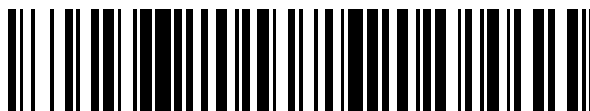


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 052**

51 Int. Cl.:

A23C 9/123 (2006.01)

A23C 19/032 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2009 E 09772755 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2339924**

54 Título: **Método para preparar una levadura de leche no pasteurizada**

30 Prioridad:

04.07.2008 FR 0803808

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

28.12.2015

73 Titular/es:

**DUMARCHÉ, CLAUDE (50.0%)
32, rue du Pertuis Breton
17340 Chatelailon Plage, FR y
LECLERCQ, SÉBASTIEN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DUMARCHÉ, CLAUDE y
LECLERCQ, SÉBASTIEN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 555 052 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).

Método para preparar una levadura de leche no pasteurizada

Descripción

5 [0001] La invención se refiere a un método para la preparación de una levadura a partir de leche cruda.

[0002] Las directrices sanitarias para reducir el riesgo de intoxicación alimentaria mediante la eliminación de la flora patógena en los productos lácteos requieren que profesionales en la industria láctea tomen, en los procesos de producción y recogida de leche, medidas de higiene drásticas, incluidas medidas de desinfección y descontaminación de las zonas de ordeño, las ubres de los animales, dispositivos de ordeño y los dispositivos de almacenamiento de leche. Además, estas directrices han conducido al uso generalizado de almacenamiento refrigerado la leche durante 48 a 72 horas en la granja, especialmente a una temperatura de aproximadamente de +4°C. En este sentido, el documento Michel V. et al, (2001), Leche, 81, pp575-592, describe el impacto de diversas condiciones de salud adoptadas en la producción de leche de vaca, la biodiversidad de la flora microbiana de estas leches crudas.

[0003] Sin embargo, la disminución de la cantidad promedio de flora patógena en la producción de leche derivada de la aplicación de estos métodos se acompaña de la disminución significativa de la leche cruda, la cantidad media de la floras útiles para la fermentación de la leche y de los productos lácteos de refinación de la leche cruda, incluyendo quesos.

[0004] Además, para cumplir con los requisitos de salud, para limitar la flora patógena en la leche cruda, y beneficiarse al mismo tiempo de un número significativo de flora, adaptado para su uso en la fermentación láctica de la leche, los defensores de la industria lechera reclaman el uso de enzimas, llamadas fermentos de co-cultivo, cuya composición está bien definida y fácilmente reproducible. Estos fermentos de co-cultivo consisten de una cepa o un pequeño número de cepas microbianas puras, se preparan por el aislamiento y la clonación de estas cepas puras en laboratorios de investigación, y por lo tanto están libres de organismos potencialmente patógenos. Estos fermentos de co-cultivo están constituidos, por ejemplo, de una combinación de una o más cepas bacterianas acidificantes y una o más cepas bacterianas no acidificantes, adecuadas para la tipificación de los productos obtenidos a partir de estas enzimas.

[0005] Sin embargo, el desarrollo de las cualidades organolépticas y sensoriales de los quesos de leche cruda y su característica típica de una zona geográfica o geomorfológico denominado terruño, es una consecuencia directa de la utilización de la leche cruda con la flora naturalmente diversa, la propia característica de este terruño. De hecho, las propiedades organolépticas originales de quesos de leche cruda se derivan de la expresión de un gran número de moléculas aromáticas y de sabor de bajo peso molecular produce cuando matic degradación enzimática de varios componentes, incluyendo la proteína, leche. Por lo tanto, la riqueza y la diversidad de la expresión microbiológica permiso de leche cruda de equipos enzimática en sí rica y diversa, que son la fuente de la producción en el medio de fermentación, incluyendo la fermentación láctica, y en los entornos de refinación, moléculas en el origen de sabores y olores característicos de los quesos de leche cruda.

[0006] Varios métodos son ya conocidos para la preparación de un concentrado de células bacterianas a partir de cepas microbiológicamente puras.

45 [0007] En un primer tipo de solución conocida (véase por ejemplo GB 1 205 733), se prepara un concentrado de células bacterianas de una cepa caracterizada estructuralmente y disponible comercialmente, el Streptococcus cremoris. Esta solución no permite preparar, a partir de leche cruda, una levadura rica y diversa de flora microbiológica, en la que la composición microbiológica es representativa de las prácticas del área de producción y geográficas de la leche cruda.

50 [0008] Un segundo tipo de solución conocida (WO 2006/067136) similar a la anterior es un proceso rápido para la preparación de un concentrado de bacterias de ácido láctico incluyendo Lactococcus lactis, ssp cremoris usando extracto de levadura como un acelerador de crecimiento . Esta solución tampoco permite preparar, a partir de leche cruda, levadura altamente diversificada.

55 [0009] La invención pretende superar estas desventajas proporcionando un procedimiento de preparación, a partir de leche cruda, un motor de arranque que consiste en un gran número de especies microbianas diferentes, incluyendo bacterias.

60 [0010] La invención tiene como objetivo proporcionar un método para preparar una levadura cuyos miembros incluyen un gran número de diferentes especies microbianas e incluye la mayor parte de la flora útil de queso de leche cruda.

65 [0011] La invención también tiene por objeto proponer un procedimiento de este tipo utilizando la ausencia de tratamiento de la leche cruda por composiciones antisépticas, antibióticas, bacteriostáticas o productos químicos susceptibles de inhibir o estimular el crecimiento de la flora de la leche cruda .

[0012] La invención también tiene por objeto proponer un procedimiento de este tipo sin usar ningún aditivo voluntario de microorganismo.

5 [0013] La invención también pretende más particularmente proporcionar un procedimiento tal que tiende a adherirse a las restricciones de seguridad alimentaria que enfrentan los productores de leche y la industria láctea.

[0014] La invención además tiene por objeto proponer un método tal que preserve los hábitos de trabajo personales, que es fácil de usar, y que implica para su aplicación de poca manipulación.

10 [0015] La invención también tiene por objeto proponer un procedimiento de este tipo creado a partir de recursos y dispositivos de bajo costo.

[0016] En el siguiente:

15 - El término "leche cruda" significa no sólo la leche que no ha sido sometida a ningún tratamiento a una temperatura por encima de la temperatura de la leche en la salida de la ubre, pero también más ampliamente la leche que no ha sido sometida a ningún tratamiento físico o térmico capaz de eliminar o destruir los gérmenes microbiológicos. Sabemos que la leche cruda producida por animales sanos se emite de un modo sustancialmente estéril de la ubre y la flora presente en la leche cruda después del ordeño consiste en microorganismos exógenos característicos del entorno de producción de la leche cruda.

20 - El término "flora útil" significa toda la flora de la leche cruda que participa en la maduración, la acidificación y la coagulación de la leche cruda y el desarrollo de la flora de la superficie. La flora útil, también llamada flora de queso o tecnología de la flora, incluye, por ejemplo y sin limitación, lactococos, en particular *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus diacetylactis*, lactobacilos y las bacterias del género *Leuconostoc*.

25 - El término "flora nociva" significa toda la flora de la leche que contribuye al deterioro o propiedades organolépticas (flora de deterioro) o la calidad sanitaria (flora patógena) del producto lácteo final. La flora de alteración incluye la familia *Pseudomonas* y bacterias coliformes en general. Flora patógena comprende los estafilococos a coagulasa positiva, incluyendo *Staphylococcus aureus*, la familia de *Listeria*, especialmente *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Escherichia coli*.

30 [0017] La invención se refiere por tanto a un método para la preparación de una levadura según la reclamación 1.

[0018] Los productos de leche cruda de tambos que cumplan con las normas sanitarias vigentes, tienen una densidad microbiológica global baja, incluyendo en particular una densidad microbiológica significativamente menor que la de la leche cruda producida en las explotaciones lecheras que no cumplen con estas pautas de salud. Sin embargo, tal leche cruda, con una densidad microbiológica en general baja, contiene una cantidad suficientemente grande y diversa de flora microbiana que permita el desarrollo de cultivos iniciadores, con una diversidad de flora, susceptible de tipificar los productos obtenidos a partir de estos arrancadores.

40 [0019] Los inventores han encontrado que, cualquiera que sea su origen y naturaleza, la mayoría de los productos de la leche cruda en estas granjas lecheras pueden enriquecerse ventajosamente en flora útil por un tratamiento de estabilización que comprende al menos una etapa de fermentación en la que la estabilización de es ácido láctico de fermentación edificante se interrumpe cuando el pH del medio de fermentación llega a un valor entre 4,6 y 6,0, en particular, un valor entre 4,9 y 5,6, especialmente un valor del orden de 5.2.

45 [0020] Por otra parte, este tratamiento de estabilización no sólo ayuda a aumentar el título microbiológico del medio de fermentación, sino también a promover el desarrollo en el medio de fermentación de flora útil a expensas de la flora de deterioro y de la flora patógena de dicho medio de fermentación.

50 [0021] Los inventores han encontrado sorprendentemente que la interrupción de la fermentación láctica acidificante cuando el pH del medio de fermentación llega a un valor entre 4,6 y 6,0-, en particular, un valor entre 4,9 y 5,6 - en particular un valor de alrededor de 5,2, permite, cualquiera que sea el origen y la naturaleza de la leche cruda, promover el crecimiento de microorganismos de la flora heterofermentativos útiles del medio de fermentación al tiempo que limita el crecimiento de microorganismos acidófilos estrictos. Además, esta interrupción puede cambiar, diferencialmente, las tasas de crecimiento respectivas de las floras diversas presentes en el medio de fermentación, y enriquecer el medio de fermentación en diversas floras de queso a partir de leche cruda.

60 [0022] Los inventores han observado que es posible seleccionar la leche cruda que puede ser utilizada para la preparación de una levadura según la invención mediante la realización de una fermentación láctica acidificante a una temperatura, dicha selección de la temperatura, adaptada para permitir el crecimiento de la flora de leche cruda, siendo dicha temperatura de selección entre 20°C y 42°C, especialmente de aproximadamente 27°C, y la selección de la leche fermentada que tiene un pH que alcanza el valor de 5,5 en más de 15 h, y el valor mínimo de 5,0 dentro de 48 h. Por lo tanto, se selecciona leches crudas, cuya flora está diversificada y adaptada para realizar una acidificación lenta de la leche cruda a al menos una temperatura de selección.

65 [0023] Ventajosamente y según la invención, este paso se lleva a cabo para la identificación y la selección de la

leche cruda susceptible de utilizarse para la preparación de una levadura, una selección del orden de 27°C, especialmente a una temperatura de 27°C, a fin de seleccionar leche cruda rica en floras mesófilas que tiene esta doble acidificación lenta y la estabilización de la propiedad. La leche así seleccionada es leche cruda rica en flora mesófilas que en el selector de temperatura 27°C, permite una lenta acidificación de un medio de fermentación de una primera etapa de fermentación de estabilización según la invención.

[0024] Se puede describir tal proceso como un proceso de la invención "bionativo". De hecho, se aprovecha de la leche de la biodiversidad y en particular la biodiversidad de la leche cruda nativa. Por extensión se describirá como "levadura nativa" una tal levadura según la invención obtenida por un método "bionativo", según la invención.

[0025] Ventajosamente y según la invención, se proporciona la estabilización de dicha primera etapa de fermentación sin añadir ninguna reducción artificial de especies microbiológicas en/de la leche cruda. En particular, se lleva a cabo todas las etapas de la fermentación estabilizante sin añadir artificialmente especies microbiológicas en/de la leche cruda.

[0026] Ventajosamente y según la invención se lleva a cabo cada etapa de fermentación estabilizante a una temperatura predeterminada entre 18°C y 35°C, especialmente a una temperatura predeterminada entre 23°C y 30°C, preferiblemente a una temperatura predeterminada en la gama de 27°C. Ventajosamente, se lleva a cabo etapa de fermentación estabilizante a una temperatura predeterminada de 27°C. Los inventores han observado que una temperatura predeterminada entre 18°C y 35°C, especialmente una temperatura predeterminada entre 23°C y 30°C, especialmente una temperatura predeterminada de aproximadamente 27°C es adecuada para la promoción del crecimiento de microorganismos mesófilos en el medio de fermentación, especialmente el de la fauna útil de microorganismos mesófilos hétérofermentados. Más específicamente, tal temperatura predeterminada de una etapa de fermentación de estabilización está adaptada para permitir la disminución de la proporción de flora de deterioro con respecto a la flora total en el medio de fermentación. Más específicamente, tal temperatura predeterminada de una etapa de fermentación estabilizante está adaptada para promover la flora termotolerante al calor con condiciones óptimas de crecimiento cercanas a las condiciones de crecimiento de flora termófila y aumentar la biodiversidad de la flora del medio de fermentación.

[0027] Ventajosamente y según la invención, la fermentación se interrumpe en la primera etapa de estabilización después de la acidificación de la fermentación láctica de una duración de medio de fermentación entre 12 h y 36 h, sobre todo entre 17 h y 24 h.

[0028] Los inventores han observado que la lenta acidificación de un medio de fermentación en una primera etapa de fermentación estabilizadora, especialmente por la acidificación para disminuir el pH del medio de fermentación a un valor entre 4,6 y 6,0, en particular, a un valor entre 4,9 y 5,6, en particular, a un valor de aproximadamente 5,2, en más de 12 h y menos de 36 h, en particular, más de 17 h y menos de 24 horas, permite amplificar la flora constitutiva del medio de fermentación.

[0029] En este caso, los inventores observaron que la amplificación de la flora constitutiva del medio de fermentación durante una primera etapa de fermentación estabilizadora no conduce a una selección de un pequeño número de especies microbiológicas del medio de fermentación (y, por tanto, tampoco a una reducción en el número de especies microbiológicas en dicho medio de fermentación), pero por el contrario el crecimiento de lo esencial de la mayor parte de las especies microbianas presentes inicialmente en el medio de fermentación.

[0030] Además, una etapa de fermentación estabilizadora de un medio de fermentación compuesto de leche cruda se utiliza para cambiar las proporciones relativas de las diferentes especies microbiológicas presentes en el medio de fermentación mientras se mantiene la mayor parte de especies microbiológicas constitutivas de la flora útil necesaria para el desarrollo de una levadura, cuya biodiversidad es representativa de la biodiversidad de la flora microbiológica constitutiva de la leche cruda utilizada en su elaboración.

[0031] Ventajosamente y según la invención, el medio de fermentación de la primera etapa de fermentación estabilizadora es una leche cruda de mamífero, incluyendo la leche cruda seleccionada del grupo que consiste de leche cruda de vaca, de leche cruda de oveja, de leche cruda de cabra y de leche cruda de búfala. En particular, el medio de fermentación de una primera etapa de fermentación estabilizadora es una leche cruda producida por animales de la clase de los mamíferos, con la excepción de la leche de animales que pertenecen al orden de los monotremas.

[0032] De hecho, los inventores han observado que la lenta acidificación de un medio de fermentación compuesta de una leche cruda, en una primera etapa de fermentación estabilizadora, especialmente por la acidificación que permita disminuir el pH del medio de la fermentación a un valor entre 4,6 y 6,0, en particular, a un valor entre 4,9 y 5,6, especialmente un valor de aproximadamente 5,2, en más de 12 h y menos de 36 h, en particular más de 17 horas y menos de 24 horas, puede amplificar lo esencial de la flora, en particular de la flora útil, constitutiva de leche cruda.

[0033] En particular, una tal etapa de fermentación estabilizadora de un medio de fermentación lenta formada de una leche cruda permite reducir la proporción de flora de deterioro en leches ricas en favor de flores útiles diversificadas

en el medio de fermentación a pH sustancialmente entre 4,6 y 6,0, en particular, a un valor entre 4,9 y 5,6, en particular a un valor de 5,2 obtenido al final de una primera etapa de fermentación estabilizadora de un tratamiento de estabilización.

5 [0034] Este sorprendente resultado no tiene una explicación clara. Los inventores creen que puede ser debido, al menos en parte, al hecho de que la lenta acidificación de un medio de fermentación compuesto de una leche cruda genera, durante la acidificación lenta, diversas condiciones fisicoquímicas que puede permitir el crecimiento de flora útil y permitiendo el establecimiento de un equilibrio estable entre todas las especies microbiológicas que constituyen el medio de fermentación.

10 [0035] Además, la amplificación de sustancialmente todas las especies microbiológicas de flora útil en el medio de fermentación en una primera etapa de fermentación estabilizadora, también es acompañada por un aumento en la proporción de bacterias coliformes, incluyendo bacterias patógenas del género *Escherichia coli*, en dicho medio de fermentación. Los inventores observaron, sorprendentemente, que la proporción de bacterias coliformes, en particular las bacterias patógenas del género *Escherichia coli* del medio de fermentación al final de la primera etapa de fermentación de estabilización, disminuye en los medios de fermentación formados después de las etapas posteriores a la fermentación estabilizadora.

20 [0036] Ventajosamente y según la invención, el medio de fermentación de la primera etapa de fermentación estabilizadora comprende microorganismos vivos en una concentración de entre 5103 y 5105 de microorganismos vivos/ml. En particular, es posible que el medio de fermentación de la primera etapa de fermentación estabilizadora sea una leche cruda limpia, es decir, que comprenda alrededor de 104 de microorganismos vivos/ml. También es posible que el medio de fermentación de la primera etapa en la estabilización de una fermentación de la leche cm es de más de 105, que comprende microorganismos vivos/ml, - en particular, del orden de 2 105 microorganismos vivos/ml. También es posible que el medio de la fermentación, formada a partir de una leche cruda, la primera etapa de fermentación estabilizadora es una leche cruda ultra-limpia que contiene menos de 104 microorganismos vivos/ml en particular del orden de 5 103 microorganismos vivos/ml. Generalmente, el medio de fermentación, que consiste en una leche cruda, la primera etapa de fermentación estabilizadora es una leche cruda libre de patógenos del género *Listeria* et *Salmonella*.

30 [0037] Ventajosamente y según la invención, se lleva a cabo al menos dos -notablemente seis etapas sucesivas de fermentación estabilizadora, y cada etapa de fermentación se interrumpe (una interrupción de la fermentación se lleva a cabo entre las dos etapas sucesivas). En particular, se lleva a cabo después de una primera etapa de fermentación para estabilizar una leche cruda, una sucesión de varias etapas de fermentación posteriores estabilizadoras de un tratamiento de acuerdo con la invención con el fin de agotar el medio de fermentación en flora de deterioro, de flora coliforme y bacterias del género *Escherichia coli*, así como para enriquecer el medio de fermentación en la flora útil. En particular, los inventores observaron que la realización de seis sucesivas etapas de fermentación de estabilización a partir de una leche cruda ofrece al final de las seis etapas de la fermentación estabilizadora, un medio de fermentación cuyo valor pH es sustancialmente entre 4,6 y 6,0, en particular entre 4,9 y 5,6, especialmente de aproximadamente 5,2, que contiene una proporción del orden de varios microorganismos, en particular de 1 a 10 microorganismos que pertenecen a la flora de deterioro para 106 organismos totales. Como alternativa; y ventajosamente se lleva a cabo por lo menos diez etapas sucesivas de la estabilización de la fermentación de una leche cruda, siendo el número de sucesivas etapas de fermentación estabilizadora adaptada para obtener una proporción de flora de deterioro con respecto a la flora total.

45 [0038] Los inventores han encontrado sorprendentemente que el aumento de la proporción de bacterias coliformes, en particular las bacterias patógenas del género *Escherichia coli*, con respecto a la flora total, de modo concomitante a la reducción de la proporción de la flora de putrefacción, en el medio de fermentación que consiste en una leche cruda de un primera etapa de fermentación de estabilización, es una característica de esta primera etapa de fermentación de la estabilización de un medio de fermentación compuesta de una leche cruda. En efecto, durante las etapas posteriores de la fermentación de estabilización un tratamiento de estabilización, la proporción de bacterias coliformes, en particular las bacterias patógenas del género *Escherichia coli* con respecto a la flora total, disminuye en los medios de fermentaciones sucesivos de las etapas posteriores de la estabilización de la fermentación, alcanzando, por ejemplo, un valor inferior a 0,01%, incluyendo aproximadamente 0,001%, o incluso una cantidad no detectable de patógenos del género *Escherichia coli*. Así, en el medio de fermentación de una etapa adicional de estabilización de la fermentación de un tratamiento de estabilización, el número total de microorganismos alcanza un valor de aproximadamente 2 109 microorganismos/ml, mientras que la proporción de bacterias *Escherichia coli* basada en la flora total, se reduce a un valor inferior a 0,01%, incluyendo aproximadamente 0,001%, en particular un valor cero.

60 [0039] Hay que señalar que la proporción de bacterias del género *Escherichia coli* con respecto a la flora total en un medio de fermentación de una etapa adicional de estabilización de la fermentación es sustancialmente menor que la proporción de estas bacterias del género *Escherichia coli* basada en la flora total en la leche cruda.

65 [0040] Los inventores han observado que en un medio de fermentación en una etapa posterior de fermentación estabilizadora, la proporción de la bacteria *Escherichia coli* en los medios de fermentación de las etapas posteriores

de fermentación estabilizadora sucesivas disminuye a una proporción del orden de unas pocas bacterias del género *Escherichia coli* para 106 micro-organismos totales.

5 [0041] En un medio de fermentación en una etapa posterior de fermentación estabilizadora, la proporción de conformes, estafilococos, levaduras y mohos disminuye durante las etapas sucesivas de la fermentación estabilizadora hasta que estas especies ya no sean detectables en el medio de fermentación estabilizadora de fermentación estabilizadora final.

10 [0042] En particular, los inventores han observado que la realización de una pluralidad de etapas sucesivas de la estabilización de la fermentación conduce a la estabilización de un ecosistema complejo formado por microorganismos vivos constitutivos de flora útil de leche cruda, siendo la composición diversificada y estable. Aún más sorprendentemente, los inventores han encontrado que la realización de una pluralidad de etapas sucesivas de la estabilización de la fermentación conduce a un ecosistema sustancialmente libre de flora de deterioro y flora patógena.

15 [0043] Por lo tanto, a diferencia de un fermento derivado de co-cultivo que consiste de un pequeño número de cepas de los microorganismos, incluyendo uno, dos o tres cepa(s) de microorganismo(s) que no pueden estabilizarse igual durante subcultivos sucesivos y tiende hacia la selección de una sola cepa que se desarrolla sólo en el ecosistema, el método de la invención permite la estabilización de un ecosistema complejo, comprendiendo varias decenas de cepas diferentes de microorganismos de la leche cruda, y en particular, la mayor parte de la flora útil de dicha leche cruda.

20 [0044] En particular, los inventores han observado que la cinética de acidificación de los medios de fermentación para posteriores etapas sucesivas de la estabilización de la fermentación de un tratamiento de estabilización tienen perfiles sensiblemente similares. En particular, estos perfiles muestran una fase de retardo cuya duración se conserva sustancialmente de una etapa a la otra y una fase de acidificación rápida con un valor máximo absoluto de la pendiente es sustancialmente preservada de una etapa a otra.

25 [0045] Ventajosamente y según la invención, se interrumpe cada etapa de fermentación estabilizadora mediante el enfriamiento del medio de fermentación a una temperatura inferior a 4°C, especialmente a una temperatura entre 0°C y + 4°C. Por lo tanto, se interrumpe la fermentación láctica acidificante sin adición de sustancias para modificar las propiedades físico-químicas, en particular las propiedades ácido-básicas, y biológicas del medio de fermentación. Tal temperatura entre 0°C y + 4°C está adaptado para permitir un rápido enfriamiento del medio de fermentación de la etapa de fermentación y para preservar sustancialmente todo el potencial de revivificación de floras contenidas en este medio. Una tal temperatura de enfriamiento del medio de fermentación está adaptada además para evitar un crecimiento preferencial de los microorganismos psicrófilos durante el enfriamiento y la preservación del medio de fermentación.

30 [0046] Ventajosamente y según la invención, se lleva a cabo al menos una etapa, dicha etapa posterior de estabilización de la fermentación, después de la primera etapa de fermentación estabilizadora, a partir de un medio de fermentación compuesto de una cantidad de un medio de cultivo líquido y una cantidad de un medio de fermentación, dicho medio de fermentación anterior, obtenido después de una etapa anterior de fermentación estabilizadora, en una relación en volumen de la cantidad de medio de fermentación anterior en la cantidad de medio de fermentación entre 0,5% y 25%, especialmente entre 1%) y 5%, en particular del orden de 2%.

35 [0047] Ventajosamente y según la invención, el medio de cultivo líquido es un jugo de lactosa, esterilizado y osmosis, que contiene entre 4% y 20% en peso de sólidos, en particular 12% en peso de sólidos. Un jugo de lactosa, osmosis y esterilizado de acuerdo con la presente invención es un líquido esterilizado, que contiene lactosa, cuyos caracteres de salina y de vitaminas están equilibrados. En particular, se selecciona el medio de cultivo líquido del grupo que consiste de leche natural, leche estandarizada y leche reconstituida, susceptibles de acidificación con bacterias de ácido láctico. Más particularmente, el medio de cultivo líquido es una leche de origen natural seleccionado de entre el grupo que consta de leches pasteurizadas, leche tratada térmicamente y leche microfiltrada o cualquier otro tipo de leche de origen natural.

40 [0048] Ventajosamente y según la invención, el pH del medio de cultivo líquido es entre 6,5 y 7,0, en particular, sustancialmente del orden de 6,6. Los inventores han observado que el medio de cultivo formado de una leche que contiene entre 4% y 20% en peso de extracto seco tiene una capacidad de tamponamiento suficiente para permitir que sustancialmente la neutralización de la acidez del medio de fermentación obtenido por mezcla de una cantidad de medio de cultivo líquido y una cantidad del medio de fermentación anterior cuyo valor pH es de entre 4.6 y 6.0 - en particular entre 4,9 y 5,6, especialmente de del orden de 5,2, de una etapa de fermentación estabilizadora anterior.

45 [0049] Ventajosamente y según la invención, el pH del medio de fermentación tiene un valor de pH de entre 4.6 y 6.0, en particular entre 4,9 y 5,6, en particular del orden de 5.2 y contiene entre 5 107 y 5 109 microorganismos/ml.

50 [0050] Además, ventajosamente y según la invención, la leche cruda se elige del grupo que consta de leches crudas que contienen más de 5 103 microorganismos mesófilos/ml, sometiendo dicha leche cruda seleccionada a una

primera etapa de fermentación estabilizadora de un tratamiento de estabilización y dicha etapa se interrumpe cuando el pH del medio de fermentación llega a un valor entre 4,6 y 6,0, en particular entre 4,9 y 5,6, en particular un valor en el intervalo 5.2.

5 [0051] Ventajosamente y según la invención, la leche cruda se selecciona del grupo que consiste de leche cruda, del que es probable que el pH logre, durante una etapa, dicha etapa de selección, la estabilización de una fermentación por acidificación de la fermentación láctica de leche cruda, la selección de temperaturas de 27°C y 40°C, un valor de 5,5 en más de 15 h, y un valor mínimo de 5,0 dentro de 48 h.

10 [0052] Ventajosamente, la leche cruda se elige del grupo que consiste de leches crudas cuyo pH es probable que alcance, en una etapa, dicha etapa de selección para la estabilización de la fermentación mediante la acidificación de la fermentación láctica de la leche cruda, dos temperaturas de selección de entre 20°C y 40°C, un valor de 5,5 en más de 15 h, y un valor mínimo de 5,0 en 48 h

15 [0053] Se lleva a cabo dicha etapa de selección de la leche cruda a dos temperaturas, en particular de 27°C y 40°C, a fin de seleccionar leche cruda rica en floras mesófilas y/o termófilas.

[0054] Además, ventajosamente y según la invención, se elige antes de la primera etapa de fermentación estabilizadora de un tratamiento de estabilización, la leche cruda del grupo que consiste de leches primas sustancialmente libres de microorganismos patógenos, incluyendo el género Salmonella, el género Listeria, en particular, las especies de Listeria monocytogenes. En particular, la leche cruda se selecciona entre el grupo que consta de leches crudas cuya tasa de microorganismos patógenos está por debajo del umbral definido por las normas de salud, en particular la leche susceptible de formar en medio de cultivo sólido dentro de una colonia de micro-organismos patógenos para 25 g de leche cruda probada.

20 [0055] Ventajosamente, se fabrica levadura exclusivamente a partir de leche cruda, sin adición de reducción artificial de especies microbiológicas en la leche cruda / por un proceso de acuerdo con la invención para eliminar Staphylococcus, levaduras y mohos de levaduras, además de reducir considerablemente la proporción de floras de higiene, incluyendo la proporción de la flora coliforme, o incluso hacer desaparecer por completo la levadura.

30 La levadura obtenida por un proceso de acuerdo con la invención es una levadura:

[0056]

35 - Incluyendo más de 107 microorganismos/ml, en particular entre 5 107 y 5 109 microorganismos/ml y
- Incluyendo de 5 a 100 especies y subespecies microbiológicas diferentes, especialmente de 5 a 30 especies y subespecies identificables, en particular de 5 a 12 especies y subespecies microbiológicas identificables, dichas especies y subespecies microbiológicas se derivan de leche cruda solamente por fermentación espontánea de la misma (sin la adición de levadura ni reducción artificial de especies microbiológicas),

40 y en el que más de 80% de estas especies y subespecies microbiológicas contenidas en la levadura provienen de la flora útil de la leche cruda.

[0057] Alternativamente, la levadura está sustancialmente libre de coliformes, de Escherichia coli y de Staphylococcus.

45 [0058] Ventajosamente, la levadura obtenida por un proceso de acuerdo con la invención contiene microorganismos a una concentración superior a 107 microorganismos/ml, en particular a una concentración de entre 5 107 y 5 109 microorganismos/ml, dichos microorganismos que pertenecen a las especies y subespecies microbiológicas derivadas completamente de la leche cruda, es decir, sin ningún aditivo ni reducción artificial de especies microbiológicas en/de la leche cruda.

50 [0059] Ventajosamente, la levadura comprende de 5 a 100 especies y subespecies microbiológicas diferentes, especialmente de 5 a 30 especies y subespecies identificadas por medios bioquímicos, microbiológicas o genéticas conocidas en sí. En particular, la levadura comprende entre 5 y 12 especies y subespecies microbiológicas identificables a partir de leche cruda solamente por fermentación espontánea de la misma sin necesidad de aditivos o afianzamiento artificial de especies y subespecies microbiológicas a/de levadura.

60 [0060] Se lleva a cabo los análisis microbiológicos de la levadura obtenida por un proceso de acuerdo con la invención por cualquier medio conocido en si. En particular, estos análisis se llevan a cabo por medio de recuento de células microbiológicas, en particular por el crecimiento de la levadura en medios de cultivo sólidos y recuento de colonias formadas. Se utiliza para este fin medios de cultivo sólidos cuya composición se utiliza para seleccionar las diferentes especies microbiológicas de acuerdo a sus requisitos tróficos. Además, se logra estos cultivos a diferentes temperaturas adaptadas para satisfacer las necesidades de crecimiento térmico óptimo de la flora de la levadura. Se lleva a cabo aún más estos cultivos en diversas condiciones de aireación que permiten el crecimiento de microorganismos aerobios, microorganismos anaerobios estrictos, y de microorganismos anaerobios aero tolerantes.

65

[0061] Se realizan análisis de la composición microbiológica y de la biodiversidad de la levadura obtenida mediante un procedimiento según la invención por técnicas de amplificación molecular, de separación y de análisis cualitativo y cuantitativo de ácidos nucleicos, especialmente ADN, diferentes especies microbiológicas que constituyen el motor de arranque según la invención, en particular por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

[0062] Se utiliza tal levadura para la preparación de especialidades fermentadas. El uso de tal levadura puede impartir a la especialidad fermentada características organolépticas, como el sabor y la textura similares a los elaborados a partir de leche cruda. Tal uso también permite un desarrollo armonioso del producto durante su maduración. Además, el uso de una tal levadura aumenta la fecha límite para un uso óptimo (DLUO) del producto fabricado a partir de levadura, proporcionando una composición microbiológica de productos diversificados adaptados para impedir, por un efecto de barrera, cualquier contaminación posterior en la preparación del producto. Tal composición microbiana diversa proporcionada en el método de fabricación de un producto lácteo fermentado, es adecuado para prevenir el desarrollo de una especie microbiológica mayoritaria o incluso única, capaz de devolver en beneficio todo el sustrato disponible. En particular, el uso de una tal levadura evita la producción de amoníaco desagradable, centrándose en las floras de maduración sanas.

[0063] El uso de tal levadura está adaptado para permitir un aumento en el contenido de agua de la especialidad vinculada fermentada en relación con el agua libre del mismo, que confiere a dicha especialidad, una estabilidad en el tiempo, una textura ventajosa y, durante la maduración en cava o envasada, pérdidas de agua controladas y más débiles. Tales pérdidas débiles y controladas de agua generan aumentos de rendimiento de la producción de la referida especialidad y un interés económico.

[0064] La invención se refiere además al uso de una levadura de acuerdo con la preparación de un producto de leche fermentada en el que se lleva a cabo la fermentación de leche cruda. En particular, utilizando una tal levadura en la industria del queso para la preparación de un producto lácteo fermentado de tipo "masa homeada", un producto lácteo fermentado de tipo "queso prensado," un producto lácteo fermentado de tipo "queso blando", un producto lácteo de tipo "queso láctico," un producto lácteo fermentado de tipo "azúl", yogures, leches fermentadas y mantequilla.

[0065] Se utiliza una tal levadura para la preparación de un producto lácteo fermentado en el que se lleva a cabo una fermentación de leche, seleccionada del grupo que consiste de leches crudas, las cuales se han sometido a un tratamiento térmico, en particular de leches pasteurizadas y leches térmicas, leches crudas que se han sometido a un tratamiento especial atérmico, en particular de leches microfiltradas, leches reconstituidas y leches estandarizadas.

[0066] En particular, el uso de una tal levadura para la preparación de un producto lácteo fermentado a partir de leche pasteurizada, termizada o micro-filtrada, ventajosamente para producir un producto fermentado lácteo hechos de leche pasteurizada, termizada o microfiltrada, presentando propiedades organolépticas similares a las propiedades organolépticas de un producto lácteo elaborado con leche cruda.

[0067] El uso de una levadura obtenida durante el tratamiento de estabilización también permite aumentar la reproducibilidad de los métodos de preparación de productos lácteos fermentados mediante la estabilización de la composición microbiológica. Además, el uso de una tal levadura, de composición compleja, permite evitar el producto de un cambio en su maduración asociado con una sola especie microbiana. El uso de tales levaduras permite además aumentar la cantidad de agua unida al producto de leche fermentada, aumentando así el rendimiento de la producción del producto.

[0068] El uso de una levadura biodiversificada está particularmente adaptada para oponerse al desarrollo y/o para retardar el crecimiento de bacterias y/o agentes patógenos de higiene, en un entorno de fabricación de un producto lácteo fermentado, en el producto lácteo fermentado en sí durante su conservación evolutiva. Tal efecto protector está adaptado además para prevenir el desarrollo de bacterias y/o agentes patógenos de higiene en la flora intestinal durante la digestión del producto lácteo fermentado de la invención.

[0069] La invención también se refiere a un método de preparación de una levadura, caracterizada en combinación por todas o algunas de las características mencionadas anteriormente o a continuación.

[0070] Otros objetivos, características y ventajas de la invención aparecerán con la lectura de la siguiente descripción que hace referencia a las figuras adjuntas que muestran realizaciones preferidas de la invención dadas únicamente a título de ejemplos no limitativos, y en donde:

- La figura 1 es un diagrama de bloques que ilustra un método de acuerdo con la invención,
- La figura 2 es una representación gráfica de la evolución en el tiempo del pH de un medio de fermentación consiste en una leche cruda que comprende del orden de $2 \cdot 10^5$ microorganismos/ml de una primera etapa de fermentación estabilizadora, a 27°C de un procedimiento de acuerdo con la invención,
- La figura 3 es una representación gráfica de la evolución en el tiempo del pH de un medio de fermentación consistente en una leche cruda que comprende alrededor de $1,1 \cdot 10^4$ microorganismos/ml de una primera etapa de

fermentación estabilizadora a 27°C de un método de acuerdo con la invención,

- La figura 4 es una representación en forma de varilla de la composición microbiana de los medios de fermentación sucesiva de un tratamiento de estabilización de leche cruda que comprende aproximadamente 2,0 10⁵ microorganismos/ml.

5 - La figura 5 es una representación en forma de varilla de la composición microbiana de los medios de fermentación sucesiva de un tratamiento estabilizador de leche cruda que comprende aproximadamente 1,1 10⁴ microorganismos / ml.

10 - La figura 6 es una representación en forma de varilla de la composición microbiana de los medios de fermentación sucesiva de un tratamiento de estabilización de leche cruda que comprende aproximadamente 6,5 10³ microorganismos / ml.

- La figura 7 es una representación gráfica de la evolución temporal de la composición microbiana de un medio de fermentación de tercera etapa de fermentación para estabilizar un tratamiento estabilizador de leche cruda del orden de 2,0 10⁵ microorganismos/ml de acuerdo con la invención,

15 - La figura 8 es una representación gráfica de la evolución temporal del porcentaje de las floras de deterioro en un medio de fermentación de tercera etapa de fermentación estabilizadora de un tratamiento de estabilización según la invención de una leche cruda que comprende aproximadamente 2.0 10⁵ microorganismos/ml,

- La figura 9 es una representación gráfica de un perfil de análisis electroforético de constituyentes microbiológicos de una levadura obtenida por un proceso de acuerdo con la invención,

20 - La figura 10 es una representación gráfica de un análisis electroforético de constituyentes microbiológicos de una levadura obtenida a partir del co-cultivo.

- La figura 11 es una representación gráfica de un análisis electroforético de constituyentes microbiológicos de una leche cruda.

25 [0071] Un modo de realización de un método de preparación de una levadura según la invención se ilustra mediante el diagrama de bloques en la Figura 1. Se lleva a cabo una muestra 7 de una cantidad de leche cruda en una granja lechera de un grupo 1 de granjas lecheras representativas de un terruño. El conjunto de muestras 7 de leche cruda constituye una colección 8 de muestra de leche cruda. Nos damos cuenta de esta muestra 7 después del ordeño, especialmente en un período de ordeño inferior a 12 horas, y se somete la cantidad de leche tomada directamente a un tratamiento de enfriamiento adaptado para preservar de manera sostenible la composición de la flora viva
30 constitutiva de leche cruda. En particular, se realiza el procesamiento para enfriar un volumen de leche cruda a una temperatura de +4°C. El volumen de leche cruda sometido a tratamiento de enfriamiento está adaptado para permitir un enfriamiento rápido, en particular, en menos de 1 hora, de este volumen de leche cruda. El volumen de leche cruda sometida a un tratamiento de enfriamiento es, en particular, del orden de 1 L.

35 [0072] Posteriormente, se lleva a cabo un paso 9 de la evaluación de las diferentes leches crudas de la colección 8 de leches crudas con el fin de identificar y seleccionar las leches crudas susceptibles de permitir la preparación de una levadura según la invención. La etapa 9 de evaluación de leches crudas de la colección 8 comprende al menos una etapa 13 de la selección de leches crudas en la que se lleva a cabo en al menos una selección de la temperatura, la acidificación de la fermentación láctica de la leche cruda y al final del proceso se retienen las leches
40 cuyo pH del medio de fermentación ha alcanzado un valor de 5,5 en más de 15 h, y un valor mínimo de 5,0 dentro de 48 h. En particular se lleva a cabo en paralelo una etapa 13 para seleccionar una leche cruda a una temperatura de 27°C y/o a la temperatura de 40°C, y se retiene la leche cruda cuyo pH del medio de fermentación láctica acidificante a 27°C y/o a 40°C ha alcanzado un valor de 5,5 en más de 15 h, y un valor mínimo de 5,0 en menos de 48 horas a 27°C y 40°C. Por tanto, se evalúa el potencial de leches crudas de la colección 8 de leches crudas para
45 inducir una disminución en el pH de un medio de fermentación, mediante la acidificación de la fermentación láctica, que es lento y, sin embargo estabilizadora. Se logra esta etapa 13 de la selección de la leche cruda en un reactor adaptado para permitir la medición, en particular, de forma continua, del pH del medio de fermentación. En particular, este etapa 13 se lleva a cabo en un fermentador de selección para mantener la temperatura del medio de fermentación a una temperatura preseleccionada. Esta etapa 13 de selección se realiza con agitación de dicho
50 medio de fermentación. Sin embargo, esta agitación adaptada para homogeneizar el medio de fermentación no es adecuada para permitir la aireación del medio de fermentación. Por lo tanto, la acidificación de la fermentación láctica se produce significativamente en condiciones anaeróbicas.

55 [0073] Se somete, a la hora de una primera etapa 17 de fermentación estabilizadora de un tratamiento 15 de estabilización, un medio de fermentación formado a partir de una leche 16 cruda preseleccionado a una fermentación láctica acidificante a una temperatura de 27°C, se interrumpe dicha fermentación láctica acidificante cuando el pH del medio de fermentación alcanza un valor de 5,2 en más de 12 horas dentro de las 24 horas. Se interrumpe dicho fermentación láctica acidificante mediante el enfriamiento del medio de fermentación a una temperatura de aproximadamente +4°C. Se obtiene al final de esta primera etapa 17 de la estabilización de la
60 fermentación, un medio de fermentación que consiste de una leche fermentada 18 con un pH del orden de pH 5,2, de la que la temperatura es del orden de +4°C, y cuya flora microbiológica se enriquece en comparación con la flora de la leche cruda de partida.

65 [0074] En una segunda etapa 19 posterior a la fermentación estabilizadora, se prepara un medio de fermentación de una segunda etapa de fermentación estabilizadora, que consiste en mezclar una cantidad de leche 18 fermentada y una cantidad de un medio 20 de cultivo líquido, de modo que la proporción volumétrica de leche 18 fermentada en el

medio de fermentación de una segunda etapa de fermentación estabilizadora es del orden de 2%. Se realiza una fermentación láctica acidificante del ácido láctico a 27°C del medio de fermentación de dicha segunda etapa de estabilización de fermentación y se interrumpe la fermentación láctica acidificante cuando el pH del medio de fermentación de la segunda etapa de fermentación estabilizadora alcance el valor de 5,2. Se interrumpe dicha fermentación láctica acidificante por enfriamiento a 4°C del medio de fermentación a un pH de 5,2 de la segunda etapa de fermentación estabilizadora.

[0075] En esta forma de realización de un método de acuerdo con la invención, se proporciona una pluralidad de etapas sucesivas de fermentación estabilizadora y el medio de fermentación de cada etapa de fermentación estabilizadora está formada por una cantidad de un medio de 20 de cultivo líquido y una cantidad de un medio de fermentación a pH 5,2, a partir de una etapa previa de estabilización de la fermentación.

[0076] Por lo tanto, en etapas sucesivas 22 y 24 de la fermentación de estabilización posterior, se prepara un medio de fermentación para una etapa posterior de fermentación estabilizadora de un tratamiento 15 de estabilización, que consiste en mezclar una cantidad de un medio 21, respectivamente, 23 de fermentación a pH 5,2, con una cantidad de un medio 20 de cultivo líquido, de modo que la proporción volumétrica del medio de fermentación 21, 23 a pH 5,2 en el medio de fermentación de una etapa posterior de fermentación estabilizadora sea del orden de 2%. Se realiza una fermentación láctica acidificante del ácido láctico a 27°C del medio de fermentación de una etapa adicional de fermentación estabilizadora y se interrumpe la fermentación láctica acidificante cuando el pH del medio de fermentación de la etapa adicional de estabilización de la fermentación alcance el valor de 5,2. Se interrumpe dicha fermentación láctica acidificante por la etapa posterior de enfriamiento del medio de fermentación de la fermentación de estabilización a una temperatura sustancialmente del orden de +4°C.

[0077] El medio de fermentación obtenido al final de la etapa 24 de fermentación estabilizadora es una levadura 25, teniendo una alta concentración, notablemente del orden de 2 109 microorganismos/ml, incluyendo la mayor parte de las especies microbiológicas constitutivas de la flora útil de leche 16 cruda seleccionada.

[0078] En una segunda forma de realización no representada de un proceso según la invención, es posible llevar a cabo, después de la etapa 24 de estabilización de la fermentación, una pluralidad -en particular de una de dos- etapas adicionales posteriores de la fermentación estabilizadora de un tratamiento 15 de estabilización mediante la realización de la fermentación láctica acidificante a 27°C de un medio de fermentación compuesto de una cantidad de un medio de fermentación estabilizadora a pH 5,2 a partir de una etapa anterior de fermentación estabilizadora de tratamiento 15 de estabilización, y una cantidad de un medio de cultivo 20 de cultivo, interrumpiendo dicha fermentación láctica acidificante cuando el pH del medio de fermentación alcanza un valor de 5,2. Se interrumpe dicha fermentación láctica acidificante mediante el enfriamiento del medio de fermentación de la etapa de fermentación estabilizadora a una temperatura sustancialmente del orden de +4°C.

[0079] En una tercera realización no mostrada de un método de acuerdo con la invención, se utiliza para la preparación de medios de fermentación sucesivas etapas de fermentación estabilizadora de un tratamiento de estabilización 15, 20 de los medios de cultivo de diferentes composiciones que se mezclan con una cantidad de un medio de fermentación a partir de una etapa de fermentación anterior de estabilización.

[0080] EJEMPLO 1: Preparación de una levadura a partir de una leche cruda que consta de alrededor de 2 105 microorganismos vivos/ml.

[0081] Hemos escogido una leche cruda de vaca en una granja de productos lácteos que pertenece a un terruño, previamente seleccionado en función de las condiciones de cría de ganado, sobre todo en una granja lechera que encarna un modo de pastos permanentes. Se ordeña 1 L de esta leche que está conservada a +4°C hasta el tratamiento de estabilización. Esta leche tiene una numeración de FMAR (floras mesófilas aerobias revivificables) elevada, del orden de 2 105 microorganismos/ml. Esta leche se coloca bajo agitación, a una temperatura de 27°C en un fermentador adecuado para permitir la fermentación láctica de la leche cruda. En particular, esta fermentación láctica se lleva a cabo en un fermentador adecuado para permitir la medición del pH del medio de fermentación.

[0082] La figura 2 ilustra la variación del pH de un medio de fermentación, formado a partir de una leche cruda que comprende aproximadamente 2 105 microorganismos/ml, de una primera etapa de fermentación estabilizadora de un tratamiento de estabilización a 27°C de acuerdo con la invención. La figura 2 muestra dicho cambio en el pH del medio de fermentación de dicha etapa primera estabilizadora de fermentación a 27°C cuando la fermentación láctica acidificante no se interrumpe en el momento en que el pH de dicho medio de fermentación alcanza un valor entóico a 5,2. La duración de la fase de latencia de la curva de acidificación, definida como la porción inicial de la cinética durante la cual el valor de pH es sustancialmente invariante, es del orden de 10 h. El pH del medio de fermentación alcanza un valor de 6,0 después de un tiempo de fermentación láctica acidificante de 12 h, el valor de 5,2 después de 18 h y el valor de 4,9 después de 24 h. El pH del medio de fermentación se estabiliza en un valor de aproximadamente 4,4 después de aproximadamente 30 h de fermentación. Así, para la implementación de un método de acuerdo con la invención, el medio de fermentación de la primera etapa de fermentación es una leche cruda y la estabilización de la fermentación láctica acidificante del medio de fermentación se detiene preferiblemente cuando el pH del medio de fermentación alcanza 5,2, en particular, en este ejemplo después de 18 horas.

[0083] La figura 4 muestra a modo de ejemplo, los cambios en la composición de la flora (FMAR) mesófila aerobia revivificable (a) de la flora coliforme (b), Escherichia coli (c), estafilococos (d), levaduras (e) de mohos (f) y la flora útil (g) del medio de fermentación durante las etapas sucesivas de un tratamiento de estabilización de una leche cruda que comprende aproximadamente $2 \cdot 10^5$ microorganismos/ml de acuerdo con la invención. El análisis correspondiente a la serie 0 de la figura 4 (barras sólidas) representa el recuento microbiológico de leche cruda. Los análisis corresponden a las series 1, 2, 3, 4, y 5 de la figura 4, respectivamente, muestran los recuentos microbiológicos del medio de fermentación a pH 5,2, respectivamente, de la primera, segunda, tercera, cuarta, y el quinta etapa de la fermentación estabilizadora de un tratamiento de estabilización según la invención.

[0084] Los valores numéricos correspondientes a estos recuentos se dan en la Tabla 1 a continuación. La composición de la flora microbiológica útil (g) se detalla en la tabla 1 abajo e incluye todos los estreptococos (h) lactococos (i), lactobacilos (j) y Leuconostoc (k).

	a	b	c	d	e	f	g			
							h	i	j	k
0	2,04E+5	1,3E+2	1,0E+1	5,0E+1	1,3E+2	2,8E+3	8,4E+3	4,08E+4	4,4E+3	4,24E+4
1	2,70E+9	1,06E+8	4,90E+7	5,66E+2	3,10E+7	5,0E+0	2,49E+8	2,6E+8	3,06E+8	4,52E+6
2	2,44E+9	8,20E+5	5,90E+5	nd	3,0E+5	nd	4,30E+8	5,5E+8	2,06E+8	8,5E+6
3	2,76E+9	1,03E+5	2,65E+4	nd	nd	nd	7,0E+8	7,8E+8	1,02E+8	3,0E+7
4	3,25E+9	1,50E+4	1,45E+4	nd	nd	nd	8,4E+8	1,08E+8	1,08E+8	1,44E+7
5	2,85E+9	1,20E+4	8,50E+3	nd	nd	nd	9,5E+8	4,5E+8	9,6E+7	1,13E+7

nd = No detectable

[0085] En la primera etapa de fermentación estabilizadora, el recuento de FMAR (a) pasa de un valor inicial (serie 0) en la leche cruda de $2,04 \cdot 10^5$ microorganismos/ml, a un valor final en el medio de fermentación a pH 5,2 (series 1, 2, 3, 4 y 5) sucesivos en el orden de $2,80 \cdot 10^9$ microorganismos/ml. El recuento de la flora útil (g) pasa de un valor inicial (serie 0) en la leche cruda $9,6 \cdot 10^5$ microorganismos/ml a un valor final de pH 5,2 medios de fermentación (serie 1, 2, 3, 4 y 5) sucesivos, que es estable y en el intervalo de $1,3 \cdot 10^9$ microorganismos/ml.

[0086] Además, el recuento de la flora coliforme (c) aumentó significativamente desde un valor inicial (serie 0) en la leche cruda de 140 microorganismos/ml, a un valor de pH en el medio de fermentación 5,2 (serie 1) de la primera etapa de fermentación estabilizadora $1,06 \cdot 10^8$ microorganismos/ml, antes de disminuirse en los medios de fermentación para las etapas posteriores de la fermentación estabilizadora sucesiva (series 2, 3, 4 y 5) a un valor del orden de $1,20 \cdot 10^4$ micro-organismos/ml. Por lo tanto, la proporción de bacterias coliformes con respecto a la FMAR pasa de un valor del orden de 0,06% en la leche cruda a un valor en el intervalo de 0,0004% en la levadura obtenida después de la quinta etapa de la estabilización de fermentación dando lugar al agotamiento de la flora coliforme.

[0087] Una observación similar se hace vis-à-vis las bacterias Escherichia coli cuya proporción en relación con el FMAR es de 1 bacteria E.coli por $2 \cdot 10^4$ FMAR en la leche cruda y de 1 E.coli por $3 \cdot 10^6$ FMAR en el medio de fermentación de la quinta etapa de estabilización de la fermentación.

[0088] Se observa además en la figura 4 y en la tabla 1 que los estafilococos (d), la levadura (e) y los mohos (f) desaparecen por completo de los medios de fermentación sucesivos en la tercera etapa (serie 4) de la fermentación estabilizadora de un tratamiento de estabilización según la invención.

[0089] Además, los inventores han observado que la cinética de acidificación de los medios de fermentación de las etapas de fermentación estabilizadora de un tratamiento estabilizador según la invención son similares desde la segunda etapa de fermentación estabilizadora. Esta cinética presenta un tiempo de retraso de aproximadamente 150 min para alcanzar un pH 6,0 entre 230 min y 260 min, el pH 5,2 entre 290 min y 320 min y se estabiliza a un pH de 4,5 después de 400 min.

[0090] La figura 7 muestra la evolución de los recuentos bacterianos a lo largo la tercera etapa de fermentación estabilizadora de tratamiento estabilizador de la leche cruda que comprende aproximadamente $2 \cdot 10^5$ microorganismos/ml de acuerdo con la invención, llevándose a una temperatura de 27°C e interrumpido después de 330 minutos cuando el pH del medio de fermentación ha alcanzado el valor de 5,2. La curva (a) representa la evolución de la flora total (FMAR), la curva (b) representa la evolución de la flora coliforme formada y la curva (c) representa la evolución de la flora que consiste en Escherichia coli. Se observa que la flora coliforme y la fauna compuesta por Escherichia coli presenta una tasa de crecimiento que disminuye a partir de 200 min (pH 6,0) de

fermentación láctica, mientras que la flora total (FMAR) tiene una tasa de crecimiento que no se ralentiza significativamente a pH 5,2.

5 [0091] La figura 8 ilustra los cambios en el recuento de flora coliforme, expresados como porcentaje de la flora total (FMAR), en la fermentación de la tercera etapa del medio de fermentación de un método de estabilización de la invención. Se observa que la proporción de flora coliforme con respecto a la flora total del medio de fermentación durante la siembra es de 0,29% y el valor disminuye hasta 0,06% después de 120 min de incubación (pH 6,35) y se equilibra a un valor de 0,03% después de 330 min de incubación (pH 5,20).

10 [0092] La figura 9 presenta una huella digital molecular que muestra la biodiversidad microbiológica de la levadura obtenida mediante un procedimiento según la invención a partir de leche cruda del ejemplo 1, comprendiendo aproximadamente 2 105 microorganismos/ml. El perfil de la figura 9 muestra dos picos principales que corresponden a las principales cepas microbiológicas lactofermentativas de levadura. Además, el perfil muestra ocho picos de intensidad intermedia que caracterizan al menos ocho especies microbiológicas diferentes en la levadura de acuerdo con la invención. Finalmente el perfil revela una multiplicidad de señales débiles, pero caracterizadas por una biodiversidad significativa de la levadura según la invención a base de leche cruda.

15 [0093] Además, el perfil de análisis, como control, de una leche cruda que se utiliza para la preparación de una levadura según la invención presenta un pico principal que corresponde a una cepa microbiológica lactofermentativa de leche cruda, ocho picos de intensidad intermedia, y una multiplicidad de señales débiles características de la biodiversidad de la leche cruda. Este control muestra que un método para la preparación de una levadura según la invención conserva la mayor parte de la biodiversidad de leche cruda en el origen de la levadura preparada.

20 [0094] La figura 10 muestra como control comparativo un perfil de análisis de una levadura obtenida a partir de cultivo que muestra dos picos principales correspondientes a las cepas microbiológicas lactofermentativas y dos picos intermedios de intensidad. Además, el perfil no revela señales débiles indicativas de una biodiversidad significativa de la levadura.

25 [0095] La figura 11 muestra una huella de ADN de una leche cruda, dada a modo de comparación de las composiciones respectivas de la leche cruda y de una levadura obtenida por un proceso de acuerdo con la invención. Se observa que las huellas de ADN de la levadura de acuerdo con la invención es comparable a la de la leche cruda de referencia, revelando así la práctica conservación de la biodiversidad de la levadura en relación a la leche cruda.

30 [0096] EJEMPLO 2: Preparación de un levadura a partir de leche cruda que comprende aproximadamente 1 104 microorganismos/ml.

35 [0097] Se emplea 1 L de leche de vaca cruda con un recuento débil de FMAR (Flora mesófila aerobia revivificable) de alrededor de 1 104 microorganismos/ml. Esta leche cruda se procesa en condiciones similares a las descritas en el Ejemplo 1.

40 [0098] La Figura 3 ilustra un ejemplo de la variación del pH de un medio de fermentación, formado a partir de una leche cruda que comprende aproximadamente 1,1 a 104 microorganismos/ml, una primera etapa de fermentación estabilizadora de tratamiento estabilizador a 27°C de acuerdo con la invención. La figura 3 muestra dicho cambio en el pH de dicho medio de fermentación de dicha primera etapa de fermentación estabilizadora a 27°C cuando la fermentación láctica acidificante no se interrumpe cuando el pH de dicho medio de fermentación alcanza un valor de alrededor de 5,2. La duración de la fase de latencia, definida como parte precoz de la cinética durante la cual el valor de pH es sustancialmente invariante, es del orden de 15 h. El pH del medio de fermentación alcanza un valor de 6,0 después de la fermentación láctica acidificante de 16 h, el valor de 5,2 después de 18 h, y el valor de 4,9 después de 19 h. El pH del medio de fermentación se estabiliza en un valor de aproximadamente 4,3 en aproximadamente 30 horas. Por lo tanto, para la implementación de un método de acuerdo con la invención, el medio de fermentación de la primera etapa de fermentación estabilizadora es una leche cruda y la fermentación láctica acidificante del medio de fermentación se detendría preferiblemente cuando el pH del medio de fermentación alcance 5,2, en particular después de 18 h.

45 [0099] La figura 5 muestra la evolución de la composición de la flora (FMAR) mesófila aerobia revivificable (a) de flora coliforme (B), Escherichia coli (c), estafilococos (d), levadura (e), el moho (f) y la flora útil (g) del medio de fermentación durante las etapas sucesivas de un tratamiento de estabilización de la leche cruda, incluyendo aproximadamente 1,1 104 microorganismos/ml. Un análisis correspondiente a la serie 0 de la Figura 5 (barras sólidas) representa los recuentos respectivos de leche cruda de partida. Los análisis corresponden a las series 1, 2, 3, 4, y 5 de la figura 5 respectivamente representando los recuentos del medio de fermentación a pH 5,2 des etapas primera, segunda, el tercera, cuarta y quinta paso de la fermentación estabilizadora del tratamiento de estabilización.

50 [0100] Los valores numéricos correspondientes a estos recuentos se dan en la tabla 2 a continuación. La composición microbiológica de la flora útil (g) detallada en la tabla 2 agrupa todos los estreptococos (h), lactococos (i), lactobacilos (j) y Leuconostoc (k). En la tabla 2, nd significa no detectable.

55

Tabla 2

	a	b	c	d	e	f	g				
							h	i	j	k	
5	0	1,1E+4	2,2E+2	2,0E+1	3,0E+1	2,0E+2	4,0E+1	4,1E+3	1,3E+3	4,0E+2	1,2E+2
	1	2,72E+9	3,84E+7	3,84E+7	1,6E+3	2,4E+7	nd	2,0E+8	2,32E+8	8,0E+8	9,6E+7
10	2	6,3E+8	8,4E+6	8,4E+6	nd	nd	nd	4,5E+7	3,5E+7	1,53E+8	3,0E+6
	3	8,4E+8	1,5E+5	1,5E+5	nd	nd	nd	1,16E+8	1,16E+8	2,5E+8	1,1E+6
	4	1,76E+9	2,3E+4	2,3E+4	nd	nd	nd	1,08E+8	1,88E+8	1,16E+8	7,4E+6
15	5	1,6E+9	2,5E+4	2,5E+4	nd	nd	nd	4,2E+8	1,08E+9	1,52E+8	1,3E+8
nd = No detectable											

[0101] Durante la primera etapa de fermentación estabilizadora, el recuento del FMAR (a) pasa de un valor inicial (serie 0) en la leche cruda de 1.1 10⁴ microorganismos/ml a un valor final en el medio de fermentación a pH 5.2 (series 1, 2, 3, 4 y 5) sucesivos de aproximadamente 1,2 10⁹ microorganismos/ml. El recuento de la flora útil (g) pasa de un valor inicial (serie 0) en la leche cruda 5.9 10³ microorganismos/ml, a un valor medio final en los medios de fermentación a pH 5,2 (series 1, 2, 3, 4 y 5) que es estable y de aproximadamente 1,06 10⁹ microorganismos/mL.

[0102] Además, el recuento de la flora coliforme (c) aumenta significativamente desde un valor inicial (serie 0) en la leche cruda de 220 microorganismos/ml, a un valor en el medio de fermentación a pH 5.2 (serie 1) de la primera etapa de fermentación estabilizadora de 3,84 10⁷ microorganismos/ml, y después disminuye en los medios de fermentación de etapas posteriores de la fermentación estabilizadora sucesiva (series 2, 3, 4 y 5) a un valor del orden de 2,50 10⁴ microorganismos/ml. Por lo tanto, la proporción de bacterias coliformes con respecto al FMAR pasa de alrededor de 2% en la leche cruda, a un valor de aproximadamente 0001,5% en la levadura obtenida después de la quinta etapa fermentación estabilizadora de la que refleja una pérdida de flora coliforme de la levadura.

[0103] También se observa que la bacteria *Escherichia coli* cuya proporción en relación con el FMAR es de 1 bacteria *Escherichia coli* por 550 bacterias de la flora total (FMAR) en la leche cruda y 1 *Escherichia coli* por 6.4 10⁴ FMAR en el medio de fermentación de la quinta etapa de fermentación estabilizadora que refleja el agotamiento de la bacteria *Escherichia coli* de la levadura.

[0104] Se observa además en la figura 5 y en la tabla 2 que los estafilococos (d), las levaduras (e) y los moldes (f) desaparecen por completo de los medios de fermentación sucesivos de la segunda etapa (serie 3) de fermentación estabilizadora de un tratamiento de estabilización según la invención.

[0105] Además, los inventores han observado que la cinética de acidificación de las etapas de fermentación estabilizadora de un tratamiento de estabilización según la invención son similares desde la segunda etapa de fermentación estabilizadora. Esta cinética presenta un tiempo de retraso de alrededor de 150 min, alcanzando el pH 6,0 entre 210 min y 250 min, el pH 5,2 entre 290 min y 320 min y se estabiliza a un pH 4,5 al cabo de 400 min.

[0106] EJEMPLO 3: Preparación de una levadura a partir de leche cruda que comprende aproximadamente 6,5 10³ microorganismos/ml.

[0107] Se extrae 1 L de leche de vaca cruda con un recuento de FMAR (Flora mesófila aerobia revivificable) débil de alrededor de 6.5 10³ microorganismos/ml. Esta leche cruda se procesa en condiciones similares a las descritas en el Ejemplo 1.

[0108] La figura 6 representa la evolución de la composición de la flora (FMAR) mesófila aerobia revivificable (a) de flora coliforme (b), *Escherichia coli* (c), estafilococos (d), levadura (e), el moho (f) y flora útil (g) del medio de fermentación durante las etapas sucesivas de un tratamiento de estabilización de una leche cruda ultra-limpia que comprende aproximadamente 6,5 10³ microorganismos/ml. Un análisis correspondiente a la serie 0 de la figura 6 (barras sólidas) representa el recuento de la leche cruda de partida. Los análisis correspondientes a la serie 1, 2, 3, 4, 5 y 6 y de la figura 6 muestran los recuentos del medio de fermentación a pH 5,2, respectivamente, de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta y la sexta etapa de la fermentación estabilizadora de tratamiento de estabilización:

[0109] Los valores numéricos correspondientes a estos recuentos se dan en la tabla 3 a continuación. La composición microbiológica de la flora útil (g) que se detalla en la tabla 3 incluye todos los estreptococos (h), lactococos (i), lactobacilos (j) y *Leuconostoc* (k). En la tabla 3, nd significa no detectable.

Tabla 3

	a	b	c	d	e	f	g			
							h	i	j	k
5 0	6,5E+3	-6,0E+0	nd	nd	5,0E+1	2,0E+1	2,05E+3	7,5E+2	2,5E+2	1E+1
10 1	1,55E+9	2,46E+4	nd	nd	1,4E+5	3E+0	3,5E+8	1,53E+8	5,92E+8	1,54E+6
10 2	5,5E+8	7,2E+3	nd	nd	5,4E+3	1E+0	2,5E+8	7,5E+7	9,7E+7	5,3E+6
15 3	6,5E+8	1,45E±2	nd	nd	5,3E+1	nd	1,9E+8	2,84E+8	7,5E+7	4,3E+6
15 4	1,2E+9	4E+0.	nd	nd	nd	nd	2,2E+8	3,4E+8	1,4E+8	2,1E+6
15 5	9,95E+8	nd	nd	nd	nd	nd	2,7E+8	4,5E+8	1,2E+8	4,7E+6
20 6	1,1E+9	nd	nd	nd	nd	nd	3,5E+8	3,2E+8	9,8E+7	5,5E+6
nd = No detectable										

[0110] Durante la primera etapa de fermentación estabilizadora, el recuento de la FMAR (a) cambia de un valor inicial (serie 0) en la leche cruda 6.5 103 microorganismos/ml; a un valor final en los medios de fermentación a pH 5.2 (series 1, 2, 3, 4, 5 y 6) sucesivos en el orden de 1.0 109 microorganismos/ml. El recuento de la flora útil (g) pasa de un valor inicial (serie 0) en la leche cruda 3.06 103 microorganismos/ml, con un valor medio final en los medios de fermentación a pH 5,2 (series 1, 2, 3, 4, 5 y 6) sucesivos que es estable y del orden de 8,0 108 microorganismos/mL.

[0111] Además, el recuento de la flora coliforme (b) aumentó significativamente desde un valor inicial (serie 0) en leche cruda de 6 microorganismos/ml, a un valor de en el medio de fermentación a pH 5.2 (serie 1) de la primera etapa de la fermentación estabilizadora 2,46 104 microorganismos/ml, y después disminuye en etapas posteriores fermentación estabilizadora sucesiva (serie 2, 3 y 4) hasta desaparecer en los medios de fermentación las etapas 5 y 6. Por lo tanto, la proporción de bacterias coliformes (b) con respecto al FMAR pasa de un valor del orden 0,1% en la leche cruda, a cero en la levadura obtenida después de la quinta etapa de fermentación estabilizadora.

[0112] También se observa que las bacterias Escherichia coli (c), así que los estafilococos (D), no son detectables en esta leche cruda ultra-limpia, tampoco son detectables en la levadura producida a partir de dicha leche cruda ultra-limpia.

[0113] Se observa además en la figura 6 y en la tabla 3 que las levaduras (E) y el molde (f) desaparecen totalmente de los medios de fermentación sucesivos en la cuarta etapa (serie 4) de fermentación estabilizadora de un tratamiento de estabilización según la invención.

Reivindicaciones

1. Proceso para la preparación de una levadura a partir de leche cruda en el cual:

- 5 - Se elige una leche cruda que no ha sufrido ningún tratamiento físico o térmico de eliminación o de destrucción de gérmenes microbiológicos;
 - Dicha leche cruda se selecciona entre el grupo que consta de leches crudas cuyo pH alcanza, durante una etapa, dicha etapa (13) de selección, la fermentación estabilizadora mediante la fermentación láctica acidificante de la de la
 10 leche cruda, a al menos una temperatura, dicha temperatura de selección comprende entre 20°C y 42°C:
 o un valor de 5,5 por más de 15 horas, y
 o un valor mínimo de 5,0 en 48 horas, a continuación,
- 15 - El tratamiento se lleva a cabo (15) de estabilización de la leche cruda;
 o dicho tratamiento (15) que comprende al menos dos etapas, dichas etapas de fermentación estabilizadora, sucesivas de fermentación láctica acidificante de un medio de fermentación, incluyendo una primera etapa de estabilización de la fermentación producida a partir de un medio de fermentación que comprende dicha leche cruda,
 y:
 20 o en el que cada etapa de fermentación de estabilización de dicho tratamiento es interrumpida cuando el pH del medio de fermentación llega a un valor entre 4,6 y 6,0;
 o en el que se lleva a cabo al menos una etapa, dicha etapa posterior de fermentación estabilizadora, después de la primera etapa de fermentación estabilizadora, a partir de un medio de fermentación compuesto de una cantidad de un medio de cultivo líquido y una cantidad de un medio de fermentación, dicho medio de fermentación anterior,
 25 obtenido al final de una etapa anterior de fermentación estabilizadora en una relación de volumen de la cantidad de medio de fermentación anterior sobre la cantidad de medio de fermentación comprendido entre 0,5% y 25%;
 o cada etapa de fermentación estabilizadora se realiza a una temperatura predeterminada comprendida entre los 18°C y los 35°C, y;
 o cada etapa de fermentación estabilizadora se interrumpe por enfriamiento del medio de fermentación a una
 30 temperatura por debajo de 4°C.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** se realiza dicha primera etapa de fermentación estabilizadora sin adición ni reducción artificial de especies microbiológica en la leche cruda.
- 35 3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado porque** se interrumpe la primera etapa de fermentación estabilizadora después de un tiempo de fermentación láctica acidificante del medio de fermentación entre 12 h y 36 h.
- 40 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el medio de fermentación (16) de la primera etapa (17) de estabilización de la fermentación es una leche cruda de un mamífero, en particular una leche cruda seleccionada del primer grupo formado por leche cruda de vaca, de leche cruda de oveja, de la leche cruda de cabra y de la leche cruda de bufflonne.
- 45 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la relación en volumen de la cantidad del medio de fermentación anterior sobre la cantidad de medio de fermentación es de entre 1% y 5%, especialmente del 2% aproximadamente.
- 50 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el medio de cultivo líquido es un jugo de lactosa esterilizada y que contiene ósmosis entre 4% y 20% en peso sólido, en particular 12% en peso sólido.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** el pH del medio de cultivo líquido es de entre 6,5 y 7,0.
- 55 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** dicho medio de fermentación anterior presenta un valor de pH de entre 4.6 y 6.0 y contiene entre 5 a 107 y 5 109 microorganismos/ml.
- 60 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** la leche cruda en el grupo consiste en leches crudas cuyo pH alcanza, en la etapa (13) de selección llevada a cabo a temperaturas de selección de 27°C y de 40 ° C:
 - un valor de 5,5 en más de 15 h, y
 - un valor mínimo de 5,0 en menos de 48 h.

65

Fig 1

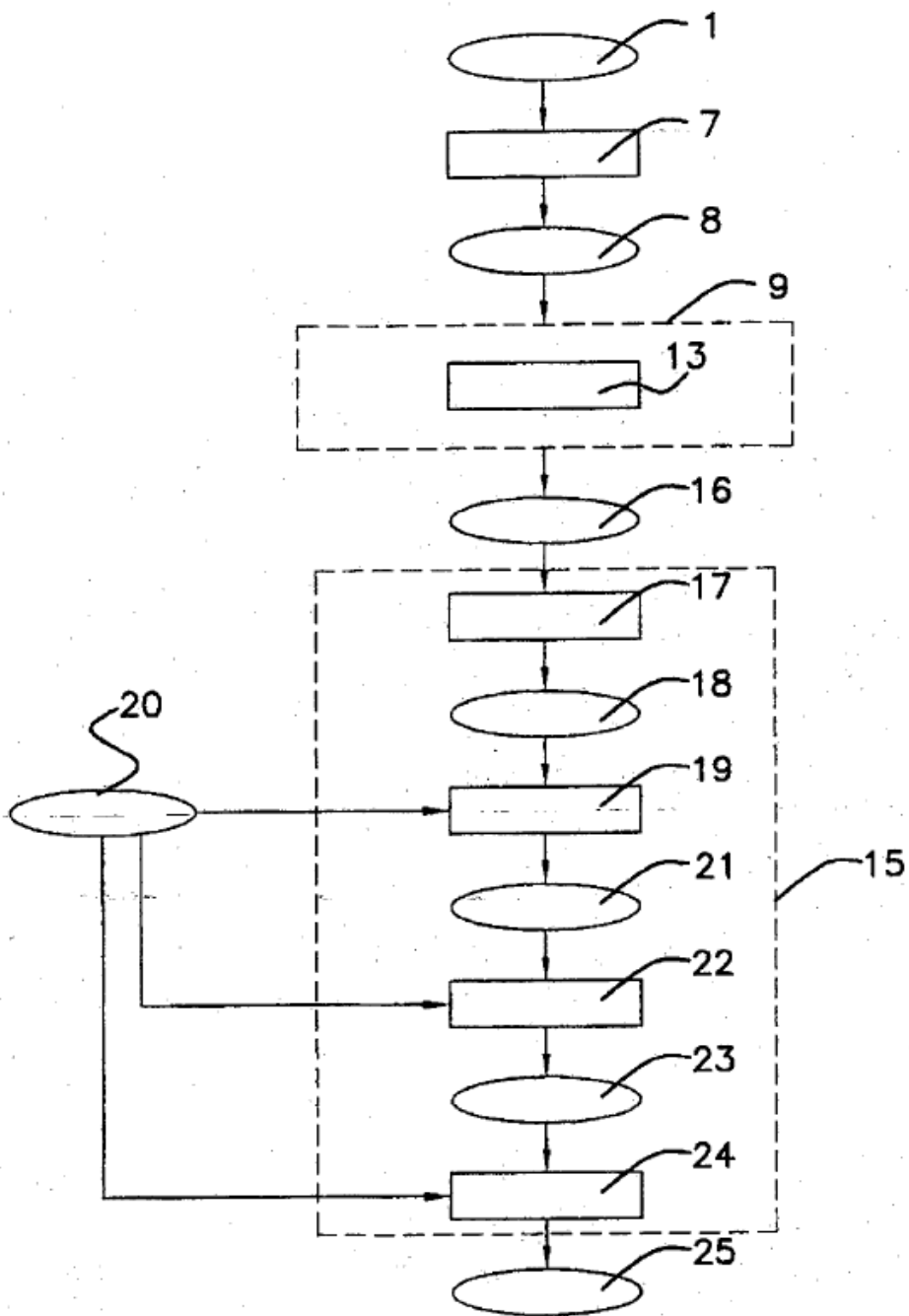


Fig 2

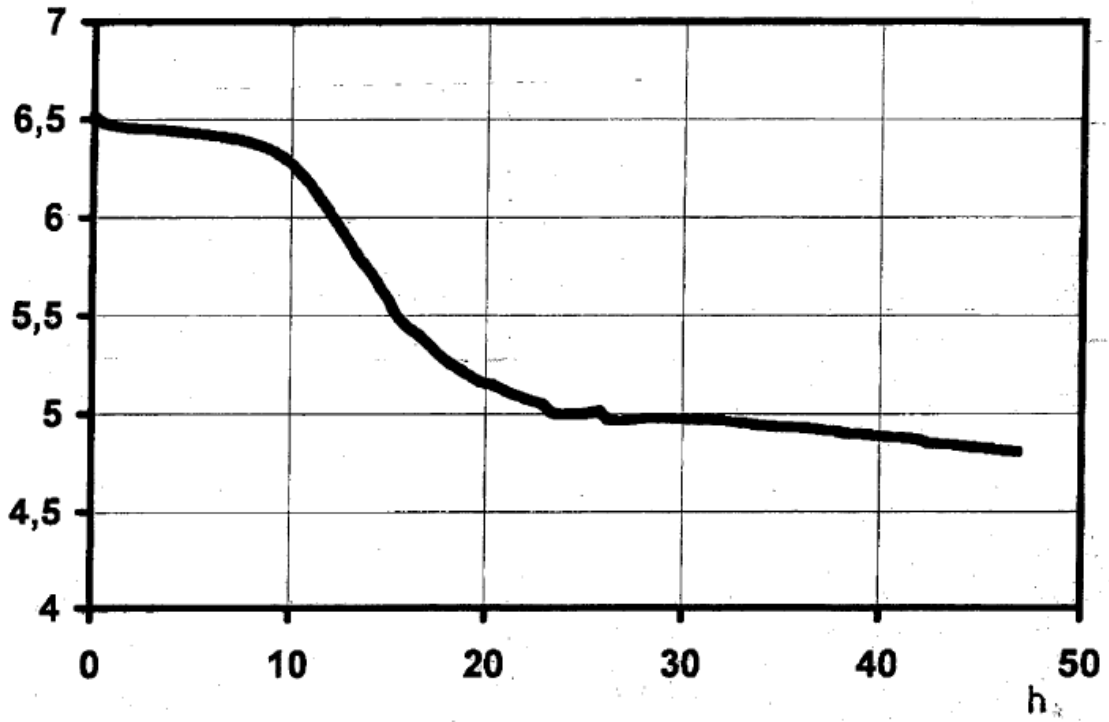


Fig 3

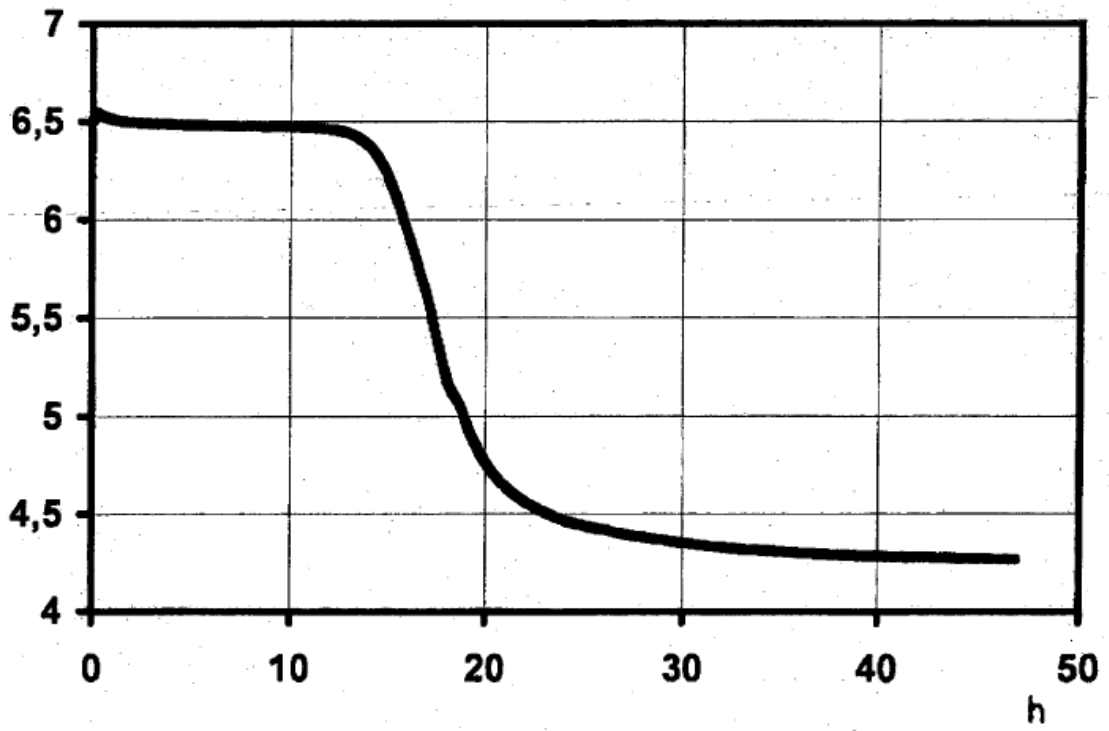


Fig 4

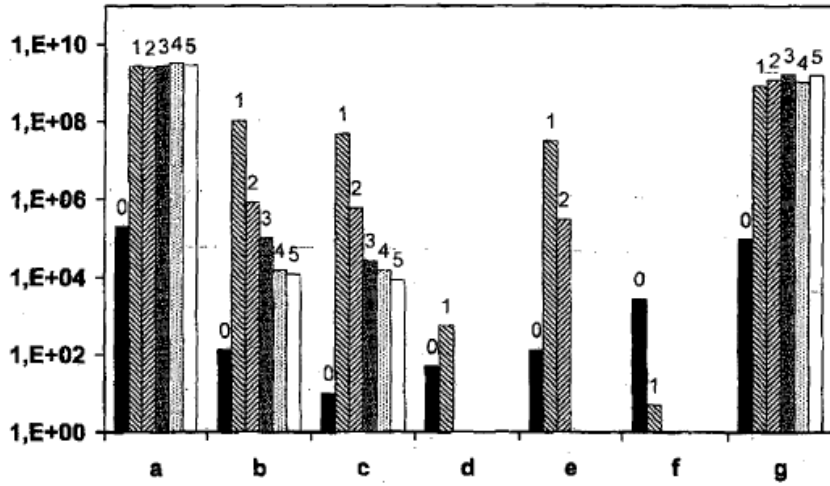


Fig 5

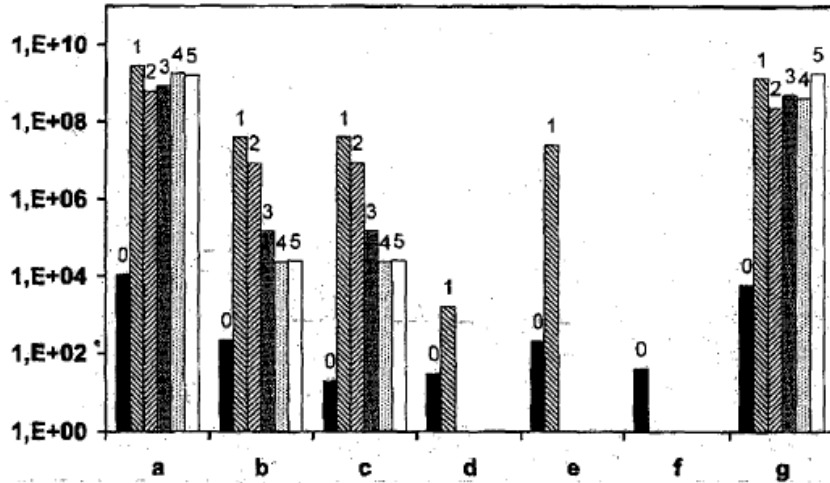


Fig 6

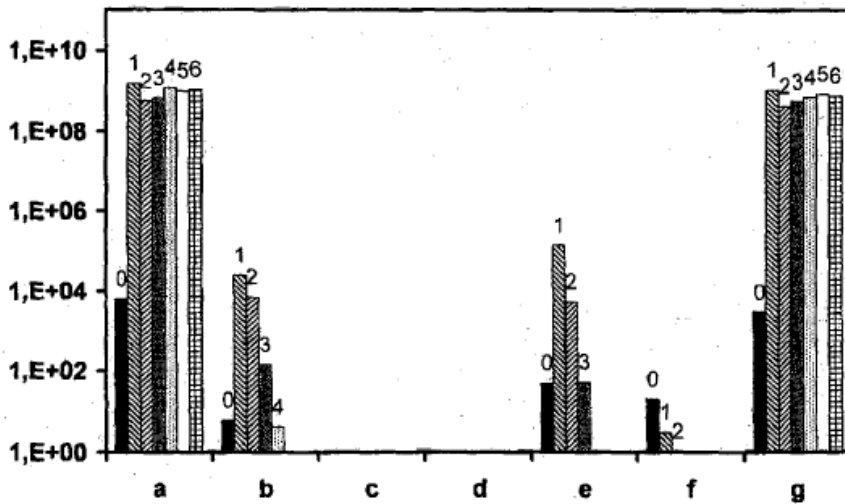


Fig 7

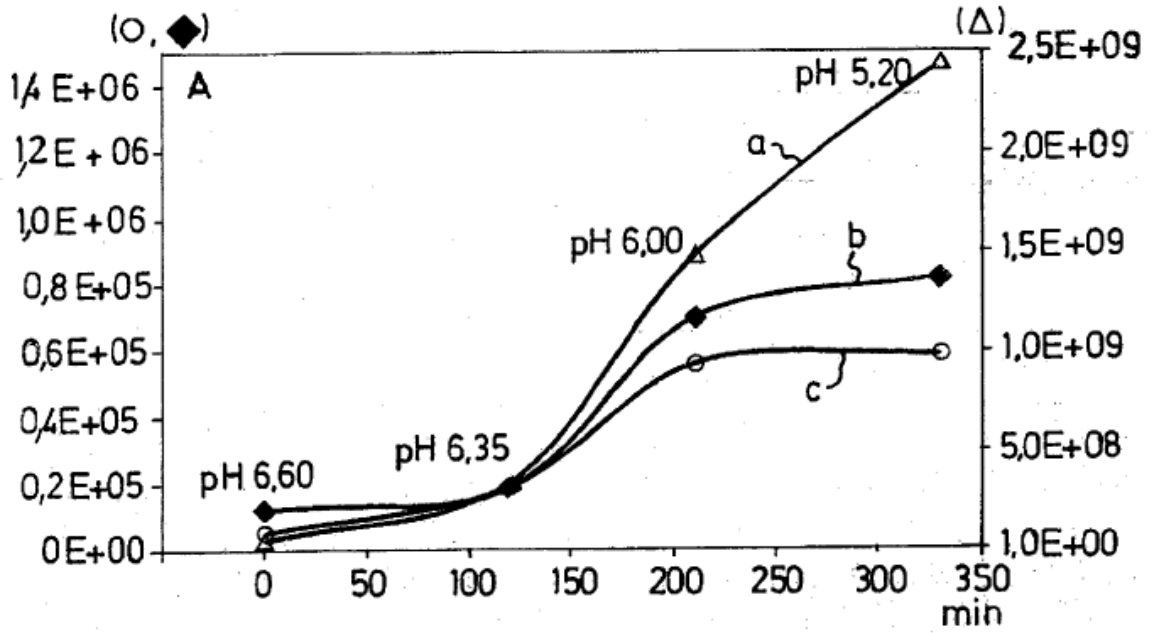


Fig 8

