividad de acidificación de leche adecuado se da en ejemplos de funcionamiento aquí.

15

20

[0036] Formas de realización de la presente invención se describen abajo, sólo a modo de ejemplo.

#### Dibujos

25

[0037]

Figura 1 a 4: Perfiles de estabilidad para F-DVS de FI DaN & CH N11. Para detalles adicionales ver ejemplo de funcionamiento 1.

30

Figura 5 a 10: Perfiles de estabilidad para F-DVS de F1 DaN, CH N11 & CH N19. Para detalles adicionales ver ejemplo de funcionamiento 2.

Figura 11: Perfiles de estabilidad para R603. Para detalles adicionales ver ejemplo de funcionamiento 3.

#### Descripción detallada de la invención:

35

Cultivo de bacterias de ácido láctico (LAB) congelado

[0038] El término "cultivo mixto de bacterias de ácido láctico (LAB)" denota un cultivo mixto que comprende dos o más especies diferentes de LAB. El término un "cultivo puro de bacterias de ácido láctico (LAB)" denota un cultivo puro que sólo comprende una única especie de LAB.

40

[0039] El cultivo como se describe en este caso puede ser un cultivo mesofílico que consiste en bacterias mesofílicas cuya temperatura de crecimiento óptimo es de aproximadamente 30°C.

45

[0040] El cultivo como se describe en este caso comprende LAB que son capaces de utilizar sacarosa. El *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* son capaces de utilizar sacarosa. Entre otros, está presente en un *cultivo tipo L* y en un *cultivo tipo LD*.

[0041] Consecuentemente, en una forma de realización preferida el cultivo congelado es un *cultivo tipo L* o más preferiblemente un *cultivo tipo LD*. Un *cultivo tipo L* y un *cultivo tipo LD* son ejemplos de cultivos mesofílicos. Además son cultivos mixtos. Consecuentemente, un cultivo como se describe en este caso es preferiblemente un cultivo mixto, más preferiblemente un cultivo mixto mesofílico.

50

[0042] Un *cultivo tipo L* comprende *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris*.

55

[0043] Un *cultivo tipo LD* comprende *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* biovar. *diacetylactis* y *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris*.

60

[0044] La cantidad específica de especies bacterianas individuales pueden variar conforme al uso requerido específico. El experto en la materia es consciente de ello y es capaz de determinar la composición del cultivo mixto preferido según sea necesario.

[0045] Por ejemplo, si se requiere un aroma sería preferible que hubiera un porcentaje relativamente alto de las bacterias que producen del aroma *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, biovar *diacetylactis* y *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris*.

5

[0046] Un cultivo tipo LD preferido comprende:

<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>cremoris</i>	60 - 95%, preferiblemente 70 - 90%
<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>cremoris</i>	5 - 40%, preferiblemente 10 a 30%

10

[0047] Entre los intervalos anteriores, se prefiere tener de 0,25 a 6% de *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* y de 7 a 30% de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

[0048] Por supuesto la suma total de los porcentajes de las 4 especies diferentes de LAB no puede exceder el 100%. No obstante, puede ser menos de 100% si otras bacterias a parte de las 4 mencionadas están presentes en el cultivo tipo LD. Los ejemplos prácticos 1 y 2 proporcionan aquí ejemplos de cultivos tipo LD estabilizados.

15

[0049] El cultivo como se describe en este caso puede ser un cultivo termofílico que consiste en bacterias termofílicas cuya temperatura de crecimiento óptimo se encuentra en el rango de aproximadamente 40 a aproximadamente 45°C.

20

[0050] El cultivo como se describe en este caso comprende LAB capaces de utilizar sacarosa. El *Lactobacillus acidophilus* termofílico es capaz de utilizar sacarosa. Por consiguiente, en una forma de realización preferida el cultivo congelado es un cultivo que comprende *Lactobacillus acidophilus*, preferiblemente un cultivo puro de *Lactobacillus acidophilus*. El ejemplo práctico 4 muestra aquí un ejemplo de un cultivo puro y estabilizado de *Lactobacillus acidophilus*.

25

[0051] El *Streptococcus thermophilus* termofílico es capaz de utilizar sacarosa. Por consiguiente, en una forma de realización preferida el cultivo congelado es un cultivo mixto

"Cultivo de yogur" que comprende *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*; o "Cultivo termofílico de queso" que comprende *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus helveticus*.

30

Cultivos congelados altamente concentrados de bacterias del ácido láctico

35

[0052] Los cultivos congelados como se describe en este caso son, lo que en la industria alimentaria puede denominarse, cultivos altamente concentrados de bacterias del ácido láctico congeladas. Para comprender bacterias suficientes, tales cultivos deberían ser relativamente grandes (tener un peso suficiente) junto con una concentración relativamente alta de bacterias viables. Es obvio que si se requieren relativamente más bacterias el peso y/o la concentración de bacterias viables deberían ser aumentados.

40

[0053] Preferiblemente, un cultivo de bacterias de ácido láctico (LAB) congeladas como se describe en este caso tiene un peso de al menos 100 g de material congelado, más preferiblemente un peso de al menos 250 g de material congelado, incluso más preferiblemente un peso de al menos 500 g de material congelado y de la forma más preferible un peso de al menos 900 g de material congelado. Preferiblemente, el peso del material congelado es inferior a 500 kg.

45

[0054] Preferiblemente, un cultivo de bacterias de ácido láctico (LAB) congeladas como se describe en este caso tiene un contenido de bacterias viables de al menos  $5 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado, más preferiblemente un contenido de bacterias viables de al menos  $10^{10}$  unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado, y de la forma más preferible un contenido de bacterias viables de al menos  $2 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado.

50

[0055] Se conocen en la técnica fermentaciones y medios de fermentación adecuados para LAB y el experto en la materia es capaz de seleccionar los medios y condiciones de fermentación adecuados en relación a las LAB específicas. Medios adecuados y fermentaciones se muestran aquí en la sección de ejemplo práctico.

55

[0056] Para obtener cantidad suficiente de bacterias, en el presente contexto se prefiere hacer una fermentación a escala relativamente grande en los tanques de gran fermentación adecuados. Se prefieren tanques de fermentación de al menos 50 L, preferiblemente al menos 90 L o mayores.

[0057] Después de una fermentación adecuada, las bacterias viables se aíslan preferiblemente por eliminación del líquido (sobrenadante) del medio de fermentación (p. ej. por centrifugado). Las bacterias viables aisladas se pueden

denominar como la biomasa aislada. Las bacterias viables aisladas deben presentar preferiblemente un contenido de bacterias viables de al menos  $10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por g o ml.

[0058] El cultivo congelado se puede embalar de manera adecuada para ser proporcionado al usuario.

5

[0059] El cultivo congelado se almacena preferiblemente a una temperatura entre  $-18^{\circ}\text{C}$  y  $-60^{\circ}\text{C}$ , más preferiblemente entre  $-18^{\circ}\text{C}$  y  $-50^{\circ}\text{C}$ . El cultivo congelado se puede almacenar a una temperatura entre  $-18^{\circ}\text{C}$  y  $-25^{\circ}\text{C}$ . La congelación del cultivo se debe hacer preferiblemente de forma rápida por ejemplo por congelación en nitrógeno líquido.

10 Agente crioprotector

[0060] El agente crioprotector puede ser seleccionado preferiblemente a partir de proteínas, hidrolizados de proteínas y aminoácidos. Ejemplos adecuados preferidos de estos incluyen los seleccionados del grupo formado por ácido glutámico, lisina, glutamato de sodio, caseinato de sodio, extracto de malta, polvo de leche desnatada, polvo de lactosuero, extracto de levadura, gluten, colágeno, gelatina, elastina, queratina, y albúminas.

15

[0061] Más preferiblemente el agente crioprotector es un carbohidrato. Ejemplos adecuados preferidos de estos incluyen los seleccionados del grupo formado por pentosas (por ejemplo, ribosa, xilosa), hexosas (por ejemplo, fructosa, manosa, sorbosa), disacáridos (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, melibiosa, lactulosa), oligosacáridos (por ejemplo, rafinosa), oligofruktosas (por ejemplo, Actilight, fribrosas), polisacáridos (por ejemplo, maltodextrinas, goma xantana, pectina, alginato, celulosa microcristalina, dextrano, PEG), y polialcoholes (sorbitol, manitol).

20

[0062] El carbohidrato preferido es un disacárido preferiblemente trehalosa y más preferiblemente sacarosa.

25

[0063] Una mezcla preferida de agentes crioprotectores es un disacárido (preferiblemente sacarosa) con un polisacárido (preferiblemente maltodextrina). El ejemplo 4 muestra un cultivo termofílico de *Lactobacillus acidophilus* estabilizado con una mezcla de sacarosa y maltodextrina. Por consiguiente, para un cultivo que contenga *Lactobacillus acidophilus* se prefiere usar una mezcla de un disacárido (preferiblemente sacarosa) y un polisacárido (preferiblemente maltodextrina) como agente crioprotector.

30

[0064] Preferiblemente el cultivo congelado comprende entre un 2% y un 70% de un agente crioprotector medido como p/p del material congelado, más preferiblemente de un 3% a un 50% de un agente crioprotector medido como p/p del material congelado, incluso más preferiblemente entre un 4% y un 40% de un agente crioprotector medido como p/p del material congelado y de la forma más preferible entre un 4% y un 10% de un agente crioprotector medido como p/p del material congelado.

35

[0065] La adición del agente crioprotector, después de la fermentación, a las bacterias viables aisladas (biomasa) puede realizarse mezclando el agente crioprotector sólido con la biomasa durante por ejemplo 30 minutos a una temperatura adecuada. Si el agente crioprotector es por ejemplo sacarosa, una temperatura adecuada puede ser de temperatura ambiente. Como alternativa una disolución estéril del agente crioprotector se puede mezclar con la biomasa. Para la sacarosa, las disoluciones estériles adecuadas pueden estar compuestas de un 50% (p/p) de disolución de sacarosa. Para la trehalosa, las disoluciones estériles adecuadas pueden estar compuestas por un 40% (p/p) de disolución.

40

45 Uso del cultivo de bacterias de ácido láctico (LAB) congelado

[0066] Un cultivo de bacterias de ácido láctico (LAB) congeladas como se describe en este caso se puede utilizar en un proceso de elaboración de un alimento o producto de alimentación según la técnica.

45

[0067] Un cultivo tipo L se utiliza preferiblemente para hacer sólo queso con agujeros pequeños (queso cottage) y productos lácteos coagulados con baja producción de  $\text{CO}_2$ .

50

[0068] Un *cultivo tipo LD* se utiliza preferiblemente para hacer queso con tamaños de agujero normales, productos lácteos coagulados (cuajada) y mantequilla agria.

55 **EJEMPLOS:**

Materiales y métodos

*Cultivos:*

60

[0069] FI DaN, CH N 11 y CH N19 (todos los cultivos tipo LD congelados disponibles comercialmente, Chr. Hansen A/S, Dinamarca).

[0070] R-603 (*cultivo tipo O* congelado disponible comercialmente, Chr. Hansen A/S, Dinamarca).

La-5 (cultivo de *Lactobacillus acidophilus* congelado disponible comercialmente, Chr. Hansen A/S, Dinamarca).

5

*Medios de fermentación y condiciones de fermentación:*

Composición del medio para *cultivos tipo LD* y *tipo O*:

10 [0071] El medio de fermentación presentaba la siguiente composición: peptona de caseína, 30 g/l; Primatone, 30 g/l; peptona de soja, 30 g/l; peptona de levadura, 15 g/l; MgSO<sub>4</sub>, 1,5 g/l; ascorbato de sodio, 3 g/l; y lactosa 50 g/l. El medio fue esterilizado por tratamiento UHT. El medio final tiene un pH de 6,5.

Condiciones de fermentación para *cultivos tipo LD* y *tipo O*:

15

[0072] La fermentación fue realizada en un tanque de fermentación de 100 L a 30 °C, agitado a 50 r.p.m. Un 1 % del cultivo mencionado arriba fue usado como inóculo. La fermentación anaeróbica se llevó a cabo con nitrógeno en el espacio de cabeza y una presión de aproximadamente 2 bar. Los cultivos se dejaron acidificar hasta pH 6.2. El pH se mantuvo posteriormente a 6,2 por adición controlada de NH<sub>4</sub>OH 13,4 N. Cuando no se detectó mayor consumo de base, el cultivo respectivo fue enfriado hasta aproximadamente 10 °C.

20

[0073] Después del enfriamiento, cada uno de los caldos de fermentación fueron concentrados por centrifugado y posteriormente congelados como gránulos en nitrógeno líquido. Los gránulos fueron medidos inmediatamente después de la congelación por su actividad de acidificación y CFU/g y almacenados a - 50°C hasta posteriores análisis.

25

Medios y condiciones de fermentación para *Lactobacillus acidophilus* (La-5):

[0074] El cultivo fue crecido en caldo MRS (Merck, Damstadt, Alemania) en un tanque de fermentación de 100 L a 37 °C, agitado a 20 r.p.m. Un 1 % del cultivo mencionado arriba fue usado como inóculo. La fermentación anaeróbica se llevó a cabo con nitrógeno en el espacio de cabeza y una presión de aproximadamente 2 bar. Los cultivos se dejaron acidificar hasta pH 5,5. El pH fue posteriormente mantenido a 5,5 por adición controlada de NH<sub>4</sub>OH 13,4 N. Cuando no se detectó mayor consumo de base, el cultivo respectivo fue enfriado hasta aproximadamente 10 °C.

30

[0075] Después del enfriamiento, cada uno de los caldos de fermentación fueron concentrados por centrifugado y posteriormente congelados como gránulos en nitrógeno líquido. Los gránulos fueron medidos inmediatamente después de la congelación por su CFU/g y almacenados a - 50°C hasta posteriores análisis.

35

*Ensayo de actividad acidificante y análisis de CFU:*

[0076] El cultivo congelado fue inoculado en un nivel de un 0,01 % en 200 mL de leche desnatada reconstituida y esterilizada (RSM) que contiene un 9,5 % de materia sólida y RSM fueron incubadas a 30 °C durante 6 h para permitir la acidificación del material de sustrato. La actividad de acidificación fue medida como se describe en el procedimiento analítico Q-AM-052, "acidification activity - UHT", Chr. Hansen A/S (Dinamarca).

40

El análisis de CFU fue medido y calculado como se describe en el procedimiento analítico Q-AM-071, "Enumeration of microorganisms" y Q-AM-022 "Calculation of total count, Chr. Hansen A/S (Dinamarca) using substrate 1209 - LD agar DK-med-rec-123, Chr-Hansen A/S (Dinamarca) o MRS agar.

45

Ejemplo 1: Estudio de estabilidad de un cultivo tipo LD congelado de FI DaN y CH N11 utilizando sacarosa, cloruro de cisteína y citrato sódico como agentes crioprotectores.

50

[0077] Este ejemplo describe el estudio de estabilidad con cultivos congelados (F-DVS) de FI DaN y CH N<sub>11</sub> formulados con sacarosa, cloruro de cisteína y citrato sódico como agentes crioprotectores. En todos los experimentos la concentración de cloruro de cisteína y de citrato sódico se mantuvo constante por gramo de biomasa concentrada. La concentración de sacarosa por gramo de biomasa se varió desde un 6 % (p/p) hasta un 36 % (p/p). Todos los aditivos fueron adicionados al concentrado como sólidos.

55

[0078] Después de la fermentación, la biomasa fue cosechada y concentrada por centrifugado desde los caldos de fermentación de CH N 11 y FI DaN. El concentrado celular de cada cultivo fue dividido en porciones apropiadas de 300 gramos y formulado como se especifica abajo en la tabla 1. Los aditivos y concentrados fueron mezclados durante 30 minutos y posteriormente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -50 °C. El cultivo congelado presenta un contenido de bacterias viables de al menos 10<sup>10</sup> unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado. La actividad del cultivo en la leche fue medida el mismo día de la formulación y seguido periódicamente durante un año.

60

Tabla 1. Procedimiento de formulación para F-DVS de FI DaN y CH N11.

Identificación de la formulación	Concentrado celular (g)	Cloruro de cisteína (g)	Citrato sódico (g)	Sacarosa (g)	Sacarosa (%)	FI DaN (CFU/g)	CH N11 (CFU/g)
F-DVS	300	0,00	0,00	0	0	4,0E+10	5,0E+10
F-DVS 6 % sacarosa	300	0,06	0,75	21	6	3,7E+10	4,7E+10
F-DVS 10 % sacarosa	300	0,06	0,75	36	10	3,6E+10	4,5E+10
F-DVS 22 % sacarosa	300	0,06	0,75	86	22	3,1E+10	3,9E+10
F-DVS 36 % sacarosa	300	0,06	0,75	171	36	2,5E+10	3,2E+10

5 [0079] Perfiles de estabilidad para F-DVS de FI DaN y CH N11 presentados como actividad frente a número de días y diferencias de actividad en comparación con el día 0 se resumen en las figuras 1 a 4. Es evidente que F-DVS de FI DaN y CH N 11 libre de aditivos está perdiendo actividad por tanto estabilidad. La reducción en la estabilidad es igual a 0,40 unidades de pH para CH N 11 y 0,60 unidades de pH para FI DaN después de 365 días. Todas las formulaciones de sacarosa evaluadas (6 %, 10 %, 22 % y 36 %) parecen tener efecto positivo en la estabilidad. La actividad se reduce aprox. 0,1 unidad de pH después de 365 días de efecto positivo en la estabilidad. La actividad se reduce aprox. 0,1

10 unidad de pH después de 365 días de almacenamiento a - 55°C.

*Ejemplo 2: Estudio de estabilidad de un cultivo tipo LD congelado de FI DaN, CH N11 y CH N19 utilizando sacarosa y trehalosa como agentes crioprotectores.*

15 [0080] Este ejemplo describe el estudio de estabilidad con cultivos congelados de FI DaN y CH N11 y CH N 19 formulados con sacarosa y trehalosa como agentes crioprotectores. La concentración de sacarosa por gramo de biomasa se varió desde un 6 % (p/p) hasta un 10 % (p/p). La trehalosa sólo se evaluó en un nivel 5 (p/p). Todas las concentraciones de sacarosa se prepararon a partir de una disolución al 50 % (p/p) de sacarosa añadida a la biomasa. La concentración de trehalosa se preparó a partir de una disolución al 40 % (p/p).

20 [0081] Después de la fermentación, la biomasa fue cosechada y concentrada por centrifugado de los caldos de fermentación de FI DaN, CH N 11 y CH N19. El concentrado celular de cada cultivo fue dividido en porciones apropiadas de 300 gramos y formulado como se especifica en la tabla 2 a continuación. Los aditivos y concentrados fueron mezclados durante 30 minutos y posteriormente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a - 50 °C. El cultivo congelado presenta un contenido de bacterias viables de al menos 10<sup>10</sup> unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado. La actividad de cultivo en la leche fue medida el mismo día de la formulación y seguido periódicamente durante 70 días.

30 Tabla 2. Procedimiento de formulación para F-DVS de FI DaN, CH N 11 & CH N19 utilizando sacarosa y trehalosa como agentes crioprotectores

Identificación de la formulación	Concentrado celular (g)	Disolución aditiva (g)	Conc. aditivo final (% sacarosa)	FI DaN CFU/g	CHN19 CFU/g
F-DVS	300	0	0	3,0E+10	4,0E+10
F-DVS/07G	300	43	6	2,6E+10	3,5E+10
F-DVS 5% trehalosa	300	43	5	2,6E+10	3,5E+10
F-DVS 3% sacarosa	300	19	3	2,8E+10	3,8E+10
F-DVS 5% sacarosa	300	34	5	2,7E+10	3,6E+10
F-DVS 6% sacarosa	300	42	6	2,6E+10	3,5E+10
F-DVS 8% sacarosa	300	57	8	2,5E+10	3,4E+10
F-DVS 9% sacarosa	300	66	9	2,5E+10	3,3E+10

(continuación)

## ES 2 427 542 T3

Identificación de la formulación	Concentrado celular (g)	Disolución aditiva (g)	Conc. aditivo final (% sacarosa)	FI DaN CFU/g	CHN19 CFU/g
F-DVS 10% sacarosa	300	75	10	2,4E+10	3,2E+10
F-DVS 13% sacarosa	300	105	13	2,2E+10	3,0E+10

[0082] Los perfiles de estabilidad para F-DVS de FI DaN, CH N11 & CH N19 utilizando sacarosa y trehalosa como agentes crioprotectores se resumen en las figuras 5 a 10.

5 [0083] Todos cultivos de referencia muestran pérdida de actividad (FI DaN: 0,3 unidades de pH después de 65 días a -50 °C; CH N 11: 0,17 unidades de pH después de 60 días a -50 °C; CH N 19: 0,25 unidades de pH después de 70 días a -50 °C). Todas las formulaciones evaluadas reducen la pérdida de actividad en comparación con los cultivos de referencia. Además, es difícil concluir qué concentración de sacarosa es la óptima respecto a la estabilidad.

10 [0084] De los perfiles de estabilidad de FI DaN y CH N19 se puede observar que las formulaciones de referencia y las formulaciones de sacarosa evaluadas muestran una pérdida inicial de actividad en las primeras 1-3 semanas de almacenamiento. De aquí en adelante, todos los concentrados de sacarosa formulados muestran un perfil de estabilidad constante. FI DaN muestra una pérdida inicial más alta que CH N19. No obstante, ninguna pérdida inicial de actividad pudo ser observada en los perfiles de estabilidad de todas las formulaciones evaluadas de CH N11.

15 Ejemplo 3: Estudio de estabilidad de un cultivo tipo O congelado de R-603

20 [0085] La pérdida inicial de actividad durante las primeras 1 - 3 semanas no se ha observado hasta el momento para cualquiera de los *cultivos tipo O* disponibles comercialmente de Chr. Hansen A/S (*Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*). Los perfiles de estabilidad para R603 seguidos hasta 35 días y analizados por acidificación en medios M17 se resumen en la figura 11.

Ejemplo 4: Estudio de estabilidad de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) congelado.

25 [0086] Este ejemplo describe el estudio de estabilidad de cultivos congelados de *Lactobacillus acidophilus* formulados con sacarosa o sacarosa y maltodextrina como agentes crioprotectores. La concentración de sacarosa por gramo de biomasa fue de un 32 % (p/p). Sacarosa y maltodextrina fueron evaluadas a nivel de 16/16 % (p/p).

30 [0087] Después de la fermentación, la biomasa fue cosechada y concentrada por centrifugado. El concentrado celular fue dividido en porciones apropiadas de 300 gramos y formulado. Los aditivos y concentrados se mezclaron durante 30 minutos y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20; -50 o -80 °C. La estabilidad fue medida como unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado en MRS agar a 37°C (72 horas).

35 **Tabla 3: *Lactobacillus acidophilus* almacenado a temperaturas diferentes. La estabilidad de almacenamiento se mide como CFU/g después de 6, 13, y 68 días**

Días	Temp = -20°C	Temp = -50°C	Temp = -80°C	+ 32% sacarosa a -20°C
0	4.35E+10	4.35E+10	4.35E+10	3.82E+10
6	3.14E+10	4.87E+10	4.77E+10	2.61E+10
13	2.75E+10	4.37E+10	4.61E+10	2.50E+10
68	6.52E+09	4.15E+10	4.14E+10	2.51E+10

**Tabla 4: *Lactobacillus acidophilus* almacenado a -20 °C sin aditivos y con un 32 % de sacarosa o con 16 % de sacarosa + 16% de maltodextrina.**

Días	sin aditivos	32% Sacarosa	16% Sacarosa + 16% maltodextrina
0	2.81E+10	3.02E+10	3.82E+10
7	1.81E+10	1.99E+10	2.97E+10
14	1.11E+10	1.56E+10	2.04E+10
21	fuera de rango	1.98E+10	2.93E+10
54	8.60E+09	1.53E+10	2.54E+10

[0088] *Lactobacillus acidophilus* parece estable al almacenamiento a -50 y -80 °C, pero la viabilidad disminuye si el cultivo se almacena a -20 °C. Usando aditivos; sacarosa o sacarosa y maltodextrina - es posible mejorar la estabilidad del cultivo a -20 °C.

5 REFERENCIAS:

[0089]

EP 259739 A1, Miles Laboratories, 16 marzo 1988

10

F.J. Chavarri et al, "Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus Lactis* strains" *Biotechnology letters*, vol 10, 1,11-16 (1988)

15

R. Cárcoba et al., "Influence of cryoprotectants on the viability and acidifying activity of frozen and freeze-dried cells of the novel starter strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 5180", *Eur Food Res Technol* (2000) 211,433 - 437

WO 00/39281, Chr. Hansen A/S, 6 julio 2000

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Cultivo congelado de bacterias de ácido láctico (LAB) que comprende LAB que pueden utilizar sacarosa y es un cultivo mesofílico mixto que consiste en bacterias mesofílicas cuya temperatura de crecimiento óptimo es de aproximadamente 30°C, tiene un peso de al menos 50 g de material congelado y un contenido de bacterias viables de al menos 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado y **se caracteriza por el hecho de que** el cultivo congelado comprende de 0.5 % a 80 % de un agente crioprotector medido como p/p del material congelado.
- 10 2. Cultivo congelado según la reivindicación 1, donde el cultivo es un *cultivo tipo LD* que comprende *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* biovar. *diacetylactis* y *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris*.
- 15 3. Cultivo congelado según la reivindicación 1, donde el cultivo es un cultivo que comprende *Lactobacillus acidophilus* termofílico.
4. Cultivo congelado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el agente crioprotector es un carbohidrato, preferiblemente un disacárido.
- 20 5. Cultivo congelado según la reivindicación 4, donde el disacárido es trehalosa o sacarosa.
6. Cultivo congelado según la reivindicación 4, donde el agente crioprotector es una mezcla de un disacárido, preferiblemente sacarosa, y un polisacárido, preferiblemente maltodextrina.
- 25 7. Método para hacer un cultivo congelado de bacterias de ácido láctico (LAB) que comprende LAB capaces de utilizar sacarosa, tiene un peso de al menos 50 g de material congelado y un contenido de bacterias viables de al menos 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado comprendiendo los pasos siguientes:
- 30 (i) adición de un agente crioprotector a las bacterias viables para obtener como mínimo 50 g de material con un contenido de bacterias viables de al menos 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material y comprendiendo el agente crioprotector en una cantidad de 0,5 % a 80 % medido como p/p del material,
- (ii) congelación del material para obtener material congelado, y
- (iii) embalaje del material congelado de una manera adecuada.
- 35 8. Uso del cultivo congelado de bacterias de ácido láctico (LAB) según cualquiera de reivindicaciones 1-6 en un proceso de fabricación de un producto alimenticio o de pienso.

□

Perfiles de estabilidad para F1 DaN - pH (espec: 5,40-5,70).

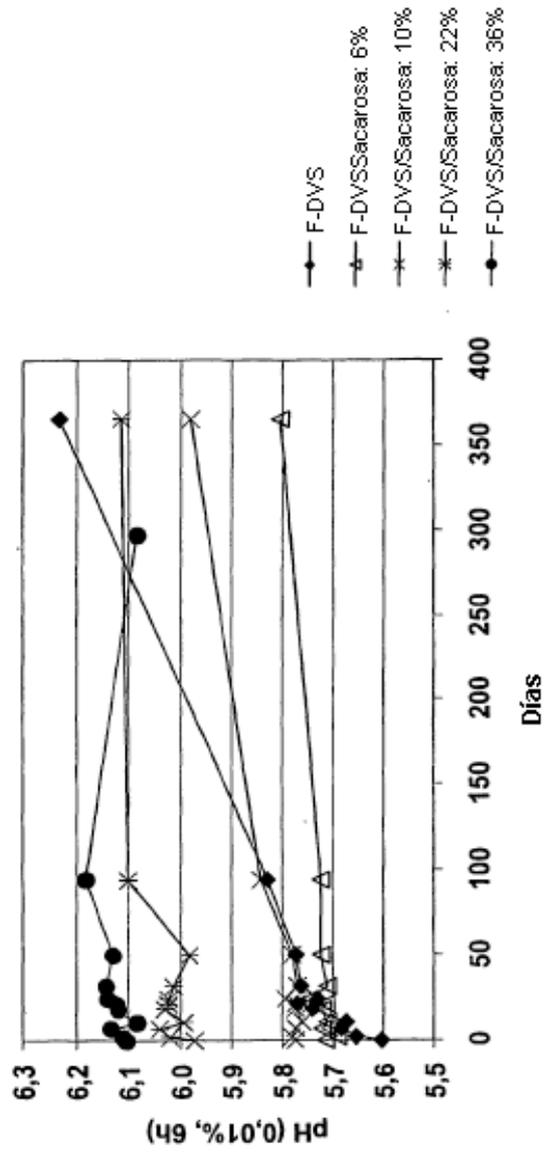


Fig. 1

Diferencia de pH en comparación con el día 0 - FI DaN

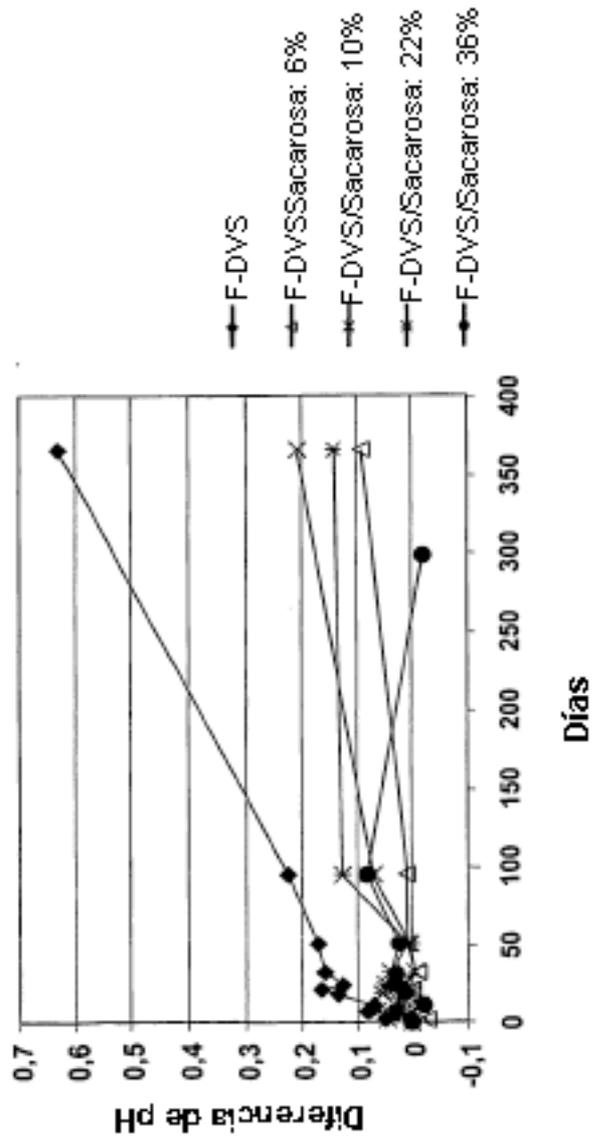


Fig. 2

Perfil de estabilidad para CH N 11 - pH (espec: 5,10 - 5,40)

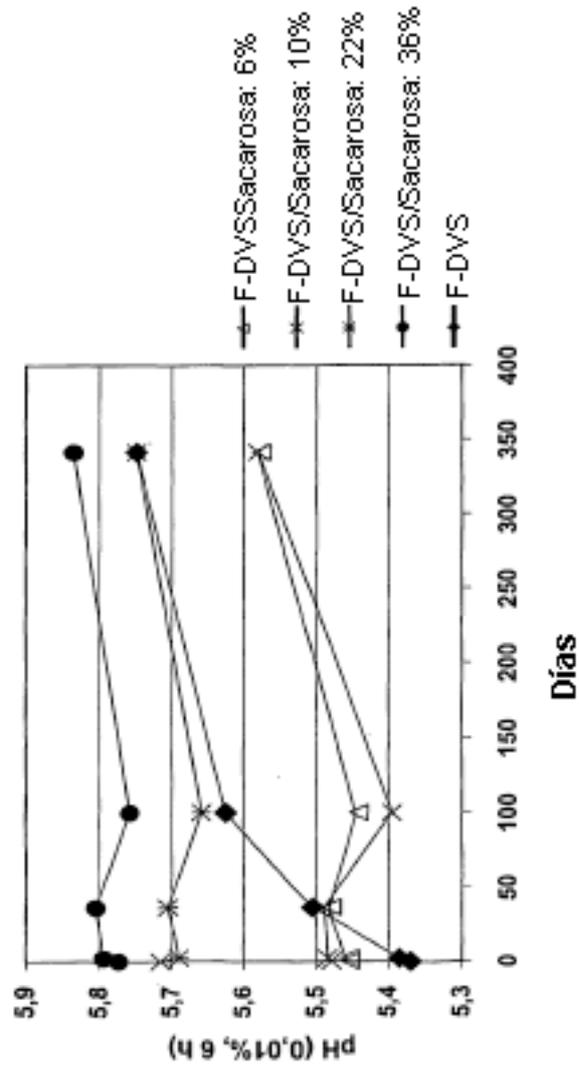
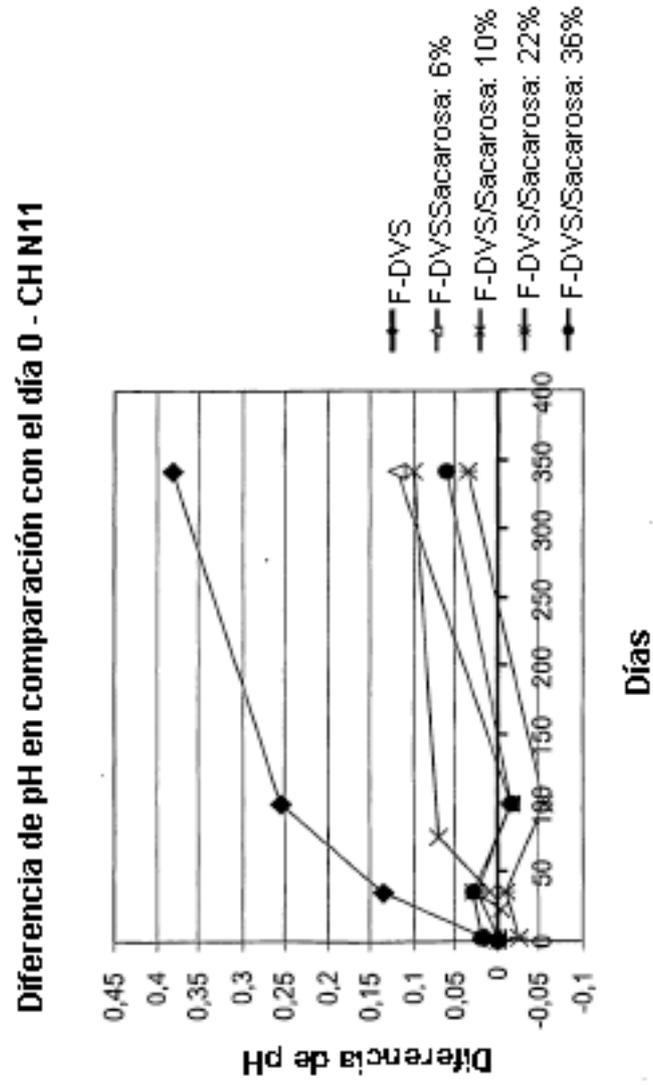


Fig. 3



**Fig. 4**

Perfiles de estabilidad para FI DaN utilizando sacarosa y trehalosa - pH (espec: 5,40-5,70).

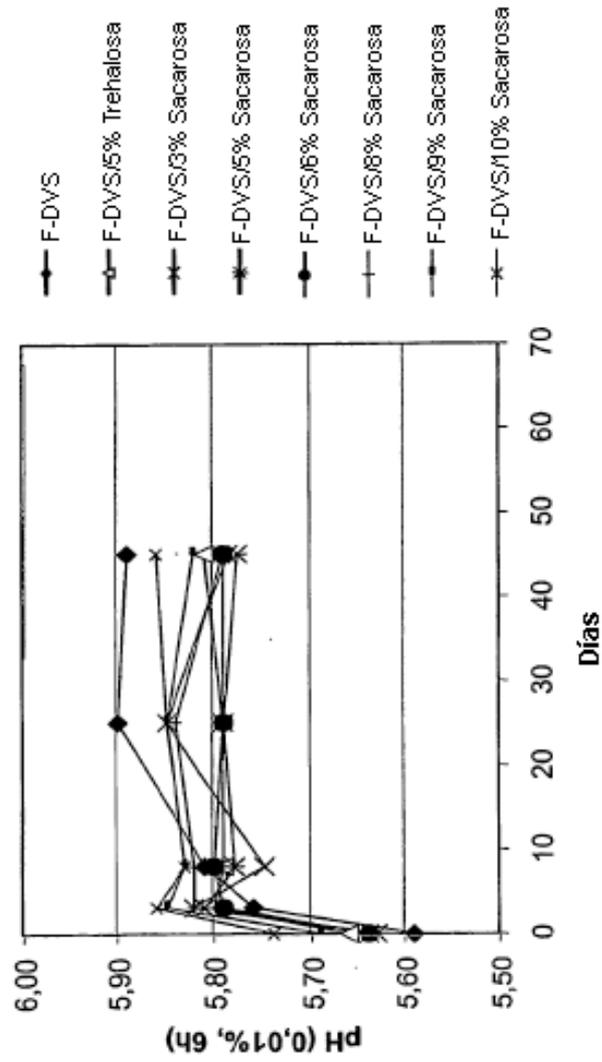
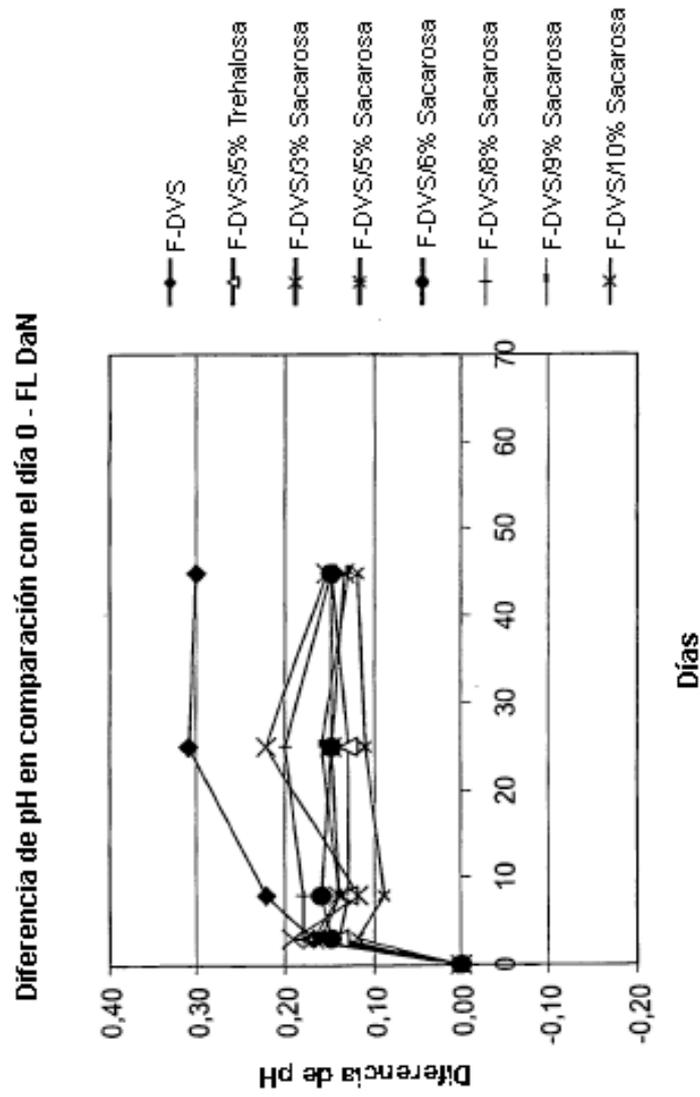


Fig. 5



**Fig. 6**

Perfiles de estabilidad para CH N 11 utilizando sacarosa y trehalosa - pH (espec: 5, 10-5,40).

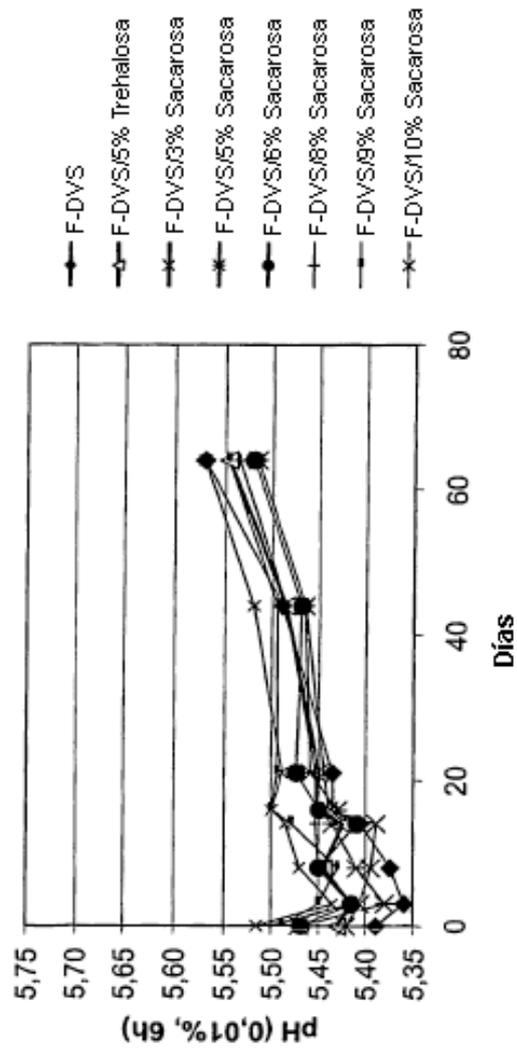


Fig. 7

Diferencias de pH en comparación con el día 0 - CH N 11

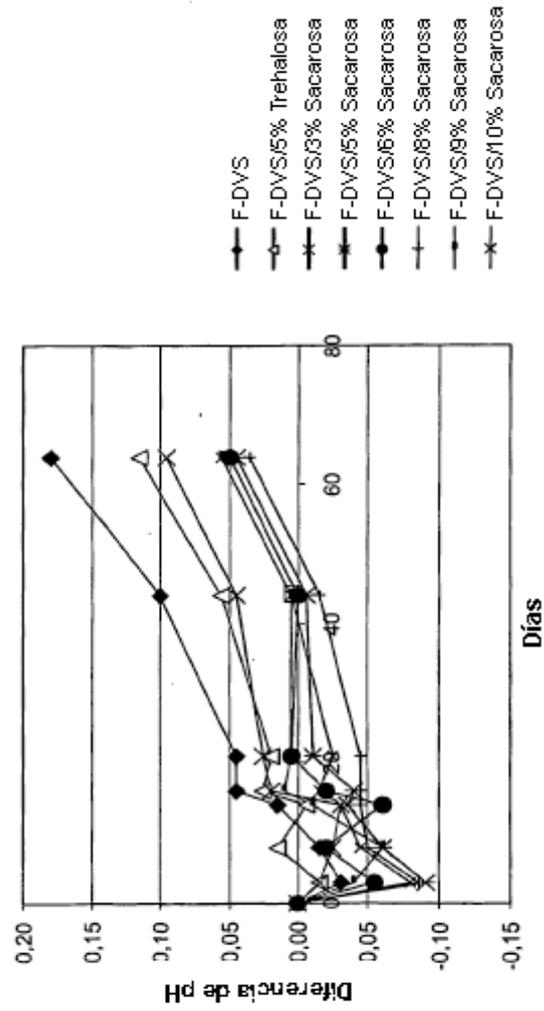


Fig. 8

Perfiles de estabilidad para CH N19 utilizando sacarosa y trehalosa - pH (espec: 5, 10-5,40).

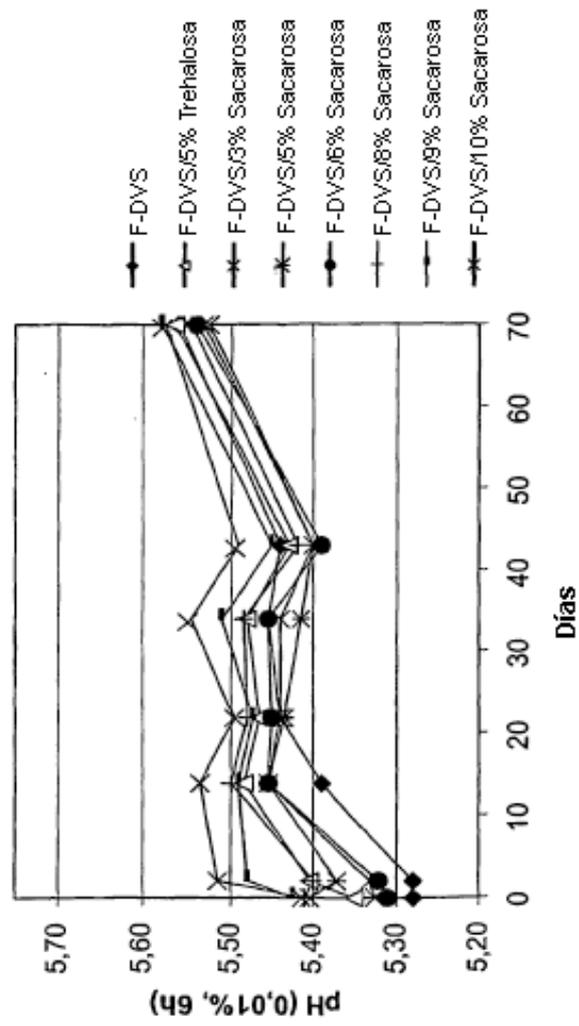
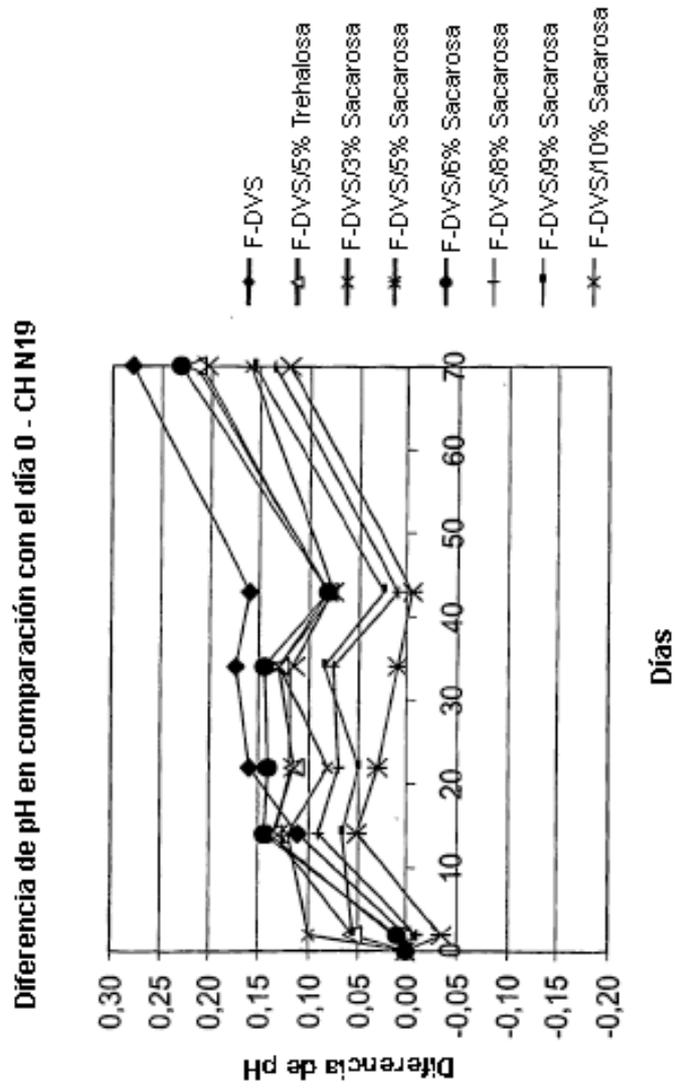


Fig. 9



**Fig. 10**

Datos de estabilidad de F-DVS R603 - Acidificación en M13

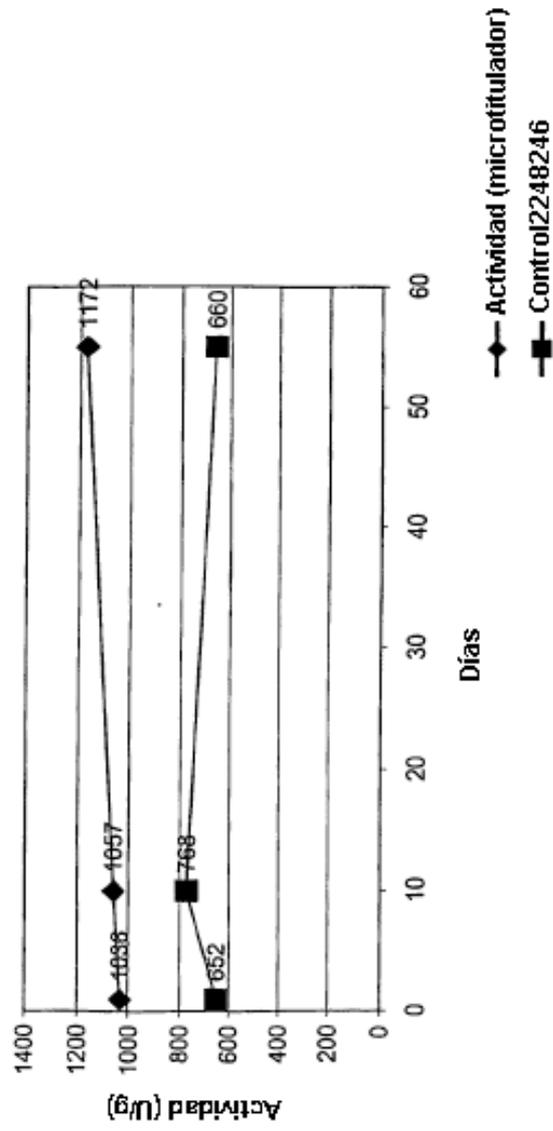


Fig. 11