

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 616**

51 Int. Cl.:

A23C 19/032 (2006.01)

A23C 19/068 (2006.01)

A23C 19/05 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2009** **E 09170938 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014** **EP 2165608**

54 Título: **Método para producir queso usando un cultivo directo a cuba productor de nisina**

30 Prioridad:

22.09.2008 EP 08164778

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

11.08.2014

73 Titular/es:

**CSK FOOD ENRICHMENT B.V. (100.0%)
PALLASWEG 1
8938 AS LEEUWARDEN, NL**

72 Inventor/es:

**MEIJER, WILLEM CORNELIS;
HAARMAN, MARTINUS GERARDUS MARIA;
BURGHOUT, HERMAN FRANK y
PENDERS, JOHANNES ANTONIUS**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 484 616 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

Método para producir queso usando un cultivo directo a cuba productor de nisina

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a un método para producir una masa de cuajada conformada, al igual que a un método para la producción de un queso duro o semiduro. La invención también se refiere a una masa de cuajada conformada y a un queso duro o semiduro per se. La presente masa de cuajada conformada y queso tienen un contenido de cloruro sódico y un contenido de nisina. En particular la invención incluye una masa de cuajada conformada y queso con un contenido de cloruro sódico que es relativamente bajo.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Son conocidos los cultivos productores de nisina y su uso en la fabricación de queso.

[0003] EP1273237 se refiere en un sentido a un proceso para producir un alimento fermentado o un producto de alimentación, donde el proceso incluye un paso de fermentación que usa una o varias cepas bacterianas resistentes a la nisina en presencia de nisina. Preferiblemente, el proceso comprende un paso de fermentación en el que se usa un cultivo iniciador que comprende (a) una cepa de *L. lactis* que produce nisina; y (b) una o varias cepas bacterianas resistentes a la nisina. Preferiblemente, además de la cepa de *L. lactis* que produce nisina, pueden ser además incluidas una o varias cepas de *L. lactis* inmunológicas a la nisina en el cultivo iniciador. Aquí, la cepa de *L. lactis* productora de nisina es capaz de producir una nisina y es inmune a las nisinas, por lo cual la capacidad para producir nisina y la inmunidad a la nisina se codifican por información genética que está presente o deriva de un transposón, tal como Tn5276. Preferiblemente el producto fermentado es un producto lácteo, ensilaje o un producto de carne fermentada. El producto lácteo es preferiblemente queso, dentro del cual se prefieren quesos que no sean Gouda. Los más preferidos son los quesos cuya producción implica fermentación con una bacteria sin *L. lactis*. EP1273237 además indica que una "[...] aplicación exitosa de nisina afecta a su uso en la producción de queso procesado y queso de untar para evitar el brote de clostridios."

[0004] Bouksaim et al., en "Effects of mixed starter composition on nisin Z production by *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719 during production and ripening of Gouda cheese", International J. of Food Microbiol. 2000, 59,141-156, revela un sistema de cultivo iniciador que produce tanto ácido como nisina en la leche para la producción de queso Gouda. El sistema de cultivo comprende un cultivo UL719 productor de nisina durante toda la noche en combinación con un iniciador Flora Danica.

Resumen de la invención

[0005] Se ha descubierto que el método según EP1273237 puede ser difícil de controlar en cuanto a la producción de nisina y/o acidificación a través del uso de uno o más de los cultivos inmunológicos a la nisina y del cultivo productor de nisina descrito en EP1273237 en los rangos de concentración como se ha indicado aquí, todos como un iniciador a granel. En particular, la producción de nisina en y/o acidificación de las cuajadas pueden no ser suficientes en cada lote de fabricación de queso, especialmente en un entorno sin laboratorio tal como un entorno industrial o artesanal de fabricación de queso.

[0006] Además, el método según EP1273237 resultó menos adecuado para producir un tipo de queso Gouda tradicional, con un sabor rico y limpio característico que preferiblemente no contenga diferentes toques de sabor a nueces y/o dulces. Aunque EP1273237 menciona que "La combinación de Dairysafe™ TC17 y 13M, usado en cantidades iguales, permite la producción de queso Gouda de alta calidad y produce in situ aproximadamente 150 - 400 UI de nisina por gramo de queso", se ha descubierto que la calidad puede concernir a la textura del queso, y menos a su gusto y/o sabor.

[0007] Se nota que las bacterias inmunes a la nisina de *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, un *P. freudenreichii* subesp. *freudenreichii*, un *S. thermophilus*, un *Lb. crispatus*, un *Lb. plantarum* y un *Lb. sanfrancisco* no pueden ser adecuadamente empleados como cultivos iniciadores de acidificación cuando se usan a solas, opcionalmente en combinación con TC-17.

[0008] También se constata que en los ejemplos de fabricación de queso descritos en EP1273237, las cepas bacterianas son combinadas y dosificadas juntas en la leche de queso. Estos ejemplos no revelan explícitamente si las cepas se usan como un iniciador a granel o como un iniciador directo a cuba.

[0009] El método según Bouksaim et al. también puede ser difícil de controlar, particularmente para suministrar

ES 2 484 616 T3

reproductivamente producción de nisina suficiente y acidificación adecuada de las cuajadas, especialmente en un ajuste industrial. Además, el método según Bouksaim et al. puede producir queso tipo Gouda con un sabor suave, que carece de la limpieza y complejidad de un queso de tipo Gouda tradicional. También se indica que el método según Bouksaim et al. emplea una dosificación relativamente alta de cultivo iniciador de Flora Danica (es decir 1.4 %).

5

[0010] En un aspecto, la presente invención pretende proporcionar un sistema alternativo de cultivo preferiblemente mejorado que proporcione una producción reproducible de suficiente ácido láctico y nisina en cuajadas durante la producción de queso.

10

[0011] Este objeto se encuentra proporcionando, en un primer aspecto, un método para producir una masa de cuajada conformada que comprende un contenido de nisina y un contenido de cloruro sódico de una composición de leche de queso, el método incluye

15

a. proporcionar un iniciador a granel intolerante a la nisina; y

b. mezclar leche, un coagulante, el iniciador a granel intolerante a la nisina y un cultivo directo a cuba productor de nisina en una cantidad de al menos 10^4 cfu/ml, preferiblemente en una cantidad de al menos $1,0 \cdot 10^5$ cfu/ml de la leche, para proporcionar la composición de leche de queso.

20

donde el cultivo directo a cuba productor de nisina todavía experimenta un tiempo de retardo después de dicha mezcla, y/o donde el cultivo directo a cuba productor de nisina se suministra como un cultivo liofilizado o congelado.

[0012] Este método preferiblemente comprende además los siguientes pasos

25

c. permitir a la composición de leche de queso coagular para proporcionar cuajadas;

d. opcionalmente, lavar las cuajadas;

30

e. presionar las cuajadas para producir una masa de cuajada conformada; y

f. salar la masa de cuajada conformada en la solución salina para producir la masa de cuajada conformada que comprende el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina.

35

[0013] En consecuencia se obtiene una masa de cuajada conformada que comprende un contenido de cloruro sódico que varía entre el 0,5 y 5 % en peso basado en el peso en seco de la masa de cuajada conformada, y que consta de un contenido de nisina superior a 10 UI/g, preferiblemente superior a 40 UI/g. Se prefiere especialmente que la masa de cuajada conformada comprenda un contenido de nisina que varíe entre 10 y 1200, más preferiblemente entre 10 y 800 UI/g, aún incluso más preferiblemente entre 40 y 750 UI/g, más preferiblemente entre 50 y 400 UI/g de la masa de cuajada conformada.

40

[0014] El presente método tiene otra ventaja, ya que se puede obtener un índice de acidificación óptimo de las cuajadas, especialmente porque se puede obtener un valor de pH suficientemente bajo en las cuajadas ya después de 6 horas de provisión de la composición de leche de queso en el paso (b.), dicho valor de pH que varía preferiblemente entre 5,0 y 5,8, más preferiblemente entre 5,1 y 5,7. Adicionalmente o alternativamente, la presencia del cultivo directo a cuba productor de nisina preferiblemente causa que el pH de cuajadas obtenidas después de 6 horas de la provisión de la composición de leche de queso en el paso (b.) aumente en no más de 0,2 unidades en comparación con el pH de cuajadas obtenidas de otra manera bajo condiciones idénticas pero en ausencia del cultivo directo a cuba productor de nisina.

50

[0015] El contenido de cloruro sódico puede preferiblemente ser variado a través de la adaptación de la duración del tiempo de salado en salmuera y/o variando la proporción de volumen/superficie de la masa de cuajada conformada, como conoce el experto en la materia. Por ejemplo, una masa de cuajada formada como una rueda de Gouda típica y con un peso aproximadamente de 12 kg puede precisar un tiempo de salado en salmuera aproximadamente de 70 horas para obtener en el paso (f.) una masa de cuajada conformada por un cloruro sódico de aproximadamente 3,5 % de peso con respecto al peso en seco de la masa de cuajada, que se considera un contenido de cloruro sódico "normal", especialmente para una masa de cuajada conformada que se madurará además como un queso duro o semiduro, especialmente un queso tipo Gouda. La composición de leche de queso en (b.) preferiblemente no contiene bacterias sobreproductoras de cistationina- β -liasa adicionadas, especialmente bacterias sobreproductoras de cistationina- β -liasa recombinantes. Se prefiere además que dichas bacterias sobreproductoras de cistationina- β -liasa no sean inducibles por nisina. Dichas bacterias sobreproductoras de cistationina- β -liasa se definen preferiblemente según EP 1 216 619 A2, que se incorpora por referencia aquí.

60

ES 2 484 616 T3

- [0016] El contenido de nisina de la masa de cuajada conformada obtenida en el paso (f.) puede preferiblemente variar ajustando la cantidad del cultivo directo a cuba productor de nisina en las gamas indicadas, donde preferiblemente la cantidad del cultivo directo a cuba productor de nisina en (b.) es al menos $1,0 \cdot 10^5$ cfu/ml de la leche, más preferiblemente al menos $2,0 \cdot 10^5$ cfu/ml de la leche. El iniciador a granel intolerante de nisina se añade en cantidades usuales. En términos generales, cuanto más alta es la cantidad del iniciador a granel intolerante a la nisina en relación a la cantidad del cultivo directo a cuba productor de nisina, más bajo es el contenido de nisina comprendido por la masa de cuajada conformada obtenida en (f.), y viceversa. Se obtienen excelentes resultados en términos de producción de nisina, índice de acidificación, y economía de uso del iniciador a granel intolerante de nisina y del cultivo directo a cuba productor de nisina para la cantidad del cultivo directo a cuba productor de nisina empleado en (b.) que varía entre $1,0 \cdot 10^5$ y $1,0 \cdot 10^7$, más preferiblemente entre $1,0 \cdot 10^5$ y $1,0 \cdot 10^6$, más preferiblemente entre $2,0 \cdot 10^5$ y $1,0 \cdot 10^6$ cfu/ml de la leche, y para la cantidad del iniciador a granel tolerante de nisina que varía entre 0,25 y 1,0 % (v/v), más preferiblemente entre el 0,3 % en peso y el 0,8 % en peso con respecto al peso de la leche.
- [0017] Se prefiere que la composición de leche de queso proporcionada en (b.) - preferiblemente inmediatamente después de mezclar - comprenda menos de 10 UI, más preferiblemente menos de 5 UI, incluso más preferiblemente menos de 1 UI, más preferiblemente menos de 0,5 UI o incluso menos de 0,1 UI por ml de la composición de leche de queso. Como consecuencia de dichos niveles iniciales bajos de nisina, se pueden conseguir reproductivamente índices de acidificación óptimos para permitir un proceso de fabricación del queso industrial robusto. Por otra parte, especialmente si el iniciador a granel intolerante de nisina es un intolerante a la nisina (preferiblemente mesófilo) iniciador a granel de cepa mixta, la población bacteriana de dicho iniciador a granel de cepa mixta puede comenzar a crecer favorablemente y/o comenzar a producir ácido láctico en la composición de leche de queso sin una inhibición significativa (selectiva) de una o varias cepas, sucediendo esto ya al principio del paso (b.). Dichas cantidades iniciales bajas preferidas formadas por la composición de leche de queso pueden ser convenientemente conseguidas a través del mantenimiento de la dosificación del cultivo directo a cuba productor de nisina en (b.) por debajo de 200 g de dicho cultivo por 1000 kg de la leche, preferiblemente en la gama de entre 1-200 g, más preferiblemente entre 5-100 g por 1000 kg de leche. A tales dosificaciones del cultivo directo a cuba productor de nisina, denominado "acumulación" de cualquier nisina que puede estar presente en dicho cultivo y que se puede dosificar en la composición de leche de queso y junto con el cultivo directo a cuba productor de nisina puede mantenerse a un mínimo. Tales dosificaciones preferidas pueden conseguirse convenientemente utilizando, por ejemplo, cultivos directos a cuba productores de nisina disponibles comercialmente (tales como D100, ex CSK Food Enrichment), estos cultivos son típicamente suministrados en torno a 10^{10} cfu por gramo de cultivo.
- [0018] Preferiblemente, la masa de cuajada conformada que comprende el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina se produce según un protocolo tipo Gouda.
- [0019] La presente invención también se refiere a un método para producir un queso duro o semiduro que incluye madurar la masa de cuajada conformada que está formada por el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina; dicha masa de cuajada conformada es preferiblemente madurada bajo condiciones que son típicas para un Gouda o queso tipo Gouda. La presente invención especialmente se refiere a un método para producir un queso duro o semiduro que está formado por un contenido de cloruro sódico y un contenido de nisina, el método incluye los pasos (a.) - (f.) del método para producir la masa de cuajada conformada que está formada por el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina, y que incluye además la maduración de la masa de cuajada conformada que posee el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina durante un tiempo de maduración de entre 20 - 500 días, y bajo condiciones de maduración, que incluye una temperatura de maduración de entre 4 y 25 °C, más preferiblemente de entre 7-20 °C. Preferiblemente, la masa de cuajada conformada que comprende el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina se madura según un protocolo tipo Gouda.
- [0020] Además, ha sido reconocido por primera vez que una masa de cuajada conformada con un contenido de cloruro sódico relativamente bajo (especialmente de 1-3 % del peso basado en peso en seco del queso), es muy sensible a la contaminación por bacterias gram positivas indeseadas, especialmente *Propionibacterium spp.* y/o *Clostridium spp.* y que como resultado, la masa de cuajada conformada puede desarrollar decoloración roja y/o agujeros no deseados durante la maduración. La masa de cuajada formada por el contenido de cloruro sódico relativamente bajo puede ser particularmente vulnerable a dicha contaminación durante su producción en un ajuste industrial, aunque las cuajadas se lavan en el paso (d.), e incluso si este paso de lavado se realiza en presencia de una sal de nitrato. Especialmente la contaminación por *Propionibacterium spp.* puede seguir siendo un problema.
- [0021] Ventajosamente, se ha descubierto que dicha masa de cuajada conformada puede estar adecuadamente y firmemente protegida contra la contaminación bacteriana, especialmente contra la contaminación por *Propionibacterium spp.* y/o *Clostridium spp.*, esto se puede hacer proporcionando a la masa de cuajada conformada un contenido de nisina que varíe entre 10-1200 IU/g, más preferiblemente entre 10-800 IU/g, incluso más preferiblemente entre 50-400 IU/g de

ES 2 484 616 T3

la masa de cuajada conformada.

5 [0022] La invención también se refiere a un queso duro o semiduro obtenible por maduración de la presente masa de cuajada conformada, preferiblemente a una temperatura de maduración de entre 4 y 25 °C. y, alternativamente o más preferiblemente adicionalmente, durante un tiempo de maduración de preferiblemente entre 20 - 500 días, o más preferiblemente de entre 25 - 300 días. El queso comprende aproximadamente el mismo contenido de cloruro que la masa de cuajada conformada correspondiente, es decir preferiblemente entre el 1 y 3 % del peso, más preferiblemente entre el 1 y 2,75 % del peso, incluso más preferiblemente de entre el 1,75 y 2,75 % del peso basado en el peso en seco del queso. El queso duro o semiduro comprende un contenido de nisina de al menos 10 IU/g de queso. Por consiguiente, este queso puede ventajosamente permanecer protegido contra la contaminación bacteriana indeseada, especialmente contra el estallido o la decoloración indeseados, y particularmente contra el estallido o la decoloración indeseados debidos a contaminación por *Propionibacterium spp.* y/o *Clostridium spp.*

10 [0023] Los métodos de la invención son especialmente adaptados para producir dicha masa de cuajada conformada y dicho queso, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

20 [0024] El término "iniciador a granel intolerante a la nisina" se refiere a un iniciador a granel que comprende bacterias de ácido láctico que, cuando se añaden a leche pasteurizada en alrededor del 1 % en peso con respecto al peso de la leche, en presencia de nisina a 10 unidades/ml o más, es incapaz de reducir el pH de la leche al menos 1 unidad pH durante la incubación de la leche durante 6 horas a una temperatura de 30 °C. Dicho iniciador a granel, cuando es añadido a la leche pasteurizada en alrededor del 1 % en peso, durante la incubación de la leche durante 6 horas a una temperatura de 30 °C en ausencia de cantidades detectables de nisina, es capaz de reducir el pH de la leche en al menos 0,5 unidades de pH, preferiblemente al menos 1 unidad de pH. El iniciador a granel intolerante a la nisina no es un iniciador a granel productor de nisina, es decir el iniciador a granel intolerante a la nisina es preferiblemente incapaz de producir más de 100 unidades, más preferiblemente es incapaz de producir más de 10 unidades de nisina por ml de leche pasteurizada durante la incubación de entre 8 y 40 horas en dicha leche a 30-42 °C que ha sido inoculada con el iniciador a granel en una cantidad de aproximadamente 0,5 a 1 % en peso del iniciador a granel con respecto al peso de la leche.

35 [0025] Aquí, el término "iniciador a granel" tiene su significado ordinario y se refiere a un cultivo iniciador que comprende bacterias de ácido láctico, este cultivo iniciador se prepara inoculando un medio adecuado con un cultivo madre, y permitiendo al cultivo madre crecer en el medio. Dicho cultivo madre comprende uno o varios géneros de bacterias de ácido láctico, preferiblemente en una cantidad de al menos 10^7 cfu/ml (recuento total), más preferiblemente en una cantidad de al menos 10^{10} cfu/ml (recuento total); el recuento de células total del cultivo madre puede ser inferior a 10^{13} cfu/ml o a 10^{12} cfu/ml. El medio es típicamente inoculado con aproximadamente 125 ml del cultivo madre por 1000 litros del medio. El medio normalmente comprende leche y/o dos o más ingredientes medianos seleccionados del grupo formado por una fuente de carbono (preferiblemente lactosa) y un aditivo promotor del crecimiento. El aditivo promotor del crecimiento puede ser adecuadamente seleccionado como un péptido (por ejemplo peptona y/o triptona). El iniciador a granel se considera preparado para el uso si al cultivo madre se le ha permitido crecer hasta que el pH del medio se vuelve inhibitorio al cultivo, y el crecimiento celular se detiene (normalmente por debajo de 5,5 pH y preferiblemente por debajo de 5,0 pH; si, por ejemplo, el medio es leche, típicamente alrededor de 4,6 pH); este requiere normalmente hasta 20 horas, o preferiblemente 16 horas después de la inoculación del medio con el cultivo madre cuando ha sido fermentado a 21°C. En esta fase, el iniciador a granel tiene preferiblemente una concentración de células totales de entre 10^6 y 10^{10} cfu/ml.

45 [0026] En la presente descripción, los iniciadores a granel serán nombrados después de los cultivos madre donde ellos se pueden preparar y viceversa, a menos que se indique lo contrario.

50 [0027] El término "cultivo directo a cuba productor de nisina" se refiere a un cultivo directo a cuba que es capaz, opcionalmente en presencia de un extracto de levadura, de producir al menos 10, más preferiblemente al menos 100 unidades de nisina por ml de leche (pasteurizada) durante la incubación de dicha leche durante 8 horas a 30 °C, donde la leche ha sido inoculada con el cultivo directo a cuba en alrededor de 10^5 - 10^7 cfu/ml, preferiblemente en alrededor de 10^6 cfu/ml. Esta densidad de inoculación corresponde a una dosificación, por 100 kg de leche, de aproximadamente 1 - 100 g, preferiblemente de aproximadamente 10 g del cultivo directo a cuba productor de nisina con una concentración de células totales de aproximadamente 10^{10} cfu/g.

60 [0028] El término "cultivo aditivo de sabor" se conoce en la técnica. En una forma de realización, el cultivo aditivo de

ES 2 484 616 T3

sabor no se proporciona como un iniciador a granel productor de nisina, pues este puede disturbar la favorable dinámica de población del iniciador a granel intolerante a la nisina y del cultivo directo a cuba productor de nisina. Aquí, un iniciador a granel productor de nisina preferiblemente se refiere a un iniciador a granel que es capaz de producir al menos 10 unidades, más preferiblemente al menos 100 unidades de nisina por ml de leche pasteurizada durante la incubación de 8 a 40 horas en dicha leche a 30-42 °C que ha sido inoculada con el iniciador a granel en una cantidad aproximadamente de 0,5 a 1 % en peso del iniciador a granel con respecto al peso de la leche.

[0029] El término "bacterias del ácido láctico" es conocido por el experto en la técnica y puede preferiblemente ser definido como cocci o barras gram positivos, no formadores de esporas, anaeróbicos, catalasa negativos que forman ácido láctico como un producto final de su metabolismo de carbohidrato. Algunos géneros bien conocidos son *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactospaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Durante su crecimiento, las bacterias de ácido láctico pueden formar metabolitos diferentes del ácido láctico. Estos metabolitos pueden contribuir a las propiedades sensoriales deseadas del producto. Algunos de estos metabolitos pueden incluir, por ejemplo, diacetil, acetaldheído, y un exopolisacárido.

[0030] En la presente descripción "mesófilo" se utiliza para indicar bacterias de ácido láctico que muestran un crecimiento óptimo por debajo de aproximadamente 33 °C, preferiblemente aproximadamente entre 15 y 33 °C. "Termófilo" se utiliza para referirse a bacterias de ácido láctico que muestran un crecimiento óptimo aproximadamente entre 33 °C y 45 °C, más en particular entre 37 °C y 45 °C.

[0031] La expresión "salmuera" preferiblemente se refiere a un concentrado o, más preferiblemente, solución acuosa saturada de NaCl. Por consiguiente, la expresión "cloruro de sodio" se lee preferiblemente como NaCl. El contenido de NaCl en % en peso comprendido por una masa de cuajada conformada o por un queso puede ser preferiblemente determinado como un contenido de Na⁺ en % en peso, donde el contenido Na⁺ determinado debería ser multiplicado por un factor de (1/0.3933) para llegar al contenido de NaCl de la masa de cuajada conformada o queso. Un estándar de queso tipo Gouda tiene un contenido de cloruro sódico de aproximadamente 3,5 % en peso (como NaCl), basado en peso en seco del queso. Tal estándar de queso tipo Gouda puede así ser analizado para tener un contenido de sodio de 1,38 % en peso (como Na⁺) basado en el peso en seco del queso. En una forma de realización, de hasta 50 % en peso de cloruro sódico comprendido por la salmuera se puede sustituir con cloruro de potasio, de modo que el contenido de cloruro sódico de una masa de cuajada conformada a través de una solución salina puede ser además reducido. Por consiguiente, la expresión "cloruro de sodio" puede leerse como "NaCl + KCl" donde la cantidad relativa de NaCl, en peso, es igual a o superior a la cantidad relativa de KCl, en peso. El contenido de "NaCl + KCl" de una masa de cuajada conformada o de un queso puede ser adecuadamente analizado como la suma del contenido Na⁺ y del contenido K⁺ de la masa de cuajada conformada o queso.

[0032] En la expresión "% en peso [de un ingrediente] basado en el peso en seco" el porcentaje del peso [del ingrediente] se especifica con respecto al contenido de materia sólida de la composición. Dicho porcentaje del peso preferiblemente se refiere al porcentaje del peso del ingrediente con respecto al peso de la composición, excluyendo su contenido de agua. El "% en peso [de un ingrediente] basado en el peso en seco de una composición" puede, por ejemplo, ser obtenido determinando el porcentaje del peso del ingrediente en la composición deshidratada, y especificando dicho porcentaje del peso con respecto al peso de la composición deshidratada.

[0033] La expresión "nisina" puede leerse como "una nisina" y puede referirse a cualquier nisina, por ejemplo se refiere a nisina A o a nisina Z. Preferiblemente, "nisina" se refiere a nisina A. Preferiblemente "una nisina" se refiere a nisina A.

[0034] En una forma de realización de la presente invención, la expresión "nisina" puede leerse como "una bacteriocina de tipo I". Una bacteriocina de tipo I es conocida por el experto en la técnica, y preferiblemente se refiere a un antibiótico o a un péptido bacteriocina que contiene lantionina o metillantionina. El péptido bacteriocina que contiene lantionina o metillantionina tiene preferiblemente un peso molecular < 10 kDa.

[0035] En este documento y en sus reivindicaciones, la palabra "constar de" y sus conjugaciones se usa en su sentido no limitativo para indicar que lo que sigue a la palabra está incluido, pero lo que no se menciona específicamente no está excluido. Además, la referencia a un elemento con el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de un elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" normalmente significa "al menos uno".

Iniciador a granel de intolerante a la nisina

[0036] Proporcionar un iniciador a granel intolerante a la nisina preferiblemente incluye preparar de forma fresca dicho iniciador a granel antes del uso en el paso (b.) y coincide preferiblemente con la mezcla con leche tal y como se define

ES 2 484 616 T3

en el paso (b.). Preferiblemente, el iniciador a granel intolerante a la nisina se usa dentro de las 72 horas después de la preparación, más preferiblemente dentro de las 48 horas después de la preparación, de la forma más preferible dentro de 24 horas después de la preparación.

5 [0037] Se prefiere que el iniciador a granel intolerante a la nisina conste de una o varias cepas seleccionadas de la familia del *Lactococcus*.

[0038] El iniciador a granel intolerante a la nisina es preferiblemente mesófilo. Adicionalmente o alternativamente, el iniciador a granel intolerante a la nisina preferiblemente incluye o más preferiblemente consiste en un así llamado iniciador a granel indefinido. Un "iniciador a granel indefinido" se conoce en la técnica y puede referirse a un iniciador a granel obtenible al fermentar un cultivo madre indefinido en la leche, donde el cultivo madre indefinido está preferiblemente libre de Enterobacteria y/o *Listeria* spp. Aquí, el cultivo madre indefinido y el iniciador a granel indefinido constan de una flora compleja de diferentes bacterias del ácido láctico, cuya complejidad puede representar aquella de la leche (preferiblemente cruda) que ha sido acidificada por exposición al aire, con la condición de que la leche esté preferiblemente libre de Enterobacteria y/o *Listeria* spp. El término "iniciador indefinido" es definido especialmente y preferiblemente como un "iniciador de cepa mixta", este término se conoce en la técnica y se define en el capítulo 13.5 (especialmente en la pág. 387) de Dairy Science and Technology, P. Walstra et al., 2ª edición, CRC/Taylor y Francis, 2006, que se incorpora por referencia aquí. Un iniciador a granel intolerante a la nisina especialmente preferido se puede seleccionar como un iniciador a granel indefinido mesófilo intolerante a la nisina (o alternativamente, como un iniciador a granel de cepa mixta mesófilo intolerante a la nisina), que puede ser adecuadamente obtenido como un iniciador a granel indefinido mesófilo disponible comercialmente. El experto en la técnica tendrá un poco de dificultad en la selección de un iniciador a granel indefinido mesófilo conocido como un iniciador a granel intolerante a la nisina, iniciadores a granel indefinidos mesófilos disponibles comercialmente conocidos hasta la fecha son los iniciadores a granel intolerantes a la nisina. Un iniciador a granel intolerante a la nisina especialmente preferido es un iniciador a granel indefinido mesófilo intolerante a la nisina para queso Gouda. El iniciador a granel intolerante a la nisina puede ser preferiblemente elegido como uno o varios iniciadores a granel indefinidos mesófilos seleccionados del grupo de Flora Danica, Bos, HB-26; Fr18; Fr19 y A. Sorprendentemente, se ha descubierto que sin importar el uso del cultivo directo a cuba productor de nisina, el uso de uno o varios de dichos iniciadores a granel indefinidos mesófilos en los métodos según la invención pueden llevar a la producción de una masa de cuajada conformada que conste de un contenido de cloruro sódico y un contenido de nisina, cuya masa de cuajada formada puede desarrollar favorablemente un sabor complejo durante la maduración posterior. Esto es sorprendente debido a que la presencia en una composición de leche de queso de incluso cantidades pequeñas de nisina es considerada perjudicial para el crecimiento de un iniciador a granel indefinido mesófilo en la composición de leche de queso de por sí, por no mencionar que se permitiría que la biodiversidad natural de dicho iniciador a granel indefinido desarrollara completamente tal composición de leche de queso.

[0039] Se ha descubierto que se pueden obtener resultados particularmente buenos cuando el iniciador a granel intolerante a la nisina se mezcla con la leche en el paso (b.) en una cantidad que varía entre 0,1-2 % en peso con respecto a la leche. Incluso más preferiblemente, la cantidad del iniciador a granel intolerante a la nisina empleada en el paso (b.) varía entre 0,2 - 1,5 % en peso, aún incluso más preferiblemente entre 0,25-1,0 % en peso, de la forma más preferible entre 0,4 - 1,0 % en peso con respecto al peso de la leche. Se ha descubierto que, por consiguiente, se puede obtener un equilibrio especialmente favorable de producción de nisina en acidificación a la masa de cuajada conformada, especialmente a la masa de cuajada conformada que comprende el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina. En una forma de realización especialmente favorable, estas cantidades pertenecen al o a los iniciadores a granel indefinidos mesófilos preferidos. Estas cantidades preferidas del iniciador a granel intolerante a la nisina son relativamente bajas, especialmente considerando la presencia de un cultivo productor de nisina. Ventajosamente, los métodos de la invención pueden ser realizados económicamente, especialmente con respecto a la utilización de recursos para proporcionar el iniciador a granel intolerante a la nisina. Especialmente económicamente, el iniciador a granel intolerante a la nisina también se puede emplear en el paso (b.) en una cantidad que varía entre el 0,3-0,8 % en peso con respecto al peso de la leche.

Leche

[0040] La leche preferiblemente consta de grasa láctea en una cantidad de 0,05 - 2 % en peso, preferiblemente en una cantidad de 0,2 - 1,5 % en peso con respecto al peso de la leche. El contenido de proteína de la leche es preferiblemente alrededor de 3,0 - 3,6 % en peso con respecto al peso de la leche, o aproximadamente igual al contenido de proteína natural de la leche. Preferiblemente, la proporción de grasa a proteína de la leche varía por debajo de 0,7, más preferiblemente por debajo de 0,6. La proporción de grasa a proteína preferiblemente está por encima de 0,1. Por consiguiente, un queso de grasa reducida con un sabor y textura buenos se puede obtener según el presente método.

60

ES 2 484 616 T3

Coagulante

[0041] Para obtener cuajadas se requiere un coagulante. En la técnica los coagulantes comúnmente aplicados pueden ser utilizados, tales como los ácidos orgánicos, por ejemplo el ácido cítrico, o preferiblemente un coagulante microbiano o quimosina (producida por fermentación) o incluso más preferiblemente cuajo (de ternero). Las preparaciones de cuajo adecuado para procesos industriales son conocidas por los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente.

Cultivo directo a cuba productor de nisina

[0042] El cultivo directo a cuba productor de nisina es preferiblemente suministrado como un cultivo liofilizado o congelado, y de la forma más preferible como gránulos congelados.

[0043] El cultivo directo a cuba productor de nisina es preferiblemente un cultivo de cepa mixta definido o monocepa definido, y además preferiblemente comprende una spp. de *Lactococcus lactis*. Un cultivo monocepa directo a cuba productor de nisina adecuado de un *Lactococcus lactis* spp. puede ser obtenido, por ejemplo, como D-100; B625; TC-17 o como IM1 (ex CSK Food Enrichment, Países Bajos). Cada uno de D-100; B625; TC-17 e IM1, comprenden una monocepa *Lactococcus lactis* spp. y tienen una concentración de células totales de aproximadamente 10^{10} cfu/g. Otro cultivo directo a cuba productor de nisina adecuado puede ser obtenido, por ejemplo, como BS-10 de Chr. Hansen.

[0044] El cultivo directo a cuba productor de nisina es preferiblemente adicionado directamente a la leche en el paso (b.). El cultivo directo a cuba productor de nisina puede alternativamente ser mezclado con una solución acuosa antes de su adición a la leche en el paso (b.), por ejemplo para permitir la disolución y/o para permitir una mezcla homogénea del cultivo en la composición de leche de queso obtenida en el paso (b.). La solución acuosa se puede seleccionar como agua, leche o un iniciador a granel listo para usar. Un cultivo congelado directo a cuba productor de nisina también puede dejarse fundir antes de su adición a la leche en el paso (b.). Antes de su adición a la leche en el paso (b.), el cultivo directo a cuba productor de nisina puede incluso ser incubado con un medio de crecimiento (tal como leche) durante un periodo temporal corto, este periodo debería no exceder el tiempo de demora del cultivo directo a cuba productor de nisina. El término "tiempo de demora" se conoce por el experto en la técnica y para cultivos directos a cuba (productor de nisina) es normalmente del orden de unas horas.

[0045] Resultados muy buenos, especialmente con relación a la producción de nisina en la masa de cuajadas conformadas, puede ser obtenido cuando el cultivo directo a cuba productor de nisina se mezcla con la leche en el paso (b.) en una cantidad de al menos 10^5 cfu/ml de la leche, más preferiblemente en una cantidad de al menos 10^6 cfu/ml de la leche. La dosificación correspondiente requerida del cultivo directo a cuba productor de nisina puede ser adecuadamente calculada utilizando el recuento total de bacterias viables comprendido por el cultivo directo a cuba productor de nisina. Para cultivos directos a cuba disponibles comercialmente, el recuento total de bacterias viables puede ser adecuadamente especificado por el proveedor. Por el contrario, o en caso de duda, el recuento total de bacterias viables se puede determinar usando técnicas conocidas. Otro ejemplo, un cultivo monocepa directo a cuba productor de nisina puede ser comercialmente suministrado a "al menos 10^{10} cfu/g", que es un valor más bien típico, especialmente para un cultivo congelado (monocepa). De ello se deduce que al inocular leche con dicho cultivo en una cantidad de al menos aproximadamente 10^6 cfu/ml, dicho cultivo debería ser mezclado con la leche en una cantidad de aproximadamente 10 g del cultivo por 100 litro de leche, o en alrededor de 0,01 % (p/v).

[0046] Puede no haber prácticamente ningún límite superior a la cantidad del cultivo directo a cuba productor de nisina que puede ser empleado. Sin limitarse a la teoría, se cree que el equilibrio deseado puede ser adecuadamente establecido por el uso combinado del iniciador a granel intolerante a la nisina y el cultivo directo a cuba productor de nisina en el paso (b.). No obstante, por diferentes cuestiones incluyendo la eficiencia de coste (asociada al uso del cultivo productor de nisina) y/o la aceptación del consumidor (asociada al nivel de nisina en el queso, que puede preferiblemente no exceder 1200 IU/g o más preferiblemente 800 IU/g), el cultivo directo a cuba productor de nisina se emplea preferiblemente en una cantidad de 10^9 cfu/ml o menos, más preferiblemente en una cantidad de 10^8 cfu/ml o menos. Se pueden obtener resultados óptimos en términos de producción de nisina y acidificación en la (masa) cuajada (conformada) cuando el cultivo directo a cuba productor de nisina se emplea en el paso (b.) en una cantidad de 10^5 - 10^8 cfu/ml, más preferiblemente a 10^5 - 10^7 cfu/ml (especialmente a $1,0 \cdot 10^5$ - $1,0 \cdot 10^7$ cfu/ml), de la forma más preferible a alrededor de $1,0 \cdot 10^5$ à $1,0 \cdot 10^6$ cfu/ml. Estos límites y/o variedades superiores son especialmente preferidos si en el paso (f.) se emplea un tiempo de salado en salmuera de al menos 1 hora, más preferiblemente de al menos 5 horas.

[0047] En una forma de realización especialmente preferida, el cultivo directo a cuba productor de nisina es proteinasa negativo, mientras que el iniciador a granel intolerante a la nisina comprende bacterias del ácido láctico proteinasa positivas, preferiblemente a un recuento total de al menos 5% de la población total de bacterias comprendidas por dicho iniciador a granel. Por consiguiente, la dinámica de población de todas las bacterias del ácido láctico formadas por la composición de leche de queso, las cuajadas, la masa de cuajada conformada y/o la masa de cuajada conformada que comprende el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina puede ser además optimizada respecto a la

ES 2 484 616 T3

acidificación y producción de nisina. Según esta forma de realización, el cultivo directo a cuba productor de nisina es preferiblemente seleccionado como uno o varios cultivos seleccionados del grupo compuesto por D100; TC-17 o B625 (todos ex CSK Food Enrichment).

5 [0048] En una forma de realización, el cultivo directo a cuba productor de nisina puede ser parcialmente o completamente sustituido por una cantidad apropiada de una preparación de nisina encapsulada, donde la preparación de nisina encapsulada opcionalmente con el cultivo directo a cuba productor de nisina es capaz de proporcionar 50, más preferiblemente 100 unidades de nisina (biológicamente disponible) por ml de leche pasteurizada tras la incubación de la leche durante 8 horas a 30 °C con la preparación de nisina encapsulada y opcionalmente el cultivo directo a cuba
10 productor de nisina. La preparación de nisina encapsulada preferiblemente se refiere a nisina encapsulada per se, o a un cultivo productor de nisina encapsulada, o a una mezcla de ambos. La preparación de nisina encapsulada preferiblemente comprende nisina y/o cultivos productores de nisina que se encapsulan en una cubierta en gran medida insoluble en agua. La cubierta preferiblemente comprende un emulsionante de agua en aceite y/o un coacervado.

15 Cultivo aditivo de sabor

[0049] Ha sido ventajosamente descubierto que el uso de un cultivo aditivo de sabor puede contribuir favorablemente al sabor, gusto y/o textura del queso. Esto especialmente se aplica a un queso duro o semiduro con un contenido de grasa de entre 5 y 35 % en peso basado en el peso en seco del queso, y un contenido de cloruro sódico de entre 1 y 3 % en peso, incluso más preferiblemente de entre 1 y 2,75 % en peso, de la forma más preferible de entre 1,75 y 2,75 % en peso basado en el peso en seco del queso. La combinación del cultivo directo a cuba productor de nisina, el iniciador a
20 granel intolerante a la nisina y el cultivo aditivo de sabor para producir dicho queso, que tiene un contenido de cloruro sódico relativamente bajo y un contenido de grasa relativamente bajo (y por lo tanto un contenido de proteína relativamente alta), puede proveer propiedades proteolíticas especialmente favorables para que tengan lugar durante la maduración de dicho queso, que después de la maduración del queso durante el tiempo de maduración deseado, ambos pueden proveer al queso una textura favorable y un agradable sabor.

[0050] El cultivo aditivo de sabor se puede seleccionar como cualquier cultivo aditivo de sabor mesófilo o termófilo, o como una mezcla del mismo. Se prefiere especialmente que el cultivo aditivo de sabor sea un cultivo aditivo de sabor termófilo. El cultivo aditivo de sabor es preferiblemente un cultivo aditivo monocepa definido o un cultivo aditivo de cepa mixta definido. Aquí, el término "cultivo de cepa mixta definido" se conoce en la técnica y es preferiblemente definido como un "cultivo multicepa (definido)", es decir, una mezcla definida de cultivos puros de unas cepas de diferentes especies de bacterias o de diferentes cepas de una especie. Un cultivo aditivo monocepa preferido puede por ejemplo ser comercialmente obtenido como L200; L300; L400; L600; L700 y/o como L800, ex CSK Food Enrichment o como LH-B01 o LH-B02 (ex Chr. Hansen). El cultivo aditivo de sabor se puede adicionar en una cantidad usual. Por ejemplo, cuando el cultivo aditivo de sabor se añade como un iniciador directo a cuba (como gránulos congelados), puede ser preferiblemente mezclado con la leche en el paso (b.) en una cantidad de 0,005 - 0,5 % en peso con respecto al peso de la leche.

40 [0051] Un cultivo aditivo de sabor termófilo preferido se puede elegir como una o más especies seleccionadas del grupo formado por *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *bifidobacteria* spp.

45 [0052] En una forma de realización especialmente preferida, el cultivo aditivo de sabor excluye un *Propionibacterium* spp. y/o *Clostridium* spp. Se observa que el cultivo directo a cuba productor de nisina puede ser muy eficaz inhibiendo y/o exterminando propionibacteria (ver más abajo).

[0053] Un cultivo aditivo de sabor termófilo preferido comprende una o varias cepas de *Lactobacillus acidophilus* y/o de *Lactobacillus helveticus*, bien solo o en combinación, y opcionalmente además combinado con un *Streptococcus thermophilus*. Un cultivo aditivo de sabor termófilo especialmente preferido se selecciona como un *Lactobacillus acidophilus* y/o como un *Lactobacillus helveticus*, opcionalmente combinado con un *Streptococcus thermophilus*. Un cultivo aditivo de sabor termófilo especialmente preferido comprende una o varias subespecies de *Lactobacillus helveticus*; tal cultivo aditivo de sabor preferido puede ser convenientemente obtenido, por ejemplo como L100 (ex CSK Food Enrichment), como APS13 (que es idéntico a C97.1 o a APS, NIZOSTAR, ex CSK Food Enrichment) o a LB 40
55 (*Lactobacillus helveticus*; CBS 114075).

[0054] En una forma de realización preferida, el cultivo aditivo de sabor en el paso (b.) se mezcla con la leche como un iniciador a granel. Según esta forma de realización, la cantidad del cultivo aditivo de sabor mezclada con la leche en el paso (b.) es preferiblemente 0,1 - 3,0 % en peso o más preferiblemente 0,5-2,5 % en peso, de la forma más preferible 0,5-2 % en peso con respecto al peso de la leche. Según esta forma de realización, se prefiere que en el paso (b.) la suma de las cantidades del iniciador a granel intolerante a la nisina y del cultivo aditivo de sabor, cuando se

ES 2 484 616 T3

proporcionan como un iniciador a granel, varíen entre 0,4 y 4 % en peso con respecto al peso de la leche, incluso más preferiblemente entre 0,5 y 3 % en peso con respecto al peso de la leche, de la forma más preferible entre 0,6 y 2 % en peso con respecto al peso de la leche.

- 5 [0055] Un cultivo aditivo de sabor mesófilo preferido se selecciona como una o varias cepas de *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus sakei*. Un cultivo aditivo de sabor mesófilo especialmente preferido es elegido como uno o varios cultivos seleccionados del grupo formado por B33; X100; CR322; CR322; CR213; CR319; CR312. Aquí, B33 y X100 pueden estar disponibles por parte de CSK Food Enrichment; las cepas CR pueden estar disponibles por parte de Chr. Hansen.

Coagulación para proporcionar cuajadas

- 15 [0056] Después de los procedimientos conocidos *per se* la composición mezclada en el paso (b.) se permite que coagule, preferiblemente seguido de corte y/o agitación para proporcionar cuajadas y suero de leche, preferiblemente seguido de separación de las cuajadas de suero de leche para obtener cuajadas.

Lavado de las cuajadas

- 20 [0057] En una forma de realización, el método incluye lavar las cuajadas en el paso (d.), preferiblemente en presencia de una sal de nitrato y/o lisozima. La sal de nitrato y/o la lisozima pueden preferiblemente ser empleadas como una solución acuosa, y preferiblemente en una cantidad y concentración usuales.

- 25 [0058] El lavado de las cuajadas en el paso (d.) preferiblemente comprende lavar las cuajadas que utilizan una solución de lavado. La sal de nitrato es preferiblemente dosificada a la solución de lavado en una cantidad total de 0,1 - 20 g (como NaNO₃) por 100 l de la composición de leche de queso (b.); la lisozima es preferiblemente dosificada a la solución de lavado en una cantidad total de 1-10 g de lisozima por 100 l de la composición de leche de queso en (b.)

- 30 [0059] Además de o alternativamente a la dosificación de la sal de nitrato y/o de la lisozima a la solución de lavado, la sal de nitrato y/o la lisozima pueden ser preferiblemente añadidas a la composición de leche de queso en (b.); según esta forma de realización, la sal de nitrato es preferiblemente adicionada en el paso (b.) a la composición de leche de queso en una cantidad total de 0,1 - 20 g (como NaNO₃) por 100 l de la composición de leche de queso; la lisozima es preferiblemente adicionada en el paso (b.) a la composición de leche de queso en una cantidad total de 1-10 g de lisozima por 100 l de la composición de leche de queso.

- 35 [0060] La presencia de la sal de nitrato y/o la lisozima puede ayudar además a prevenir la contaminación contra las bacterias gram positivas indeseadas, especialmente *Propionibacterium* spp. y/o *Clostridium* spp., pues ha sido observado que para producir una masa de cuajada conformada que comprenda un contenido de cloruro sódico de entre 1-3 % en peso basado en el peso en seco del queso, utilizando un paso de lavado (d.) con una solución de lavado que comprenda sal de nitrato en una concentración usual no siempre protege suficientemente la masa de cuajada conformada contra dicha contaminación indeseada, a menos que fuera usado el iniciador directo a cuba productor de nisina.

Presión de las cuajadas

- 45 [0061] Después del paso de obtención de las cuajadas que son opcionalmente lavadas, y antes del paso de salado en salmuera, las cuajadas son preferiblemente drenadas, y luego prensadas usando medios conocidos para producir una masa de cuajada conformada.

- 50 [0062] En una forma de realización la masa de cuajada conformada es cilíndrica y plana o tiene, por otro lado, una forma de bloque. La masa de cuajada con forma cilíndrica plana tiene preferiblemente una proporción de volumen/superficie de 0,01-0,15 m, más preferiblemente de entre 0,03 - 0,08 m. La masa de cuajada conformada con una forma de bloque tiene preferiblemente una proporción de volumen/superficie de 0,005 - 0,10 m, más preferiblemente de 0,01 - 0,05 m. Aquí, el volumen se calcula en m³ y la superficie se calcula en m². Alternativamente, o preferiblemente adicionalmente, la masa de cuajada conformada tiene un peso de entre 4 y 18 kg, más preferiblemente de entre 8 y 15 kg, típicamente de aproximadamente 12 kg.

Salado en salmuera

- 60 [0063] El tiempo de salado en salmuera es preferiblemente de al menos 1 hora, más preferiblemente de al menos 5 horas. Se ha descubierto ventajosamente que en el transcurso del paso (f.), la producción de nisina y/o acidificación

ES 2 484 616 T3

5 pueden progresar de modo que la cantidad de nisina y/o el pH de la masa de cuajada conformada que comprende el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina pueden ser además optimizados. Según esta forma de realización, se prefiere especialmente que el cultivo directo a cuba productor de nisina en el paso (b.) se mezcle con la leche a 10^9 cfu/ml o menos, más preferiblemente a 10^8 cfu/ml o menos. Si el cultivo directo a cuba productor de nisina se dosifica a un nivel de inoculación más alto, dicho progreso de acidificación de la masa de cuajada conformada puede ser impedido.

10 [0064] El tiempo de salado en salmuera es preferiblemente menos de 120 horas. En una forma de realización preferida, el tiempo de salado en salmuera es inferior a 60 horas, incluso más preferiblemente el tiempo de salado en salmuera es inferior a 40 horas, en la forma más preferible el tiempo de salado en salmuera es inferior a 32 horas o incluso menos de 24 horas. Por consiguiente, se obtiene una masa de cuajada conformada que comprende un contenido de cloruro sódico reducido [y un contenido de nisina]. Aquí, "reducido" significa inferior a 3 % en peso, más preferiblemente entre 1-3 % en peso, incluso más preferiblemente entre 1-2,75 % en peso, en la forma más preferible entre 1,75-2,75 % en peso, basado en el peso en seco del queso. El experto en la técnica puede preferiblemente adaptar el tiempo de salado en salmuera para obtener el contenido de cloruro sódico reducido para una masa de cuajada conformada con un peso y/o forma diferentes.

Maduración

20 [0065] Para producir un queso duro o semiduro, el presente método comprende preferiblemente el paso adicional de maduración de la masa de cuajada conformada. En el método para producir el queso duro o semiduro, la temperatura de maduración preferiblemente varía entre 7-22 °C, incluso más preferiblemente entre 12 y 20 °C. Además preferiblemente, el tiempo de maduración varía entre 25 y 365 días.

25 [0066] En una forma de realización preferida del método para producir el queso duro o semiduro, antes de la maduración, la masa de cuajada conformada que consta del contenido de cloruro sódico y del contenido de nisina es preferiblemente envasada al vacío en una lámina o en una, así denominada, bolsa retráctil. Una bolsa retráctil adecuada, por ejemplo, está disponible comercialmente con los nombres Cryovac BK3550, Cryovac BK2L, Cryovac BK3950 o Cryovac OSB3550 (ex Sealed Air Corp.). El envasado al vacío de la masa de cuajada conformada puede, por ejemplo, ser adecuadamente realizado en un sistema de cámara giratoria Cryovac OSBC® para queso de forma rectangular o productos de carne procesada (ex Sealed Air Corp.). Según esta forma de realización, se puede proporcionar un, así llamado, queso madurado en lámina que puede ser manejado y rebanado de manera particularmente fácil. El queso madurado en lámina es también conocido como queso sin corteza.

35 [0067] En otra forma de realización preferida del método para producir el queso duro o semiduro, dicho método incluye proveer la masa de cuajada conformada que posee el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina con una composición de recubrimiento de origen hídrico que comprende un polímero que es capaz de formar una película. La provisión de la composición de recubrimiento a la masa de cuajada conformada es preferiblemente repetida varias veces durante el tiempo de maduración, preferiblemente seguido de la rotación del queso. Según esta forma de realización, puede ser obtenido un queso duro o semiduro madurado natural que puede tener un gusto y/o sabor y/o textura especialmente favorables. Según esta forma de realización, se prefiere especialmente que las condiciones de maduración además comprendan una humedad relativa de entre 75 y 95%, más preferiblemente de entre 80 y 90%. Se prefiere especialmente que la composición de recubrimiento de origen hídrico sea provista según un protocolo de recubrimiento al queso Gouda madurado natural, lo que se conoce por el experto en la materia. Puede estar disponible comercialmente una composición de recubrimiento de origen hídrico adecuada que posee un polímero que es capaz de formar una película, por ejemplo como Ceska WL (ex CSK Food Enrichment), una composición de recubrimiento de origen hídrico que incluye un copolímero de emulsión de acetato de vinilo con di-n-butilmaleato. No obstante, otras composiciones de recubrimiento de origen hídrico que comprenden un polímero que es capaz de formar una película también pueden ser empleadas, por ejemplo dispersiones de recubrimiento de origen hídrico basadas en poli(hidroxi alcanoato), dispersiones de recubrimiento de origen hídrico a base de proteínas, composiciones de recubrimiento que incluyen un copolímero de emulsión de acetato de vinilo y etileno o composiciones de recubrimiento de origen hídrico que comprenden homo o copolímeros de emulsión de acrilato.

Queso

55 [0068] El queso duro o semiduro obtenible por maduración de la masa de cuajada conformada que posee el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina es preferiblemente un queso tipo Gouda. Se ha descubierto de forma favorable que el presente método para la producción del queso duro o semiduro puede proporcionar un queso tipo Gouda con un sabor limpio y rico. En una forma de realización preferida, el queso comprende un contenido de grasa de entre el 5 y 35 % en peso basado en el peso en seco del queso. Adicionalmente o alternativamente, el queso duro o semiduro es madurado en lámina. En otra forma de realización preferida, el queso duro o semiduro es madurado de forma natural. Dicho queso madurado de forma natural puede preferiblemente ser encerado, por ejemplo con una capa de una cera de

ES 2 484 616 T3

parafina adecuada. Un queso madurado de forma natural encerado se puede manejar más fácilmente. Ventajosamente, una capa de cera favorablemente puede adherirse al queso duro o semiduro madurado de forma natural, pues el estallido del queso puede ser evitado, especialmente debido a la contaminación por *Propionibacterium* spp. y/o *Clostridium* spp., como se ha indicado anteriormente.

5

[0069] El queso duro o semiduro obtenible según el presente método comprende un contenido de nisina de al menos 10 IU/g del queso. Estas gamas inferiores pertenecen favorablemente a un queso envejecido, uno medio envejecido y uno duro o semiduro joven, respectivamente. Aquí, un queso joven es una masa de cuajada conformada que comprende un contenido de cloruro sódico y un contenido de nisina que ha sido madurado durante 4-8 semanas después de salarse; un queso medio envejecido es una masa de cuajada conformada que comprende un contenido de cloruro sódico y un contenido de nisina que ha sido madurado durante 2-6 meses después de salarse, y un queso envejecido es una masa de cuajada conformada que comprende un contenido de cloruro sódico y un contenido de nisina que ha sido madurado durante 6-10 meses después de salarse. La presencia de nisina en el queso, no importa cuán baja pueda ser su concentración, puede ser indicativo de haber sido protegido continuamente durante la maduración.

10

15

[0070] Se ha observado que el contenido de nisina comprendido por la masa de cuajada conformada que comprende el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina puede descender durante la maduración. Este índice de descenso puede ser experimentalmente determinado sin esfuerzo inventivo. El contenido deseado de nisina de la masa de cuajada conformada con el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina puede ser calculado luego, para poder obtener un queso con un tiempo determinado de maduración deseado y un contenido mínimo, determinado y deseado de nisina. El queso preferiblemente comprende un contenido de nisina de preferiblemente menos de 1200 IU/g, más preferiblemente menos de 800 IU/g de queso.

20

25

[0071] Se nota que el queso duro o semiduro que posee el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina puede tener además un nitrato; dicho queso puede alternativamente o adicionalmente poseer lisozima. El queso duro o semiduro, especialmente el queso tipo Gouda, es normalmente producido industrialmente por un método que utiliza un paso donde las cuajadas (preferiblemente cortadas) son lavadas, preferiblemente en presencia de una sal de nitrato y/o lisozima. Adicionalmente o alternativamente, la sal y/o la lisozima de nitrato se pueden adicionar a la composición de leche de queso en (b.). Se constata que la sal de nitrato puede, durante la maduración, ser convertida parcialmente o completamente en uno o varios metabolitos de nitrato. Así, el término "un nitrato" puede leerse como una sal de nitrato adicionado y/o uno o varios metabolitos de la sal de nitrato adicionada. En una forma de realización el presente queso duro o semiduro comprende entre 1 y 100 mg de nitrato por kg de queso, y/o entre 0,01 y 5 mg de un metabolito de nitrato por kg queso, donde el metabolito de nitrato es preferiblemente un nitrito. Adicionalmente o alternativamente, el queso duro o semiduro puede preferiblemente comprender entre 0,1 y 50 mg de lisozima por kg de queso. Como se ha indicado anteriormente, tal queso, especialmente un queso duro o semiduro que comprende un contenido de cloruro sódico de entre 1- 3 % en peso puede todavía no estar suficientemente protegido a menos que haya nisina presente. Así, en una forma de realización, se proporciona un queso duro o semiduro, el queso duro o semiduro que comprende un contenido de cloruro sódico y un contenido de nisina, donde el contenido de cloruro sódico varía entre el 1 y 3 % en peso basado en el peso en seco del queso, y donde el queso comprende además un nitrato y/o lisozima. En otra forma de realización, el queso duro o semiduro que comprende el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina está esencialmente libre de un nitrato y/o de lisozima.

30

35

40

[0072] En otra forma de realización, se puede preferir que el queso duro o semiduro comprenda un contenido de nisina inferior a 1200 IU/g, más preferiblemente inferior a 800 IU/g del queso, aún más preferiblemente inferior a 600 IU/g, incluso más preferiblemente inferior a 400 IU/g del queso. La presencia de nisina en grandes cantidades pueden ser indeseables. Preferiblemente, el queso semiduro comprende un contenido de nisina entre 2 y 800 IU/g del queso, más preferiblemente entre 4 y 600 IU/g, de la forma más preferible de entre 10-600 IU/g o de entre 10-300 IU/g del queso.

45

50

[0073] El queso duro o semiduro puede además comprender preferiblemente una flora de superficie bacteriana. La flora de superficie bacteriana preferiblemente comprende un "cultivo de frotis" que favorablemente comprende una o varias subespecies de *Corynebacterium* o *Brevibacterium*. Adicionalmente o alternativamente, un queso duro o semiduro preferido obtenible por maduración de la masa de cuajada conformada que comprende el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina es seleccionado del grupo compuesto por Gruyere, Tilsit, y Raclette.

55

[0074] El queso preferiblemente no es del tipo Maasdammer o Emmental, pues este tipo de queso se produce usando *Propionibacterium* spp., que se ha descubierto que es inhibido o matado en presencia del cultivo directo a cuba productor de nisina.

60

[0075] El queso preferiblemente comprende 100 ppm o menos, más preferiblemente 50 ppm o menos de ácido propiónico. Adicionalmente o alternativamente, el queso preferiblemente comprende 100 ppm o menos, incluso más preferiblemente 50 ppm o menos de ácido butírico.

[0076] Cuando sea apropiado, las ventajas pertenecientes al queso también pueden pertenecer a la masa de cuajada conformada que comprende el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina.

5 Otros aspectos

[0077] En el método para producir la masa de cuajada conformada que comprende el cloruro sódico y el contenido de nisina, los pasos (a.) y (b.) pueden ser favorablemente combinados con los pasos siguientes

10 c. permitir a la composición de leche de queso que coagule para proporcionar cuajadas;

d. opcionalmente, lavado de las cuajadas;

15 e. presión de las cuajadas para producir una masa de cuajada conformada;

f. salar la masa de cuajada conformada en la solución salina para producir la masa de cuajada conformada que comprende el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina.

20 **EJEMPLOS**

20

[0078] **Determinación de actividad de nisina.** Actividad de nisina es determinada basada en un método de agar de bioensayo con *Micrococcus flavus* como cepa indicadora (Bouksaim et al., 2000; Effects of mixed starter composition on nisin Z production by *L. Lactis* subsp. *Lactis* biovar. *Diacetylacis* UL 719 during production and ripening of Gouda cheese. *Internacional J. of Food Microbiol.* 59,141-156). La actividad de nisina se expresa en UI, donde 40 UI corresponde a 1 µg de nisina pura.

25

[0079] **Determinación de intolerancia a la nisina de cuatro iniciadores a granel indefinidos diferentes.** Los siguientes cultivos madre fueron seleccionados: Bos, A, HB-26 y Fr18. Estos cultivos pueden ser comercialmente obtenidos de CSK Food Enrichment; los cultivos madre son comercialmente suministrados a 10¹⁰ cfu/ml o en mayor cantidad. Cada uno de los cultivos madre fue diluido 40 veces antes de su uso.

30

Cada uno de los cultivos madre diluidos fueron inoculados en la leche altamente pasteurizada a 0,5 % en peso con respecto al peso de la leche, y la leche fue fermentada durante 17 horas a 20,5 °C, para proporcionar 4 iniciadores a granel diferentes preparados recientemente. Para probar la tolerancia a la nisina de los iniciadores a granel, la leche Nilac fue preparada y dividida en 16 botellas de 100 ml. Para cada uno de los 4 tipos diferentes de iniciador a granel, se añadió a 4 botellas el 1 % en peso de cada tipo de iniciador a granel recién preparado, con respecto al peso de la leche. A cada una de las botellas se añadió nisina, a 0, 10, 25, y 50 UI por ml, respectivamente. Las 16 botellas fueron luego incubadas a 30°C durante 20h; durante la incubación, la acidificación de la leche fue medida por medición de pH (resultados no mostrados).

35

[0080] Se descubrió que cada uno de los iniciadores a granel, en presencia de nisina a 10 unidades por litro o más, fueron incapaces de reducir el pH de la leche por 1 unidad de pH o más durante la incubación de la leche durante 6 horas a una temperatura de 30 °C. No obstante, cada uno de dichos iniciadores a granel, durante la incubación de la leche durante 6 horas a una temperatura de 30 °C en ausencia de nisina adicionada, fue capaz de reducir el pH de la leche por 1 unidad de pH o más.

40

[0081] Así, cada uno de los iniciadores a granel indefinidos disponibles comercialmente es un iniciador a granel intolerante a la nisina según la invención.

45

Experimento A de fabricación de queso.

50

[0082] Los quesos cilíndricos planos tipo Gouda de aproximadamente 12 kg fueron preparados utilizando un preparado de cuajada de 700 litros según el método para producir el queso duro o semiduro que comprende el contenido de cloruro sódico y el contenido de nisina. Más específicamente, fue seguida una receta típica de Gouda en la preparación del queso, ver, por ejemplo, Fox P.F. (ed) en *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3ª. Ed., vol. 2, "Gouda and Related Cheeses", págs. 101-140. Aquí, fueron establecidos los siguientes parámetros:

55

- cantidad de coagulante (Kalase, un ex CSK Food Enrichment de cuajo de ternero): aproximadamente 20 ml / 100 litros de leche

- proporción de proteína/grasa de la leche: 0,54

- contenido de lactosa de la leche: 4,3%

60

- contenido de proteína de la leche: 3,4%

ES 2 484 616 T3

- tipo de iniciador a granel intolerante a la nisina: Bos, ex CSK Food Enrichment
- tipo de iniciador directo a cuba productor de nisina: D100 (directamente añadido a la leche como gránulos congelados, el cultivo es obtenible de CSK Food Enrichment).
- temperatura de cuajo: aproximadamente 30 °C
- tiempo de cuajo: aproximadamente 25 min.
- drenaje de suero de leche: aproximadamente 40%
- las cuajadas fueron lavadas en el paso (d.)

5

10 [0083] La leche fue inoculada con propionibacterias a 10^3 cfu/ml, para simular una contaminación con tales bacterias en un entorno de fabricación de queso industrial. El efecto de las siguientes variables fue estudiado, cf. Tabla 1.

Tabla 1. Experimento A de variables en la producción de queso.

Factor	Unidad	Niveles				
		2.3	3.5			
Cantidad de Bos adicionada en el paso (b.)	Litro / 700 litros	2.3	3.5			
Cantidad de D100 adicionada en el paso (b.)	Gramo / 700 litros	0	12,5	25	50	100
Tiempo de salado en salmuera	Hora	20	40			

15

[0084] Las masas de cuajada conformadas después de salar (es decir, después del paso (f.)) fueron analizadas y además maduradas durante 9 y 16 semanas a una temperatura de entre 12 y 20 °C y a una humedad relativa de entre 80 y 90%, mientras recibían un tratamiento con una composición de recubrimiento de queso de origen hídrico (Ceska WL, ex CSK Food Enrichment) a intervalos regulares (maduración natural).

20

Resultados.

Contenido de sal, contaminación por propioni, efecto de nisina.

25

[0085] El contenido medio de sal de una masa de cuajada conformada obtenida después de un tiempo de salado en salmuera de 20 horas fue aproximadamente del 2,5 % en peso con respecto al peso del queso, calculado como sustancia seca. El contenido medio de sal de una masa de cuajada conformada obtenida después de un tiempo de salado en salmuera de 40 horas fue aproximadamente del 3,5 % en peso con respecto al peso del queso, calculado como sustancia seca. En ausencia del cultivo directo a cuba productor de nisina D100, quesos con un contenido de sal de aproximadamente 2,5% contenía agujeros grandes y agrandados después 16 semanas de maduración. Los quesos con un contenido de sal de aproximadamente 3,5 % también contenían agujeros, pero más pequeños y estos quesos resultaron menos afectados.

30

[0086] En presencia de D100 a cualquier nivel, no fue observado ningún estallido o formación de agujero indeseado en el queso, indicación de que las propionibacterias habían sido completamente inhibidas o incluso matadas. Todos estos quesos fueron al menos de calidad aceptable.

35

Acidificación y producción de nisina en una masa de cuajada conformada justo antes y directamente después de salar (paso (f.)).

40

[0087] Para el nivel de Bos de 2,3 litros por 700 litros de leche, el contenido de nisina de la masa de cuajada conformada después de salar (es decir, después del paso (f.)) varió de aproximadamente 40 IU/g (para una dosificación D100 de 12,5 g/700 litros) hasta aproximadamente 540 IU/g (para la máxima dosificación de D100). Para el nivel de Bos de 3,5 litros por 700 litros de leche, el contenido de nisina de la masa de cuajada conformada después de salar (es decir, después del paso (f.)) varió de aproximadamente 10 IU/g (para una dosificación D100 de 12,5 g/700 litros) hasta aproximadamente 300 IU/g (para la máxima dosificación de D100)

45

[0088] Para el nivel de Bos de 2,3 litros por 700 litros de leche, el pH de la masa de cuajada conformada antes de salar (es decir, justo antes del paso (f.)) varió de aproximadamente 5,65 (en ausencia de la adición D100) hasta aproximadamente 5,8 (para la máxima dosificación de D100). Para el nivel de Bos de 3,5 litros por 700 litros de leche, el pH de la masa de cuajada conformada antes de salar (es decir, justo antes paso (f.)) estaba en una media de 0,1 unidades pH inferior a la del nivel de Bos de 2,3 litros por 700 litros.

50

55

[0089] En el presente ejemplo, se obtuvo resultados óptimos con relación a la producción de nisina y acidificación de la masa de cuajada conformada para el nivel de Bos de 3,5 litros por 700 litros de leche (es decir, 0,5 % en peso del iniciador a granel intolerante a la nisina) y alrededor de 25-50 g de D100 por 700 litros de leche (correspondiente a una densidad de inoculación de la leche en el paso (b.)) con el cultivo directo a cuba productor de nisina de aproximadamente $3 \cdot 10^5$ - $7 \cdot 10^5$ cfu/ml, suponiendo que D100 se suministra en alrededor de 10^{10} cfu/g).

ES 2 484 616 T3

[0090] El contenido de nisina en una masa de cuajada conformada después de salar (es decir, después del paso (f.) y de un queso madurado de forma natural obtenido por maduración de dicha masa de cuajada conformada durante 16 semanas (protocolo de maduración tipo Gouda), para la dosificación de Bos de 2,3 litros se resume en la tabla 2.

- 5 [0091] Cabe señalar que en este ejemplo, el cultivo D100 se puede sustituir con TC-17 (ex CSK Food Enrichment), y se obtendrán resultados muy similares.

Tabla 2. Contenido de nisina y contenido de humedad en una masa de cuajada conformada y en uno o más quesos madurados de forma natural durante 16 semanas, para la dosificación de Bos de 2,3 litros por 700 litros de leche.

Dosificación de D100 (g/700l)	12,5		25		50		100	
Tiempo de maduración (semanas)*	0	16	0	16	0	16	0	16
Contenido de nisina (IU/g)	41	4	186	9	385	15	541	65
Contenido de humedad (% en peso)	52,1	43,1	53	42,3	54,1	42,8	51	41,5

(*) 0 semanas corresponde a una masa de cuajada conformada después de salar (es decir, después del paso (f.))

10

[0092] Los resultados de la tabla 2 muestran que el contenido de nisina disminuye durante la maduración. No obstante, como se ha mencionado anteriormente, los quesos permanecen protegidos contra los posibles efectos adversos de las propionibacterias. Esto indica que cantidades muy pequeñas de nisina en el queso pueden ser suficientes para tener el queso protegido, al menos contra las propionibacterias.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para producir una masa de cuajada conformada que comprende un contenido de nisina y un contenido de cloruro sódico a partir de una composición de leche de queso, el método consiste en
- a. proporcionar un iniciador a granel intolerante a la nisina; y
- 10 b. mezclar leche, un coagulante, el iniciador a granel intolerante a la nisina, y un cultivo directo a cuba productor de nisina en una cantidad de al menos $1,0 \cdot 10^5$ cfu/ml de la leche, para proporcionar la composición de leche de queso;
- donde el cultivo directo a cuba productor de nisina todavía experimenta un tiempo de retardo después de dicha mezcla, y/o donde el cultivo directo a cuba productor de nisina se suministra como un cultivo liofilizado o congelado, y donde el contenido de nisina comprendido por la masa de cuajada conformada es de al menos 10 IU/g.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, donde el cultivo directo a cuba productor de nisina se emplea en (b.) en una cantidad de $1,0 \cdot 10^5$ - $1,0 \cdot 10^7$ cfu/ml de leche.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el cultivo directo a cuba productor de nisina se emplea en (b.) en una cantidad inferior a 200 g de dicho cultivo por 1000 kg de leche.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el iniciador a granel intolerante a la nisina se proporciona en una cantidad de 0,1-2 % en peso con respecto al peso de la leche.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el iniciador a granel intolerante a la nisina se proporciona en una cantidad de 0,3 - 0,8 % en peso con respecto al peso de la leche.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el iniciador a granel intolerante a la nisina comprende un iniciador a granel de cepa mixta mesófilo intolerante a la nisina, que es preferiblemente adecuado para el queso Gouda.
- 30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde en el paso (b.) comprende además la adición de un cultivo aditivo de sabor a la leche.
8. Método según la reivindicación 7, donde el cultivo aditivo de sabor es un cultivo de cepa múltiple definida.
- 35 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde el cultivo aditivo de sabor es un cultivo aditivo de sabor termófilo.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde el cultivo aditivo de sabor comprende una o varias cepas de *Lactobacillus acidophilus* y/o de *Lactobacillus helveticus*, bien solas o en combinación.
- 40 11. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde el tiempo de salado en salmuera es de 32 horas o menos.
- 45 12. Método para producir un queso duro o semiduro que comprende la maduración de la masa de cuajada conformada obtenida en el método tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho queso comprende un contenido de nisina de al menos 10 IU/g del queso.
- 50 13. Queso duro o semiduro obtenible por el método según la reivindicación 12 donde el paso (b.) comprende además la adición de una o varias cepas de *Lactobacillus acidophilus* y/o de *Lactobacillus helveticus*, bien solas o en combinación con la leche, y donde dicho queso tiene un contenido de cloruro sódico de entre 1-3 % en peso basado en el peso en seco del queso; y donde dicho queso comprende un contenido de grasa de entre 5 y 35 % en peso basado en el peso en seco del queso.