

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 155**

21 Número de solicitud: 201530248

51 Int. Cl.:

A23C 19/097 (2006.01)

A23L 3/015 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

26.02.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.06.2015

71 Solicitantes:

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y
TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)
(100.0%)**

**Ctra. de La Coruña Km 7,5
28040 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**GARDE LÓPEZ-BREA, Sonia;
ÁVILA ARRIBAS, Marta;
GÓMEZ TORRES, Natalia;
GAYA SICILIA, Pilar y
NUÑEZ GUTIÉRREZ, Manuel**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **MÉTODO DE PREVENCIÓN DE LA HINCHAZÓN TARDÍA EN QUESO MEDIANTE LA
APLICACIÓN DE ALTA PRESIÓN**

57 Resumen:

Método de prevención de la hinchazón tardía en queso mediante la aplicación de alta presión.

El método descrito en la presente invención se refiere a una tecnología basada en el tratamiento del queso por un único ciclo de alta presión, a baja temperatura y con un tiempo de aplicación corto, para prevenir la hinchazón tardía causada por *Clostridium* spp. en este producto. Los quesos tratados mediante el método descrito en la invención no presentan ningún síntoma de hinchazón tardía pese a haber sido contaminados artificialmente con un elevado número de esporas de *Clostridium tyrobutyricum*. Además de prevenir la aparición del defecto, los quesos tratados por altas presiones presentan el mismo pH, extracto seco y calidad e intensidad de olor, aroma y sabor, y calidad de la textura y color que el queso control que no ha sido sometido a altas presiones. Por lo tanto, esta invención tiene un gran potencial para su aplicación a nivel industrial.

ES 2 537 155 A2

DESCRIPCIÓN

MÉTODO DE PREVENCIÓN DE LA HINCHAZÓN TARDÍA EN QUESO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE ALTA PRESIÓN

Ámbito de la Invención

- 5 Esta invención se adscribe al sector tecnológico de la producción industrial de quesos.

Antecedentes

La hinchazón tardía o butírica de quesos es un problema muy conocido en todo tipo de queserías que sin embargo persiste como una de las principales alteraciones de quesos duros y semiduros, a pesar de las medidas preventivas adoptadas por ganaderos y
10 queseros. Las hinchazones son el defecto de origen microbiológico más serio en quesos debido a la imposibilidad de su corrección, su elevada frecuencia de aparición, su impacto económico, ya que normalmente afecta a producciones de gran volumen, y a que una gran variedad de quesos puede sufrirla (Quiberoni y col., 2008). La hinchazón tardía puede
15 afectar a quesos tanto de leche cruda como pasteurizada, de vaca, oveja o cabra, y sus mezclas, originando defectos de textura, aroma y sabor, lo que dificulta o imposibilita su comercialización.

Tradicionalmente, se ha relacionado la hinchazón tardía con el crecimiento en el interior del queso de especies del género *Clostridium* (fundamentalmente *Clostridium tyrobutyricum*,
20 *Clostridium*, Klijn y col., 1995), capaces de fermentar el ácido láctico con producción de ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno, gases responsables de la hinchazón. *Clostridium* es una bacteria gram positiva, anaerobia y formadora de esporas. Las esporas son altamente resistentes al calor, compuestos químicos, irradiación y desecación, lo que dificulta su eliminación. En los quesos que presentan esta alteración se detecta al corte la
25 salida de gas, habitualmente de olor desagradable, a veces acompañado de un sabor rancio debido a la formación de ácidos butírico y acético, así como la pasta digerida, suelta y el grano no unido, y la presencia de cavidades irregulares y rajadas. En ocasiones se puede llegar a observar externamente un abultamiento del queso por la presión del gas formado, pudiendo incluso romper la corteza. La hinchazón tardía del queso, si bien no supone un
30 riesgo para la salud, reduce la calidad del producto final y condiciona su comercialización, provocando importantes pérdidas económicas.

La principal fuente de contaminación de la leche es el ensilado de mala calidad, con un alto número de esporas de *Clostridium*, capaces de sobrevivir a su paso por el tracto digestivo

tras ser ingeridas por el rumiante, acumulándose finalmente en las heces, desde donde pueden pasar a la ubre y de ahí a la leche en el momento del ordeño. Si las condiciones durante la maduración del queso son adecuadas, se produce la germinación de las esporas y la multiplicación de las formas vegetativas de *Clostridium* responsables de la fermentación butírica (Zhu y Yang, 2004). Un bajo número de esporas en la leche (50-1000 esporas/L de leche) es suficiente para provocar la hinchazón tardía si las condiciones en el queso son las adecuadas para que las esporas germinen a células vegetativas. Por lo tanto, la eliminación de las esporas bacterianas implicadas en la aparición de la hinchazón tardía del queso es de gran importancia para las industrias productoras de quesos a nivel internacional.

10 Los métodos actuales para tratar este problema en la industria se basan principalmente en la adición de sustancias inhibitorias frente a *Clostridium* a la leche de fabricación para prevenir la germinación de las esporas o el crecimiento de las células vegetativas. Los agentes antimicrobianos más empleados son el nitrato y/o la lisozima. Sin embargo, estos compuestos no son del todo eficaces y por lo tanto la problemática persiste en el sector

15 lácteo. Además, el uso de estas sustancias comporta ciertos riesgos sanitarios tales como alergias en el caso de la lisozima, cuyo uso está prohibido en algunas variedades de queso con Denominación de Origen, o la formación de nitrosaminas en el caso del nitrato, por lo que su uso en queso no está permitido en algunos países. También se ha evaluado la efectividad de antimicrobianos tales como la nisina y reuterina frente a células vegetativas y

20 esporas de diferentes especies del género *Clostridium* aisladas de quesos con hinchazón tardía (Ávila y col., 2014). Se ha descrito que el empleo de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en la fabricación de queso podría prevenir la aparición de la hinchazón tardía causada por *Clostridium* (WO03045987; Garde y col., 2011). Sin embargo, también puede afectar a la microbiota deseable del queso y alterar así los procesos bioquímicos que se

25 producen durante su maduración.

Entre los nuevos métodos de conservación, la tecnología de altas presiones permite la inactivación de microorganismos patógenos y alterantes, y prolongar la vida útil de los alimentos, con bajo impacto en su calidad nutritiva y sensorial. Esta tecnología probablemente sea la más desarrollada comercialmente en la actualidad. Los estudios de

30 los tratamientos de los quesos con altas presiones se han centrado principalmente en la eliminación de microorganismos patógenos y alterantes no formadores de esporas. Debido a la alta resistencia de las esporas a la presión, hasta el momento se han estudiado predominantemente dos estrategias para optimizar la destrucción de esporas en algunos alimentos mediante altas presiones: la combinación de altas presiones y alta temperatura y

los tratamientos cíclicos de altas presiones. También se ha propuesto la combinación de altas presiones y el uso de antimicrobianos para inactivar esporas bacterianas (WO9508275, WO03005963). En las anteriores combinaciones se propone aplicar ciclos subletales de alta presión o ciclos largos de alta presión seguidos de un tratamiento de pasteurización a 5 temperaturas iguales o superiores a 80°C, u otro ciclo de presurización.

En queso, solo existen dos trabajos sobre la inactivación de microorganismos esporulados mediante la aplicación de altas presiones, concretamente frente a *Bacillus* spp., microorganismo aerobio (Capellas y col., 2000; López y col., 2003). En estos estudios se han aplicado dos ciclos de altas presiones, un ciclo de germinación seguido de un ciclo de 10 inactivación. Capellas y col. (2000) trataron quesos inoculados con esporas de *Bacillus subtilis* a 60 MPa durante 210 min a 25, 30 ó 40°C para inducir la germinación seguido de un tratamiento de inactivación a 500 MPa durante 15 min, lo que causó letalidades entre 2,7 y 4,9 unidades logarítmicas dependiendo de la temperatura aplicada, entre 25 y 40°C. En un estudio similar en quesos modelo inoculados con esporas de *Bacillus cereus*, la aplicación 15 de un ciclo de germinación (60 MPa/30°C/210 min) previo al ciclo de inactivación (500 MPa/30°C/15 min) dio lugar a una mayor inactivación de esporas, lográndose una reducción de 2 unidades logarítmicas en el recuento de esporas con respecto al control (López y col., 2003). Estos tratamientos son largos y realizados a temperaturas moderadas, incluso por encima de la ambiente, circunstancias que encarecen el coste de la estrategia y que pueden 20 afectar a las características sensoriales del queso careciendo por tanto de interés industrial. Se han descrito tratamientos de inactivación a menor temperatura para eliminar levaduras en la superficie de queso fresco (Daryaei y col., 2008).

No se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica el tratamiento del queso con alta presión con el objetivo de prevenir la hinchazón tardía causada por *Clostridium*, en especial 25 *C. tyrobutyricum*.

En la presente invención se describe una estrategia para prevenir la hinchazón tardía causada por *Clostridium* spp., en particular por *C. tyrobutyricum*, en el queso mediante la aplicación de un único ciclo de alta presión a baja temperatura y con un tiempo de aplicación corto. La presente invención puede aplicarse a todas las variedades de queso 30 susceptibles de sufrir hinchazón tardía, preferentemente quesos semiduros y duros elaborados con leche cruda o pasteurizada de oveja, vaca, cabra, o sus mezclas. Los quesos elaborados en las queserías tienen que ser envasados, preferiblemente al vacío, antes ser introducidos en el equipo de altas presiones para su tratamiento. El tratamiento con alta presión al que son sometidos los quesos consiste en un único ciclo que varía entre

300 y 500 MPa, durante un tiempo de 1 a 15 min, y a una temperatura entre 5 y 25°C, y puede aplicarse desde el día 1 hasta los 90 días de maduración de los quesos.

Descripción de la invención

5 La presencia de microorganismos alterantes en la leche afecta a su calidad organoléptica y a la de los productos derivados de la misma. Los microorganismos contaminantes pueden proceder directamente del animal, del ambiente de las granjas, del equipamiento con el que se procesa la leche o del ambiente de la quesería. La contaminación de la leche por *Clostridium* puede causar importantes pérdidas económicas, principalmente en los quesos
10 duros y semiduros, debido a que causa hinchazón tardía o butírica, una de las principales alteraciones que se produce en este tipo de quesos, tanto de leche cruda como pasteurizada.

La presente invención proporciona un método para resolver el problema de la hinchazón tardía del queso debida a la contaminación con esporas bacterianas, en especial del género
15 *Clostridium*, y más concretamente de *C. tyrobutyricum*, mediante el empleo de altas presiones.

La presente invención hace referencia al empleo de un único ciclo de alta presión, a baja temperatura y con un tiempo de aplicación corto, para prevenir la hinchazón tardía. Este método se puede aplicar en cualquier tipo de quesos, especialmente en quesos duros y
20 semiduros, por lo que es de gran importancia e interés para la industria de los productos lácteos a nivel mundial.

Mediante el empleo del método descrito en la presente invención se consigue prevenir la aparición de hinchazón tardía en los quesos cuya leche de fabricación fue artificialmente contaminada con esporas de diferentes cepas de *C. tyrobutyricum*, y además mantener las
25 características físico-químicas y organolépticas (intensidad y calidad de olor, aroma y sabor, calidad de la textura y calidad de color) del queso al final de la maduración, después de la aplicación de diferentes tratamientos de alta presión.

El objeto de la presente invención es, por tanto, la descripción de un nuevo método de prevención de la hinchazón tardía del queso producida por la fermentación bacteriana
30 indeseada, entendiéndose por indeseada los productos de la fermentación de microorganismos contaminantes no añadidos intencionalmente al queso y que puedan comprometer la calidad e idoneidad del mismo.

Por ello, la presente invención se centra, preferentemente, en un método para la prevención de la hinchazón tardía del queso debida a la presencia de esporas bacterianas. Concretamente, la presente invención se refiere a un método para la prevención de la hinchazón tardía del queso que resulta del metabolismo fermentativo de esporas germinadas durante la fabricación o maduración del queso.

La presente invención además tiene las siguientes ventajas sobre el resto de técnicas con el mismo fin presentes en el estado del arte:

- Fácil de usar, baja necesidad de *know-how* o experiencia previa.
- Permite el procesado de alimentos a temperatura ambiente o incluso más bajas, lo que requiere menor energía.
- Causa la reducción o inactivación de microorganismos eliminando los posibles daños producidos por el empleo de altas temperaturas, y evita el empleo de conservantes y otros aditivos, lo que conduce a la mejora de la calidad global de los alimentos.
- Permite la transmisión instantánea de presión en todo el sistema, independientemente del tamaño y geometría del alimento.

A efectos de la presente invención se definen los siguientes términos:

Hinchazón tardía o butírica: Defecto o alteración del queso debida a la germinación de esporas y crecimiento de las formas vegetativas de algunas especies del género *Clostridium* capaces de fermentar el ácido láctico con producción de ácido butírico, ácido acético, CO₂ y H₂, que provoca la hinchazón o abombamiento del queso y la aparición de rajaduras y cavidades en su interior, acompañado de sabores y olores desagradables.

Espora bacteriana: Forma o estructura con fines de supervivencia (no reproductivos), que representan una etapa del ciclo de vida de ciertas bacterias, principalmente gram positivas como *Bacillus* y *Clostridium*. Se caracterizan por una estructura peculiar, diferenciada respecto de las células vegetativas, por un estado metabólico prácticamente detenido, y por una elevada resistencia a agentes y condiciones ambientales extremas.

Fermento mesófilo: Cultivos puros o mezclas de cepas de bacterias lácticas (*Lactococcus*, *Leuconostoc*) con características apropiadas para llevar a cabo la fermentación de la leche en la elaboración de productos lácteos fermentados, que crecen a temperaturas entre 10 y 40°C, con una temperatura óptima de crecimiento de 30°C. Se suelen utilizar en la elaboración de quesos de pasta prensada, pasta blanda y pasta azul.

Fermento termófilo: Cultivos puros o mezclas de cepas de bacterias lácticas (*Streptococcus*, *Lactobacillus*), con características apropiadas para llevar a cabo la fermentación de la leche en la elaboración de productos lácteos fermentados, con una temperatura óptima de crecimiento entre 40 y 50°C. Se suelen utilizar para la elaboración de yogur y de variedades de queso que se caracterizan por sus altas temperaturas de cocción.

Maduración del queso: Última etapa del proceso de fabricación del queso, posterior a la fase de salado, en la que el queso se mantiene durante un cierto tiempo (1-2 semanas hasta 2 ó más años) en unas condiciones específicas (temperatura y humedad) para que se produzcan los cambios físico-químicos necesarios para el desarrollo de las características del queso maduro. En esta etapa se suceden una serie de reacciones bioquímicas lentas como degradación de las proteínas, grasas e hidratos de carbono presentes en la cuajada por acción de enzimas del cuajo, de la leche, de los cultivos iniciadores y de la microbiota secundaria obteniéndose el sabor, aroma y textura característicos de cada variedad de queso.

Microorganismo alterante o alterador: Microorganismos cuyo metabolismo conduce a la producción de moléculas o sustancias que alteran las características de los productos en los que se encuentran. Su presencia en alimentos altera las características sensoriales y físico-químicas de los mismos, como su color, olor, sabor, textura, pH o viscosidad.

Queso extra-graso: Queso que contiene un mínimo de grasa del 60% sobre el extracto seco total.

Queso graso: Queso que contiene un mínimo de 45% y menos de 60% de grasa sobre el extracto seco total.

Queso semigraso: Queso que contiene un mínimo de 25% y menos de 45% de grasa sobre el extracto seco total.

Queso semidesnatado: Queso que contiene un mínimo de 10% y menos de 25% de grasa sobre el extracto seco total.

Queso desnatado: Queso que contiene menos del 10% de grasa sobre el extracto seco total.

Queso extra-duro: Queso cuyo porcentaje de humedad sin materia grasa (HSMG o HQD) es menor del 51%.

Queso duro: Queso cuyo porcentaje de humedad sin materia grasa (HSMG o HQD) se encuentra entre el 49% y el 56%.

Queso semi-duro: Queso cuyo porcentaje de humedad sin materia grasa (HSMG o HQD) se encuentra entre el 54% y el 69%.

- 5 Queso blando: Queso cuyo porcentaje de humedad sin materia grasa (HSMG o HQD) es mayor del 67%.

Queso de leche cruda: Son aquellos quesos elaborados con leche que no ha sido calentada a una temperatura superior a 40°C ni sometida a ningún tratamiento que tenga un efecto equivalente.

- 10 Queso de leche pasteurizada: Son aquellos quesos elaborados con leche pasteurizada, la que se obtiene al calentar la leche a una temperatura entre 72–76°C durante 15 segundos o 61–63°C durante 30 minutos, seguido de un enfriamiento inmediato.

- 15 Queso Artesanal: Son aquellos quesos elaborados siguiendo métodos tradicionales y en general en estructuras pequeñas y de producción limitada en cantidad. La leche procede de la propia granja o de granjas cercanas a la quesería y pueden ser elaborados con leche cruda o pasteurizada

Queso Industrial: Son aquellos quesos obtenidos a partir de leche adquirida a diferentes granjas, generalmente pasteurizada, con un proceso de fabricación automatizado que se realiza a gran escala.

20

Descripción de las figuras

- 25 **Figura 1.** Fotografía a los 60 días de maduración de los quesos elaborados con leche cruda de oveja inoculada con (A) un fermento mesófilo y un fermento termófilo, (B) los fermentos mesófilo y termófilo anteriores y esporas de *Clostridium tyrobutyricum* CECT 4011 y (C) los fermentos mesófilo y termófilo anteriores y esporas de *C. tyrobutyricum* INIA 68, sin tratar (control) y tratados por altas presiones a los 7 días de maduración a 200, 300, 400 o 500 MPa durante 10 minutos a 14°C.

Descripción detallada de la invención

- La presente invención hace referencia a un método para la prevención de la hinchazón tardía o butírica en el queso que consiste en aplicar un único ciclo de alta presión, a baja temperatura, y con un tiempo de aplicación corto, para la eliminación de bacterias alterantes durante la maduración del queso.
- 5
- Preferiblemente, el método comprende envasar el queso antes del tratamiento, preferentemente al vacío, y aplicar una presión entre 300 y 500 MPa a una temperatura entre 5 y 25°C, durante un tiempo entre 1 y 15 minutos. Después del tratamiento el queso se saca del envase y continúa su maduración normalmente.
- 10
- En una realización de la presente invención, en función del tiempo de maduración, el queso al que se refiere la invención puede ser fresco, tierno, semicurado, curado, viejo o añejo. En una realización preferida de la invención, el queso es curado o semicurado. En una realización todavía más preferida de la invención, el queso es semicurado.
- 15
- En una realización de la invención, el queso está hecho con leche de vaca, de cabra, de oveja o mezcla de las anteriores. En una realización preferida de la invención el queso está hecho con leche de vaca o de oveja. En una realización todavía más preferida de la invención, el queso está hecho con leche de oveja.
- 20
- En una realización de la invención, en función del porcentaje de materia grasa, el queso puede ser extra-graso, graso, semi-graso, semidesnatado o desnatado.
- 25
- En una realización de la invención, en función de la consistencia de la pasta del queso, éste puede ser extra-duro, duro, semi-duro, o blando.
- 30
- En una realización de la invención, la fabricación del queso puede ser artesanal o industrial.
- A efectos de la presente invención, bacterias alterantes se refieren a bacterias que modifican las características organolépticas y fisicoquímicas de los alimentos como el sabor, color, olor, pH, viscosidad o la textura.
- En una realización de la invención, el queso está contaminado con esporas de bacterias alterantes gram positivas de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus* o *Sporosarcina*. En una realización más preferida de la invención, las esporas son de bacterias de los géneros *Bacillus* o *Clostridium*. En una realización todavía más preferida, las esporas son del género *Clostridium*.

En una realización más preferida de la invención, las esporas son de la especie o combinación de especies de *C. acetobutylicum*, *C. argentinense*, *C. aerotolerans*, *C. baratii*, *C. beijerinckii*, *C. bifermentans*, *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. cadaveris*, *C. chauvoei*, *C. colicanis*, *C. difficile*, *C. estertheticum*, *C. fallax*, *C. deseri*, *C. formicaceticum*, *C. histolyticum*,
 5 *C. innocuum*, *C. kluyveri*, *C. ljungdahlii*, *C. laramie*, *C. layalense*, *C. nigrificans*, *C. novyi*, *C. oedematiens*, *C. paraputrificum*, *C. perfringens*, *C. phytofermentans*, *C. piliforme*, *C. ramosum*, *C. scatologenes*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. sporogenes*, *C. tertium*, *C. tetani*, *C. thermocellum*, *C. thermosaccharolyticum* o *C. tyrobutyricum*. En una realización más preferida, las esporas son de la especie o combinación de especies de *C. tyrobutyricum*, *C.*
 10 *beijerinckii*, *C. sporogenes* o *C. butyricum*. En una realización más preferida, las esporas son de la especie *C. tyrobutyricum*.

En una realización de la invención, el queso se somete a un tratamiento de alta presión durante su maduración. Los términos “tratamiento de presión”, “tratamiento UHP”, “tratamiento de alta presión”, “tratamiento de alta presión hidrostática (HHP)” o tratamiento
 15 de alta presión de procesamiento (HPP)”, se refieren a tratamientos de alta presión en la presente invención. Dichos tratamientos se caracterizan por emplear presiones de al menos 100 MPa.

En una realización de la invención, el queso se envasa inmediatamente antes del tratamiento de alta presión, preferentemente al vacío, durante el proceso de maduración, y
 20 tras el tratamiento se saca del envase y continúa su maduración normalmente. En una realización preferida de la invención, el queso se envasa y se trata por alta presión entre los días 1 y 90 de la maduración. En una realización preferida de la invención, el queso se envasa y se trata por alta presión entre los días 5 y 15 de la maduración. En una realización todavía más preferida, el queso se envasa y se trata por alta presión el séptimo día de
 25 maduración.

En una realización de la invención, se aplica un único ciclo de alta presión al queso. El término “alta presión” en la presente invención se refiere a una presión mayor o igual a 300 MPa. En una realización más preferida, la presión aplicada al queso está comprendida entre 300 y 500 MPa. En una realización todavía más preferida, la presión aplicada al queso es de
 30 300, 400 o 500 MPa.

En una realización de la invención, la presión aplicada al queso tiene lugar a baja temperatura. El término “a baja temperatura” en la presente invención se refiere a una temperatura entre 5 y 25°C. En una realización preferida de la invención, la presión aplicada

al queso tiene lugar entre 10 y 15°C. En una realización todavía más preferida de la invención, la presión aplicada al queso tiene lugar a una temperatura de 14°C.

En una realización de la invención, la presión aplicada al queso tiene lugar durante un tiempo de aplicación corto. El término “tiempo de aplicación corto” en la presente invención se refiere a un tiempo comprendido entre 1 y 15 minutos. En una realización preferida de la invención, la presión aplicada al queso tiene lugar durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 y 15 minutos. En una realización todavía más preferida de la invención, la presión aplicada al queso tiene lugar durante 10 minutos.

Así, el método utilizado en la presente invención se basa en aplicar un único ciclo de presión, a baja temperatura y con un tiempo de aplicación corto, durante la maduración del queso, previamente envasado, preferentemente al vacío, para prevenir la hinchazón butírica causada por la germinación de esporas bacterianas que se encuentran en él y por el crecimiento de las bacterias germinadas a partir de dichas esporas, y por tanto evitar los defectos estructurales y/o sensoriales en dicho queso debido al metabolismo fermentativo de las bacterias germinadas a partir de dichas esporas.

El método desarrollado en la presente invención permite la conservación de queso, manteniendo sus propiedades organolépticas, lo que mejora su calidad al reducir la contaminación bacteriana mediante un procedimiento rápido y sencillo.

Los ejemplos que se detallan a continuación tienen como objetivo ilustrar la invención sin limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1: Tratamiento de queso de leche cruda de oveja contaminado con esporas de *Clostridium tyrobutyricum* por alta presión: 300 MPa, 10 min, 14°C.

Se elaboraron 3 cubas de queso semi-curado de leche cruda de oveja. En todas las cubas se añadieron a la leche un fermento mesófilo y un fermento termófilo, cloruro cálcico y cuajo. En la cuba 2 se añadió $9,6 \times 10^5$ esporas/ml de leche de *C. tyrobutyricum* CECT 4011. En la cuba 3 se añadió $6,2 \times 10^5$ esporas/ml de leche de *C. tyrobutyricum* INIA 68. Las cuajadas de las 3 cubas se cortaron en granos, se calentaron y a continuación se desueraron para después dispensar la cuajadas en moldes cilíndricos de 15 cm de diámetro y 10 cm de altura, obteniéndose 2 quesos de aproximadamente 1,5 kg cada uno por cuba. Los quesos se prensaron, se salaron en una solución de sal común al 19% (12°C, 4,5 h) y se maduraron durante 7 días a 12°C y 82% de humedad relativa. Los quesos obtenidos de la cuba 1, sin

esporas de *Clostridium*, se utilizaron como quesos controles. A los 7 días, uno de los quesos de cada cuba se envasó al vacío y fue tratado por alta presión a 300 MPa/14°C/10 min. Tras el tratamiento por alta presión los quesos se sacaron del envase y continuaron la maduración durante 53 días a 12°C y 82% de humedad relativa.

- 5 A los 60 días se procedió a la realización de un análisis comparativo en paralelo del desarrollo del defecto de hinchazón tardía y de las características físico-químicas y sensoriales de los quesos inoculados con esporas de *C. tyrobutyricum* tratados y no tratados a 300 MPa/14°C/10 min (equipo de altas presiones Wave 6000/135 de 600 MPa y 135 litros de capacidad, NC Hyperbaric, Burgos, España) y el queso control tratado y no tratado a 300 MPa/14°C/10 min (Tablas 1 y 4).

Tabla 1. Resultados analíticos a los 60 días de maduración de los quesos elaborados con leche cruda de oveja, esporas de *C. tyrobutyricum* CECT 4011 o INIA 68 y tratados a 300 MPa/14°C/10 min a los 7 días de maduración.

	Fermento (control)		Fermento + CECT 4011		Fermento + INIA 68	
	No presurizado	Presurizado	No presurizado	Presurizado	No presurizado	Presurizado
Hinchazón tardía	NO	NO	SI	NO	SI	NO
Ácido butírico, mg/g	0,28 ± 0,07	0,50 ± 0,16	4,79 ± 0,48*	0,59 ± 0,24	4,90 ± 0,57*	0,62 ± 0,35
pH	5,05 ± 0,03	5,01 ± 0,02	5,01 ± 0,07	4,96 ± 0,04	5,08 ± 0,13	4,98 ± 0,01
a _w	0,950 ± 0,003	0,956 ± 0,004	0,954 ± 0,009	0,953 ± 0,005	0,953 ± 0,009	0,955 ± 0,002
Exto. Seco, %	59,64 ± 0,75	59,54 ± 1,36	59,54 ± 2,33	60,47 ± 1,96	58,25 ± 2,18	59,20 ± 1,17
Fracturabilidad, N	21,32 ± 4,36	30,36 ± 4,37*	19,09 ± 4,42	29,98 ± 4,11*	24,98 ± 5,38	30,32 ± 3,88*
Firmeza, J	0,19 ± 0,03	0,22 ± 0,03*	0,16 ± 0,03	0,23 ± 0,04*	0,20 ± 0,06	0,23 ± 0,03*
Elasticidad, N/mm ²	0,72 ± 0,18	0,91 ± 0,21	0,58 ± 0,15	0,80 ± 0,27	0,81 ± 0,45	0,84 ± 0,19
L	81,06 ± 1,18	80,42 ± 0,67	79,25 ± 5,77	79,17 ± 1,26	80,86 ± 2,83	80,43 ± 1,77
a	-1,85 ± 0,12	-2,33 ± 0,09*	-2,28 ± 0,46*	-2,58 ± 0,32*	-2,01 ± 0,12	-2,29 ± 0,09*
b	16,31 ± 0,35	16,79 ± 1,46	18,06 ± 2,62*	17,08 ± 0,62	16,07 ± 0,56	16,93 ± 0,58
C	16,41 ± 0,35	16,96 ± 1,44	18,21 ± 2,65*	17,27 ± 0,56	16,19 ± 0,56	17,08 ± 0,58
h	96,47 ± 0,38	97,95 ± 0,86*	97,16 ± 0,67	98,62 ± 1,33*	97,11 ± 0,46	97,70 ± 0,43*

- 15 ^aMedia ± DE de una doble determinación en dos fabricaciones. Medias en la misma fila con asterisco (*) difieren significativamente ($P < 0,01$) del queso control no presurizado.

Los quesos inoculados con *C. tyrobutyricum* CECT 4011 o *C. tyrobutyricum* INIA 68 no presurizados mostraron síntomas de hinchazón tardía y altos niveles de ácido butírico a los 60 d de maduración, mientras que los quesos contaminados con *C. tyrobutyricum* CECT 4011 o *C. tyrobutyricum* INIA 68 y tratados a 300 MPa/14°C/10 min no desarrollaron el defecto y presentaron unos niveles de ácido butírico similares a los del queso control (Figura 1, Tabla 1), según los análisis estadísticos realizados (test de Dunnet). Los quesos tratados a 300 MPa/14°C/10 min presentaron valores similares de pH, a_w , extracto seco, elasticidad, luminosidad y saturación del color (C), valores mayores de fracturabilidad, firmeza y tono de color (h) y menores valores del parámetro a del color que los del queso control no presurizado. Sin embargo, el queso control tratado a 300 MPa/14°C/10 min consiguió puntuaciones similares al queso control sin tratar para la intensidad y calidad del olor, aroma y sabor, calidad de la textura y calidad del color tras ser evaluados por un panel de catadores.

Ejemplo 2: Tratamiento de queso de leche cruda de oveja contaminado con esporas de *Clostridium tyrobutyricum* por alta presión: 400 MPa, 10 min, 14°C.

Se elaboraron 3 cubas de queso semi-curado de leche cruda de oveja como en el ejemplo 1. En la cuba 2 se añadió $9,6 \times 10^5$ esporas/ml de leche de *C. tyrobutyricum* CECT 4011 y en la cuba 3 se añadió $6,2 \times 10^5$ esporas/ml de leche de *C. tyrobutyricum* INIA 68. Los quesos obtenidos de la cuba 1, sin esporas de *Clostridium*, se utilizaron como quesos controles. A los 7 días de maduración, uno de los quesos de cada cuba se envasó al vacío y fue tratado por alta presión a 400 MPa/14°C/10 min. Tras el tratamiento por alta presión los quesos se sacaron del envase y continuaron la maduración durante 53 días a 12°C y 82% de humedad relativa.

A los 60 días se procedió a la realización de un análisis comparativo en paralelo del desarrollo del defecto de hinchazón tardía y de las características físico-químicas y sensoriales de los quesos inoculados con esporas de *C. tyrobutyricum* tratados y no tratados a 400 MPa/14°C/10 min y el queso control tratado y no tratado a 400 MPa/14°C/10 min (Tablas 2 y 4).

Los quesos inoculados con *C. tyrobutyricum* CECT 4011 o *C. tyrobutyricum* INIA 68 no presurizados mostraron síntomas de hinchazón tardía y altos niveles de ácido butírico a los 60 días de maduración, mientras que los quesos contaminados con *C. tyrobutyricum* y tratados a 400 MPa/14°C/10 min no desarrollaron el defecto y presentaron unos niveles de

ácido butírico similares a los del queso control (Figura 1, Tabla 2), según los análisis estadísticos realizados (test de Dunnet). Los quesos tratados a 400 MPa/14°C/10 min presentaron valores similares de pH, a_w , extracto seco, elasticidad y luminosidad (L), valores mayores de fracturabilidad, firmeza, del parámetro b del color, saturación (C) y tono de color (h), y menores valores del parámetro a del color, que los del queso control no presurizado. Sin embargo, el queso control tratado a 400 MPa/14°C/10 min consiguió puntuaciones similares al control sin tratar para la intensidad y calidad del olor, aroma y sabor, calidad de la textura y calidad del color tras ser evaluado por un panel de catadores.

10 **Tabla 2.** Resultados analíticos a los 60 días de maduración de los quesos elaborados con leche cruda de oveja, esporas de *C. tyrobutyricum* CECT 4011 o INIA 68 y tratados a 400 MPa/14°C/10 min a los 7 días de maduración.

	Fermento (control)		Fermento + CECT 4011		Fermento + INIA 68	
	No presurizado	Presurizado	No presurizado	Presurizado	No presurizado	Presurizado
Hinchazón tardía	NO	NO	SI	NO	SI	NO
Ácido butírico, mg/g	0,28 ± 0,07	0,49 ± 0,09	4,79 ± 0,48*	0,47 ± 0,17	4,90 ± 0,57*	0,47 ± 0,11
pH	5,05 ± 0,03	5,11 ± 0,07	5,01 ± 0,07	5,15 ± 0,03	5,08 ± 0,13	5,18 ± 0,01
a_w	0,950 ± 0,003	0,952 ± 0,002	0,954 ± 0,009	0,953 ± 0,001	0,953 ± 0,009	0,953 ± 0,002
Exto. Seco, %	59,64 ± 0,75	59,90 ± 1,66	59,54 ± 2,33	60,00 ± 1,83	58,25 ± 2,18	59,17 ± 1,10
Fracturabilidad, N	21,32 ± 4,36	30,02 ± 3,37*	19,09 ± 4,42	31,50 ± 3,26*	24,98 ± 5,38	30,18 ± 3,26*
Firmeza, J	0,19 ± 0,03	0,23 ± 0,04*	0,16 ± 0,03	0,24 ± 0,03*	0,20 ± 0,06	0,22 ± 0,03*
Elasticidad, N/mm ²	0,72 ± 0,18	0,88 ± 0,20	0,58 ± 0,15	0,90 ± 0,29	0,81 ± 0,45	0,82 ± 0,16
L	81,06 ± 1,18	80,71 ± 2,53	79,25 ± 5,77	82,70 ± 0,90	80,86 ± 2,83	82,35 ± 2,59
a	-1,85 ± 0,12	-3,00 ± 0,17*	-2,28 ± 0,46*	-3,00 ± 0,18*	-2,01 ± 0,12	-3,02 ± 0,16*
b	16,31 ± 0,35	17,84 ± 1,50*	18,06 ± 2,62*	18,06 ± 0,31*	16,07 ± 0,56	17,53 ± 1,18*
C	16,41 ± 0,35	18,09 ± 1,50*	18,21 ± 2,65*	18,31 ± 0,29*	16,19 ± 0,56	17,78 ± 1,19*
h	96,47 ± 0,38	99,57 ± 0,52*	97,16 ± 0,67	99,41 ± 0,67*	97,11 ± 0,46	99,77 ± 0,13*

^aMedia ± DE de una doble determinación en dos fabricaciones. Medias en la misma fila con asterisco (*) difieren significativamente ($P < 0,01$) del queso control no presurizado.

Ejemplo 3: Tratamiento de queso de leche cruda de oveja contaminado con esporas de *Clostridium tyrobutyricum* por alta presión: 500 MPa, 10 min, 14°C.

Se elaboraron 3 cubas de queso semi-curado de leche cruda de oveja como en el ejemplo 1. En la cuba 2 se añadió $9,6 \times 10^5$ esporas/ml de leche de *C. tyrobutyricum* CECT 4011 y en la cuba 3 se añadió $6,2 \times 10^5$ esporas/ml de leche de *C. tyrobutyricum* INIA 68. Los quesos obtenidos de la cuba 1, sin esporas de *Clostridium*, se utilizaron como quesos controles. A los 7 días de maduración, uno de los quesos de cada cuba se envasó al vacío y fue tratado por alta presión a 500 MPa/14°C/10 min. Tras el tratamiento por alta presión los quesos se sacaron del envase y continuaron la maduración durante 53 días a 12°C y 82% de humedad relativa.

A los 60 días se procedió a la realización de un análisis comparativo en paralelo del desarrollo del defecto de hinchazón tardía y de las características físico-químicas y sensoriales de los quesos inoculados con esporas de *C. tyrobutyricum* tratados y no tratados a 500 MPa/14°C/10 min y el queso control tratado y no tratado a 500 MPa/14°C/10 min (Tablas 3 y 4).

Los quesos inoculados con *C. tyrobutyricum* CECT 4011 o *C. tyrobutyricum* INIA 68 no presurizados mostraron síntomas de hinchazón tardía y altos niveles de ácido butírico a los 60 d de maduración, mientras que los quesos contaminados con *C. tyrobutyricum* y tratados a 500 MPa/14°C/10 min no desarrollaron el defecto y presentaron unos niveles de ácido butírico similares a los del queso control (Figura 1, Tabla 3), según los análisis estadísticos realizados (test de Dunnet). Los quesos tratados a 500 MPa/14°C/10 min presentaron valores similares de pH, a_w , extracto seco, firmeza, elasticidad y luminosidad (L), valores mayores de fracturabilidad, del parámetro b del color, saturación (C) y tono de color (h), y menores valores del parámetro a del color, que los del queso control no presurizado.

El queso control tratado a 500 MPa/14°C/10 min obtuvo puntuaciones inferiores a las del queso control no tratado para la intensidad del sabor. Sin embargo, la calidad del aroma del queso presurizado a 500 MPa/14°C/10 min fue superior a la del queso control no tratado, y el resto de características sensoriales fueron similares a las del queso control no tratado tras ser evaluado por un panel de catadores.

30

Tabla 3. Resultados analíticos a los 60 días de maduración de los quesos elaborados con leche cruda de oveja, esporas de *C. tyrobutyricum* CECT 4011 o INIA 68 y tratados a 500 MPa/14°C/10 min a los 7 días de maduración.

	Fermento (control)		Fermento + CECT 4011		Fermento + INIA 68	
	No presurizado	Presurizado	No presurizado	Presurizado	No presurizado	Presurizado
Hinchazón tardía	NO	NO	SI	NO	SI	NO
Ácido butírico, mg/g	0,28 ± 0,07	0,60 ± 0,07	4,79 ± 0,48*	0,52 ± 0,33	4,90 ± 0,57*	0,53 ± 0,11
pH	5,05 ± 0,03	5,11 ± 0,07	5,01 ± 0,07	5,15 ± 0,03	5,08 ± 0,13	5,18 ± 0,01
a_w	0,950 ± 0,003	0,952 ± 0,002	0,954 ± 0,009	0,953 ± 0,001	0,953 ± 0,009	0,953 ± 0,002
Exto. Seco, %	59,64 ± 0,75	59,90 ± 1,66	59,54 ± 2,33	60,00 ± 1,83	58,25 ± 2,18	59,17 ± 1,10
Fracturabilidad, N	21,32 ± 4,36	27,95 ± 3,68*	19,09 ± 4,42	29,48 ± 3,90*	24,98 ± 5,38	29,17 ± 3,40*
Firmeza, J	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,22 ± 0,04*	0,20 ± 0,06	0,21 ± 0,03
Elasticidad, N/mm ²	0,72 ± 0,18	0,69 ± 0,26	0,58 ± 0,15	0,75 ± 0,32	0,81 ± 0,45	0,72 ± 0,15
<i>L</i>	81,06 ± 1,18	79,95 ± 2,27	79,25 ± 5,77	76,92 ± 0,29*	80,86 ± 2,83	77,86 ± 0,48
<i>a</i>	-1,85 ± 0,12	-2,93 ± 0,50*	-2,28 ± 0,46*	-2,83 ± 0,48*	-2,01 ± 0,12	-3,00 ± 0,34*
<i>b</i>	16,31 ± 0,35	19,05 ± 1,59*	18,06 ± 2,62*	19,47 ± 1,15*	16,07 ± 0,56	19,33 ± 1,25*
<i>C</i>	16,41 ± 0,35	19,27 ± 1,64*	18,21 ± 2,65*	19,68 ± 1,20*	16,19 ± 0,56	19,56 ± 1,28*
<i>h</i>	96,47 ± 0,38	98,71 ± 0,85*	97,16 ± 0,67	98,21 ± 0,92*	97,11 ± 0,46	98,79 ± 0,48*

^aMedia ± DE de una doble determinación en dos fabricaciones. Medias en la misma fila con asterisco

5 (*) difieren significativamente ($P < 0,01$) del queso control no presurizado.

Tabla 4. Características sensoriales a los 60 días de maduración de los quesos elaborados con leche cruda de oveja y tratados por altas presiones a los 7 días de maduración a 200, 300, 400 o 500 MPa durante 10 min a 14 °C.

	Control	200 MPa	300 MPa	400 MPa	500 MPa
Intensidad del olor	4,95±1,73	5,11 ± 1,79	5,50 ± 1,34	5,26 ± 1,48	4,43 ± 1,84
Calidad del olor	6,07±1,17	6,16 ± 1,06	6,69 ± 0,93	6,39 ± 1,21	6,40 ± 0,85
Intensidad del aroma	5,49±1,69	4,96 ± 1,92	5,36 ± 1,31	5,31 ± 1,24	4,57 ± 1,97
Calidad del aroma	5,35±1,54	5,63 ± 1,13	5,85 ± 0,94	5,35 ± 1,31	6,36 ± 1,00*
Intensidad del sabor	6,29±1,03	5,83 ± 1,75	5,85 ± 1,30	6,01 ± 0,91	5,12 ± 1,70*
Calidad del sabor	5,46±1,21	5,69 ± 1,22	5,88 ± 0,99	5,04 ± 1,27	6,34 ± 1,04
Calidad de la textura	6,84±1,38	6,74 ± 1,19	6,79 ± 1,23	7,11 ± 1,15	6,84 ± 1,07
Calidad del color	7,11±1,15	7,32 ± 1,00	7,21 ± 1,08	7,16 ± 1,12	7,21 ± 1,10

Media ± DE (n = 20) de las puntuaciones de dos fabricaciones otorgadas por un panel de 10 catadores sobre un escala de 0 a 10 puntos. Medias en la misma fila con asterisco (*) difieren significativamente ($P < 0,01$) del control.

Bibliografía

- Quiberoni A., Guglielmotti D., Reinheimer J. 2008. *New and classical spoilage bacteria causing widespread blowing in Argentinean soft and semihard cheeses*. International Journal of Dairy Technology 61, 358-63.
- 5 Klijn N., Nieuwenhof F.F.J., Hoolwerf J.D., Van der Waals C.B., Weerkamp A.H. 1995. *Identification of Clostridium tyrobutyricum as the Causative Agent of Late Blowing in Cheese by Species-Specific PCR Amplification*. Applied and Environmental Microbiology 61, 2919-2924.
- 10 Zhu Y., Yang S.T. 2004. *Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by Clostridium tyrobutyricum*. Journal of Biotechnology 110,143-57.
- Ávila M., Gómez-Torres N., Hernández M., Garde S. 2014. *Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related Clostridium species*. International Journal of Food Microbiology 172, 70-5.
- 15 De Vuyst L., Georgalaki M., Tsakalidou E. 2003. *A food grade lantibiotic from Streptococcus macedonicus and uses thereof*. (WO03045987). Applicants: Univ. Bruxelles (BE) and De Vuyst L. (BE).
- Garde S., Ávila M., Arias R., Gaya P., Nuñez M. 2011. *Outgrowth inhibition of Clostridium beijerinckii spores by a bacteriocin-producing lactic culture on ovine milk cheese*. International Journal of Food Microbiology 150, 59-65.
- 20 Capellas M., Mor-Mur M., Gervilla R., Yuste J., Guamis B. 2000. *Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese*. Food Microbiology 17, 633-641.
- 25 López T.J., Roig A.X., Capellas M., Trujillo A.J., Hernández M., Guamis B. 2003. *Evaluation of the importance of germinative cycles for destruction of spores of Bacillus cereus in miniature cheeses*. High Pressure Research 23, 81-85.
- Daryaei H., Coventry M.J., Versteeg C., Sherkat F. 2008. *Effect of high pressure treatment on starter bacteria and spoilage yeasts in fresh lactic curd cheese of bovine milk*. Innovative Food Science and Emerging Technologies 9, 201-205.
- 30 Smetl J.PPM. 1995. *Shelf stable product*. (WO9508275). Applicants: UNILEVER PLC (GB) UNILEVER NV (NL).
- Ming X., King R.W., Payne J. 2003. *Composition having bacteriostatic and bactericidal activity against bacterial spores and vegetative cells and process for treating foods therewith*. (WO03005963). Applicant: RHODIA (US).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de prevención de la hinchazón tardía o butírica en el queso que consiste en aplicar un único ciclo de alta presión al queso, a baja temperatura, y con un tiempo de aplicación corto, para la eliminación de bacterias alterantes durante la maduración del queso.
2. Método según la reivindicación 1 en el que las bacterias alterantes eliminadas son anaerobias formadoras de esporas.
3. Método según la reivindicación 2 en el que las bacterias anaerobias pertenecen al género *Clostridium*.
- 10 4. Método según la reivindicación 3 en el que las bacterias anaerobias pertenecen a las especies *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii*, *C. sporogenes* o *C. butyricum* o una combinación de las mismas.
5. Método según la reivindicación 4 en el que las bacterias anaerobias pertenecen a la especie *Clostridium tyrobutyricum*.
- 15 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 en el que las bacterias alterantes eliminadas pueden estar en forma de esporas.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el queso se envasa antes de aplicar el ciclo de alta presión, y tras el tratamiento se saca el queso del envase y continúa su maduración normalmente.
- 20 8. Método según la reivindicación 7, en el que el queso se envasa al vacío antes de aplicar el ciclo de alta presión.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la presión aplicada es igual o mayor a 300 MPa.
10. Método según la reivindicación 9 en el que la presión aplicada está
25 comprendida entre 300 y 500 MPa.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el ciclo de alta presión se realiza a una temperatura entre 5 y 25°C.
12. Método según la reivindicación 11 en el que la temperatura es 14°C.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que
30 la duración del ciclo de alta presión que se aplica al queso es de 1 a 15 minutos.

14. Método según la reivindicación 13 en el que el ciclo de alta presión se aplica al queso durante 10 minutos.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el queso se envasa y se trata por alta presión entre los días 1 y 90 de la maduración.

5 16. Método según la reivindicación 15 en el que el queso se envasa y se trata por alta presión el séptimo día de maduración.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en las que el queso puede estar elaborado con leche cruda o leche pasteurizada.

10 18. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la consistencia del queso puede ser extra-dura, dura, semi-dura, o blanda.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el queso puede ser extra-graso, graso, semi-graso, semidesnatado o desnatado, en función del porcentaje de materia grasa.

15 20. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la fabricación del queso puede ser artesanal o industrial.

Figura 1

