

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 593 036**

51) Int. Cl.:

<b>A23C 9/123</b>	(2006.01)
<b>A23C 19/032</b>	(2006.01)
<b>A23L 29/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/18</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/26</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/225</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/46</b>	(2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2012 PCT/EP2012/056386**
- 87) Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12136832**
- 96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2012 E 12713972 (3)**
- 97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2699097**

54) Título: **Lactobacillus Rhamnosus potenciador del sabor**

30) Prioridad:

**08.04.2011 EP 11161665**

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

**05.12.2016**

73) Titular/es:

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

72) Inventor/es:

**JIMENEZ, LUCIANA;  
OEREGAARD, GUNNAR;  
TRIHAAS, JEORGES;  
BUCHHORN, GAELLE LETTIER;  
BRANDT, DITTE MARIE;  
FOLKENBERG, DITTE MARIE y  
THAGE, BIRGITTE VEDEL**

74) Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 593 036 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Lactobacillus Rhamnosus potenciador del sabor

## 5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a una composición adecuada para la preparación de un producto lácteo que comprende al menos un fermento láctico y una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, capaz de proporcionarle al producto lácteo un sabor más cremoso, sin que afecte negativamente a la reología del producto lácteo.

10 Además, la presente invención se refiere a procesos para la preparación de un producto lácteo, tal como yogur o queso bajos en grasa, que tenga un alto contenido de diacetilo.

También es parte de la presente invención una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* que sirva para la preparación de tales productos lácteos.

## 15 Estado de la técnica

[0002] En la industria lechera, los productos con bajo o ningún contenido en grasa están experimentando un aumento de la demanda por parte de los consumidores.

20 Sin embargo, tales productos lácteos bajos en grasa carecen frecuentemente de sabor cremoso.

[0003] El diacetilo es un producto de alto valor y se usa en la industria lechera como un compuesto que produce sabor a mantequilla y se añade a tales productos, como margarinas y productos a base de aceite.

25 [0004] Las bacterias de ácido heteroláctico forman diacetilo/acetoina como un producto derivado junto con lactato como el producto principal.

Las células forman acetaldehído activo de piruvato y pirofosfato de tiamina por piruvato-oxidasa.

El acetaldehído activo se condensa con otra molécula de piruvato y forma sintasa de alfa-acetolactato.

No se comprende la formación de diacetilo en *Lactobacillus rhamnosus*, en *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* biovar.

30 *Diacetilactis*, se ha sugerido que alfa-acetolactato se oxida para ser diacetilo mediante una oxidasa de acetolactato alfa (Jyoti et al (2003): Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnisus* on multiple substrates. World Journal of Microbiology & Biotechnology 19: 509-514).

La acetoina se forma directamente por descarboxilación de alfa-acetolactato.

También se puede formar acetoina mediante la reductasa de diacetilo irreversible de diacetilo en la acetoina.

35 [0005] *Lactobacillus rhamnosus* es una bacteria de ácido heteroláctico que se puede usar para producir compuestos de sabor como diacetilo y acetoina (Jyoti et al. 2003).

El nivel de diacetilo producido depende de la cepa, al igual que del sustrato en el que ha crecido.

40 [0006] La patente de EE.UU. nº 4,867,992 (Boniello et al.) y la patente de EE.UU. nº 5,236,833 (Duboff et al.) se refieren a procesos para la producción de diacetilo por la fermentación de un sustrato de café y un sustrato de pectina, respectivamente, con unas bacterias productoras de ácido láctico.

[0007] La preparación, concentración y adición de diacetilo y/o acetoina a productos alimenticios produce costes significantes.

45 [0008] US 4,678,673 (Marshall et al.) se refiere a productos oleaginosos fermentados con una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, que produce diacetilo y acetoina.

Los productos oleaginosos fermentados tienen un sabor a mantequilla o a productos lácteos.

No se ha mencionado el uso de *Lactobacillus rhamnosus* en productos lácteos.

50 [0009] Otras publicaciones informan del uso de productos lácteos de *Lactobacillus rhamnosus* y analizan los compuestos aromatizantes en los productos.

Ramzan et al. (2010, J Agroaliment Proc Technol, 16:188-195) determinó compuestos aromatizantes volátiles, tales como acetaldehído durante la producción de queso cheddar de leche de búfala con *Lactobacillus rhamnosus*.

55 Se evaluaron diferentes proporciones entre especies bacterianas de ácido láctico.

Cichosz et al. (2006, Pol J Nat Sci, 21(2):987-997) y Degheidi et al. (2009, Egypt J Dairy Sci, 37(1):73-84) revelan el uso de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* en la producción de queso y descubrieron después de la evaluación del contenido en diacetilo, que los tratamientos que contenían *L. rhamnosus* estaban entre aquellos que adquirieron las puntuaciones más altas en la evaluación sensorial o tenían el mayor contenido en diacetilo.

60 Senel et al. (2006, GIDA, 31(1):21-26) analizó el contenido de acetaldehído y diacetilo en las muestras de yogur producido con cultivo de bioconservante que contiene *L. rhamnosus*.

No se encontró ningún efecto significativo en las propiedades organolépticas de las muestras de yogur, durante el uso de diferentes niveles del cultivo de bioconservante.

65 Xu et al. (2006, J Food Sci, 71(4):C275-C280) ha analizado el efecto en el nivel de inoculación de *Lactobacillus* que contiene *rhamnosus* y otros fermentos lácticos en los atributos de calidad, p. ej. sabor, de productos lácteos fermentados.

La combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y cultivos de yogur resultó ser importante para un contenido mejorado en ácido linoleico combinado y conseguir que los atributos de los productos lácteos fermentados se produzcan con la denominada calidad.

EP 2 338 350 A1 se refiere a un método para la preparación de un producto lácteo fermentado que también puede comprender el uso de un cultivo probiótico que comprende *Lactobacillus rhamnosus*.

Medina de Figueroa et al. (1998, *Milchwissenschaft*, 53(11)) revelan una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* con el número de depósito ATCC 7469 que fermenta citrato en acetato, CO<sub>2</sub>, lactato-L y una pequeña cantidad de diacetilo, acetoína y 2,3 de butanodiol (DAB).

Los productos de fermentación fueron analizados para usarse como posibles herramientas para controlar calidades aromáticas en la industria lechera.

[0010] Sin embargo, para un tratamiento posterior, existe una necesidad de preparar productos lácteos con un sabor cremoso mejorado sin la adición costosa de diacetilo y/o acetoína.

#### Resumen de la invención

[0011] Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición y un método para preparar un producto lácteo mejorado con un sabor cremoso mejorado, conferido por la presencia de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, donde la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* es *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 que fue depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (DSMZ) con el número de acceso.

DSM24616 o una cepa mutante de la misma, donde la cepa mutante se obtiene usando la cepa depositada como materia prima y donde la cepa mutante tiene las mismas propiedades o mejoradas, con relación a la producción de diacetilo, que la cepa madre.

[0012] Otro objeto de la presente invención es proporcionar una nueva cepa de *Lactobacillus rhamnosus* con propiedades mejoradas para que pueda dar un sabor cremoso mejorado a un producto lácteo, tal como yogur o queso.

[0013] En adelante, serán aparentes otros objetos adicionales y otros serán obvios para un experto en la materia a la que la invención pertenece.

[0014] Como se puede observar aquí en los ejemplos prácticos, la cepa descrita de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697, que fue depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (DSMZ) con el número de acceso DSM24616 produce diacetilo y acetoína, por lo que da un sabor cremoso mejorado a un producto lácteo, sin afectar significativamente a la reología y a post-acidificación del producto lácteo.

[0015] Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición para la preparación de un producto lácteo que comprende al menos un fermento lácteo y una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, donde la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* es *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 que fue depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (DSMZ) con el número de acceso.

DSM24616 o una cepa mutante de la misma, donde la cepa mutante se obtiene usando la cepa depositada como materia prima y donde la cepa mutante tiene las mismas propiedades o mejoradas con relación a producción de diacetilo como cepa madre.

[0016] Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a usar una composición, según el primer aspecto de la presente invención, para la preparación de un producto lácteo.

[0017] Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método para la producción de un producto lácteo, cuyo método incluye las siguientes etapas:

- a) inocular un sustrato de leche con la composición, según el primer aspecto de la presente invención;
- b) fermentar el sustrato de leche;
- c) opcionalmente, añadir otros microorganismos y/o aditivos al sustrato de leche;
- d) opcionalmente, el post-tratamiento del sustrato de leche; y
- e) opcionalmente, el envasado del producto lácteo.

[0018] También se describe un producto lácteo, que se obtiene por el método según el tercer aspecto de la invención.

[0019] Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 que fue depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (DSMZ) con el número de acceso DSM24616 o una cepa mutante de la misma, donde la cepa mutante se obtiene usando la cepa depositada como materia prima y donde la cepa mutante tiene las mismas propiedades o mejoradas con relación a la producción de diacetilo como cepa madre.

#### Breve descripción de los dibujos

[0020]

La Figura 1 representa el tiempo de fermentación del yogur (tiempo para alcanzar pH 4.55). Los yogures se han hecho con un cultivo de bacterias de ácido láctico que contiene múltiples cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, con un contenido de 0 % de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (1), 7.5 % de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (2), y 15 % de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (3).  
Los valores de desviación típica se calculan en 3 réplicas.

La Figura 2 ilustra la evolución del pH en el yogur a los 42 días.

Los yogures se han hecho con un cultivo de bacterias de ácido láctico que contiene múltiples cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, con un contenido del 0 % de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (1), 7.5 % de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (2), y 15 % de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (3).

Los valores de desviación típica se calculan en 3 réplicas.

La Figura 3 representa mediciones reológicas para yogures.

Los yogures se han hecho con un cultivo de bacterias de ácido láctico que contiene múltiples cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, con un contenido del 0 % de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (1), 7.5 % de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (2), y 15 % de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (3).

Los valores de desviación típica se calculan en 3 réplicas.

La Figura 4 muestra diacetilo en yogures.

Los yogures se han hecho con un cultivo de bacterias de ácido láctico que contiene múltiples cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, con un contenido del 0 % de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (1), 7.5 % de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (2), y 15 % de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (3).

Los valores de desviación típica se calculan en 2 réplicas.

La Figura 5 muestra concentraciones de compuestos volátiles (COV) en la leche fermentada después de la fermentación con una cepa única de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12534 (inoculada a 0.003 g/l) o *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (inoculada a 0.003 g/l) y de base de yogur (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (inoculada a un total de 0.007 g/l)) a 43 °C en la leche.

La Figura 6 muestra concentraciones de compuestos volátiles (COV) en la leche fermentada después de su fermentación con cepas de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12534 (inoculadas a 0.003 g/l) o *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (inoculadas a 0.003 g/l) en los antecedentes de yogur (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (inoculadas a un total de 0.007 g/l)) a 43°C en la leche.

La Figura 7 muestra una evaluación sensorial de sabor del diacetilo en queso Gouda40+ con (LBArh12697) o sin adición de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (no adjunto) (inoculada a 0.02 % (p/p)) después 7 semanas de la maduración.

Los resultados se presentaron como valor sensorial medio con unos intervalos de distancia mínima significativa del 95.0 por ciento.

La Figura 8 muestra una evaluación sensorial de olor a diacetilo en queso Gouda40+ con (LBArh12697) o sin adición de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (no adjunto) (inoculada a 0.02 % (p/p)) después 7 semanas de la maduración.

Los resultados se presentaron como valor sensorial medio con unos intervalos de distancia significativa mínima del 95.0 por ciento.

La Figura 9 muestra la cantidad de diacetilo detectada en queso Gouda40+ con (LBArh12697) o sin adición de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (no adjunto) (inoculada a 0.02 % (p/p)) después de 7 y 19 semanas de la maduración, respectivamente.

Los resultados se presentaron como un valor de diacetilo medio (proporción señal/ruido) con intervalos de desviación típica.

Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

[0021] Como se utiliza en este caso, el término "bacterias del ácido láctico" designa una bacteria grampositiva, microaerófila o anaeróbica, que fermenta azúcares con la producción de ácidos, incluyendo ácido láctico como el ácido predominantemente producido, ácido acético y ácido propiónico.

Las bacterias de ácido láctico más útiles industrialmente se han descubierto dentro del orden "Lactobacillales" que incluye *Lactococcus*, spp. *Streptococcus*, spp. *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus*, spp. *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. y *Propionibacterium* spp.

Adicionalmente, las bacterias productoras de ácido láctico del grupo de las bacterias anaeróbicas estrictas, bifidobacteria, es decir, *Bifidobacterium* spp., están incluidas generalmente en el grupo de bacterias de ácido láctico. Estos se usan frecuentemente como cultivos alimenticios únicos o en combinación con otras bacterias del ácido láctico.

5 [0022] Las bacterias del ácido láctico, incluyendo bacterias de las especies *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus thermophilus*, normalmente se suministran a la industria lechera, bien como productos secados por congelación o liofilizados para la propagación de un fermentador a granel como cultivos denominados "Cultivos de Inoculación Directa" (DVS), destinados a la inoculación directa en un vaso de fermentación o artesa para la producción de un  
10 producto lácteo, tal como un producto de leche fermentada o queso.  
En general, por tales cultivos bacterianos de ácido láctico nos referimos a "fermentos lácticos" o "fermentos".

[0023] El término "mesófilo" aquí se refiere a microorganismos que crecen mejor a temperaturas moderadas (15 °C-40 °C).

15 Las bacterias mesófilas más útiles industrialmente incluyen *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp.  
El término "fermentación mesófila" aquí se refiere a la fermentación a una temperatura entre 12 °C y 35 °C aproximadamente.  
El término "producto lácteo mesófilo" se refiere a productos lácteos preparados por fermentación mesófila de un  
20 fermento láctico mesófilo e incluyen productos lácteos como suero de leche, leche agria, leche cultivada, smetana, crema agria y queso fresco, tal como quark, twaróg y queso en crema.

[0024] El término "termófilo" aquí se refiere a microorganismos que crecen mejor a temperaturas mayores de 43 °C.

25 Las bacterias termófilas industrialmente más útiles incluyen *Streptococcus* spp. y *Lactobacillus* spp.  
El término "fermentación termófila" aquí se refiere a la fermentación a una temperatura de aproximadamente más de 35 °C.  
El término "producto lácteo termófilo" se refiere a productos lácteos preparados por fermentación termófila de un  
fermento lácteo termófilo e incluyen productos lácteos como yogur.

[0025] El término "leche" debe ser entendido como la secreción láctea obtenida por el ordeño de cualquier mamífero, como vacas, ovejas, cabras, búfalos o camelloas.

30 Como forma de realización preferida, la leche es leche de vaca.  
El término leche también incluye soluciones de proteína/grasa hechas de materiales de planta, p. ej. leche de soja.

[0026] El término "sustrato lácteo" puede ser cualquier material de leche cruda y/o procesada que se pueda someter a la fermentación, según el método de la invención.

35 Así, los sustratos de leche útiles incluyen, pero no de forma limitativa, soluciones/suspensiones de cualquier leche o productos de tipo leche, que comprendan proteína, como leche entera o baja en grasa, leche desnatada, suero de leche, leche en polvo reconstituida, leche condensada, leche seca, suero de leche, permeato de suero de leche, lactosa, líquido madre de cristalización de lactosa, concentrado de proteína de suero de leche o crema.  
40 Obviamente, el sustrato de leche puede provenir de cualquier mamífero, por ejemplo, si es leche de mamífero sustancialmente pura o leche en polvo reconstituida.

[0027] Antes de la fermentación, el sustrato de leche se puede homogeneizar y pasteurizar, según los métodos conocidos en la técnica.

45 [0028] La "homogeneización" como se utiliza en este caso implica una mezcla intensiva para obtener una suspensión soluble o emulsión.  
Si la homogeneización se realiza antes de la fermentación, se puede realizar para desguazar dividir la grasa láctea en tamaños menores, de modo que esta ya no se separe de la leche.  
50 Este proceso se puede realizar sometiendo la leche a alta presión a través de orificios pequeños.

[0029] La "pasteurización" como se utiliza en este caso se refiere al tratamiento del sustrato de leche para reducir o eliminar la presencia de organismos vivos, tales como microorganismos.

55 Preferiblemente, la pasteurización se logra manteniendo una temperatura específica para un periodo de tiempo específico.  
Normalmente, la temperatura específica se consigue mediante el calentamiento.  
La temperatura y duración se pueden seleccionar para matar o inactivar ciertas bacterias, como bacterias nocivas.  
Puede seguir un paso de enfriamiento rápido.

[0030] La "fermentación" en los métodos de la presente invención hace referencia a la conversión de carbohidratos en alcoholes o ácidos, a través de la acción de un microorganismo.

60 Preferiblemente, la fermentación en los métodos de la invención comprende la conversión de lactosa para ácido láctico.

65 [0031] Se conocen procesos de fermentación para su uso en la producción de productos lácteos y los profesionales en la técnica sabrán cómo seleccionar las condiciones adecuadas para el proceso, como temperatura, oxígeno,

cantidad y características de microorganismo(s), y tiempo del proceso.

Obviamente, las condiciones de fermentación se seleccionan para reforzar el logro de la presente invención, es decir, para obtener un producto lácteo en sólido (como un queso) o de forma líquida (como un producto de leche fermentada).

5 [0032] En el presente contexto, el término "tensión de cizalladura" determina la viscosidad. La viscosidad (cuya unidad es Pa s) se define como la tensión de cizalladura (Pa) / velocidad de cizalladura (1/s). El valor de la tensión de cizalladura se proporciona aquí como un estándar a una velocidad de cizalladura = 300 1/s. Experimentos sensoriales han demostrado (no se muestran datos) que la mejor correlación entre mediciones reológicas y la viscosidad sensorial / grosor en la boca se ha descubierto al usar la viscosidad medida a una  
10 velocidad de cizalladura 300 1/s.

15 [0033] En el presente contexto, el término "mutante" debería entenderse como una cepa derivada de una cepa de la invención, mediante p. ej. ingeniería genética, radiación, luz UV, y/o tratamiento químico y/o métodos que inducen cambios en el genoma.

Se prefiere que el mutante sea un mutante funcionalmente equivalente, p. ej. un mutante que tenga sustancialmente las mismas propiedades o mejoradas (p. ej. con relación a la producción de diacetilo, viscosidad, rigidez del gel, recubrimiento de la boca, sabor, acidificación posterior, velocidad de acidificación y/o robustez de fago) que la cepa madre.

20 Tal mutante es parte de la presente invención. Especialmente, el término "mutante" se refiere a una cepa obtenida sometiendo una cepa de la invención a cualquier tratamiento de mutagenización usado de forma convencional, lo que incluye un tratamiento con un mutágeno químico, tal como etano metano sulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o un mutante que pueda resultar de forma espontánea.

25 Un mutante se puede someter a diferentes tratamientos de mutagenización (un tratamiento único debería ser entendido como aquel que contiene un paso de mutagenización seguido de una etapa de filtración/selección), pero actualmente se prefiere que no se realicen más de 20, más de 10 o más de 5 tratamientos (o pasos de filtración/selección).

30 En un mutante preferido en la actualidad, menos del 5 %, del 1 % o incluso del 0.1 % de los nucleótidos en el genoma bacteriano han sido desplazados con otro nucleótido o eliminados, en comparación con la cepa madre.

[0034] El uso de los términos "a", "un" y "el", así como referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se deben interpretar para cubrir el singular y el plural, a menos que aquí se indique lo contrario o se contradiga claramente en el contexto.

35 Los términos "comprende", "tiene", "incluye" y "contiene" se deben interpretar como términos amplios (es decir, significa "incluye, pero no está limitado a") a menos que se señale lo contrario.

La lectura de gamas de valores que aquí se realiza está meramente destinada a servir como método clave para hacer referencia individualmente a cada valor, que decrece por separado en la gama, a menos que aquí se indique lo contrario, y cada valor se incorpora por separado en una especificación, como si aquí se les nombrara de forma  
40 individualizada.

Todos los métodos aquí descritos se pueden realizar en cualquier orden adecuado, a menos que aquí se indique lo contrario o de otro modo quede claramente contradicho en el contexto.

45 El uso de todos y cada uno de los ejemplos y o cualquier expresión que aquí se utilice (p. ej. "tal como" ), se destina meramente a explicar la invención con claridad y no plantea límites en el ámbito de la invención, a menos que se reivindique lo contrario.

Ninguna expresión concreta debería ser interpretada como indicador de que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

#### 50 Implementación y aspectos de la invención

[0035] Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han descubierto que, por la inoculación y fermentación de un sustrato de leche con una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, además de un fermento láctico, donde la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* es *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 que fue depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (DSMZ) con el número de acceso DSM24616 o una  
55 cepa mutante de la misma, donde la cepa mutante se obtiene usando la cepa depositada como materia prima y donde la cepa mutante tiene las mismas propiedades o mejoradas, con relación a la producción de diacetilo como cepa madre, es posible proporcionar al producto lácteo resultante un sabor cremoso agradable sin afectar negativamente a la textura del producto lácteo, al tiempo de fermentación y a la post-acidificación.

60 [0036] El sabor cremoso mejorado fue detectado en productos lácteos preparados ambos por procesos de fermentación mesófilos (26 °C y 30 °C) y termófilos (43 °C) en presencia de un *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 que fue depositado en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (DSMZ) bajo el n.º de acceso DSM24616.

65 [0037] Mediante los términos "sabor cremoso aumentado" se entiende que el contenido de diacetilo y/o acetoína en el producto está aumentado y/o que el sabor cremoso del producto, como determina un panel de evaluación

sensorial, está mejorado en comparación con un producto que no contiene una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, según la presente invención.

5 [0038] Pese a que no se pretende estar sujeto a teorías, se piensa que el sabor cremoso mejorado que proporciona una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* al producto lácteo, según la presente invención, se debe a la producción mejorada de diacetilo y/o acetoina de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus*.

10 [0039] Como forma de realización preferida, el producto lácteo es un producto de leche fermentada sin o bajo en grasa o un queso que carece esencialmente de un sabor cremoso si, según la presente invención, la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* no se ha usado en la fermentación o no se ha usado en la fermentación.

15 [0040] La cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, tal como se describe en este caso, es útil en una composición para la preparación de un producto lácteo que comprende al menos un fermento lácteo y la cepa de *Lactobacillus rhamnosus*.

20 [0041] Típicamente, tal composición comprende la bacteria en una forma concentrada incluyendo concentrados congelados, secos o liofilizados que típicamente contienen una concentración de células viables, que están comprendidas en el rango de  $10^4$  a  $10^{12}$  ufc (unidades formadoras de colonias) por gramo de la composición, incluyendo al menos  $10^4$  ufc por gramo de la composición, como al menos  $10^5$  ufc/g, p. ej. al menos  $10^6$  ufc /g, como al menos  $10^7$  ufc /g, p. ej. al menos  $10^8$  ufc /g, como al menos  $10^9$  ufc /g, p. ej. al menos  $10^{10}$  ufc /g, como al menos  $10^{11}$  ufc /g.

Así, la composición antimicrobiana de la invención está presente preferiblemente en una forma liofilizada, congelada o seca, p. ej. como un cultivo de inoculación directa (SVD).

25 Sin embargo, como se utiliza en este caso, la composición antimicrobiana, también puede ser un líquido que de obtenga después de la suspensión de los concentrados celulares congelados, secos o liofilizados en un medio líquido, como agua o un tampón PBS.

30 Donde la composición antimicrobiana de la invención es una suspensión, la concentración de células viables se encuentra en el rango de  $10^4$  a  $10^{12}$  ufc (unidades formadoras de colonias) por ml de la composición, incluyendo al menos  $10^4$  ufc por ml de la composición, tal como al menos  $10^5$  ufc /ml, p. ej. al menos  $10^6$  ufc /ml, tal como al menos  $10^7$  ufc /ml, p. ej. al menos  $10^8$  ufc/ml, tal como al menos  $10^9$  ufc /ml, p. ej. al menos  $10^{10}$  ufc /ml, tal como al menos  $10^{11}$  ufc /ml.

35 [0042] La composición puede contener adicionalmente como otros componentes aditivos crioprotectores y/o convencionales, que incluyan nutrientes tales como extractos de levadura, azúcares y vitaminas, p. ej. vitamina A, C, D, K o vitaminas de la familia de vitamina B.

Los crioprotectores adecuados que se pueden añadir a las composiciones de la invención son componentes que mejoran la tolerancia al frío de los microorganismos, tal como manitol, sorbitol, tripolifosfato de sodio, xilitol, glicerol, rafinosa, maltodextrina, eritritol, treitol, trehalosa, glucosa y fructosa.

40 Otros aditivos para ser incluidos, p. ej., carbohidratos, sabores, minerales, enzimas (p. ej. cuajo, lactasa y/o fosfolipasa).

[0043] Como es normal en los procesos de fermentación bacterianos de ácido láctico, para aplicar un cultivo mezclado como un fermento lácteo, en determinadas formas de realización, la composición comprenderá una pluralidad de cepas, bien de las mismas especies o bien de especies diferentes.

45 Un ejemplo típico de tal combinación útil de bacterias de ácido láctico en un cultivo iniciador es una mezcla de una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* y una cepa de *Streptococcus thermophilus*.

[0044] En una forma de realización preferida de la presente invención, el fermento láctico es un cultivo láctico termófilo y la composición es adecuada para la fermentación termófila.

50 [0045] En otra forma de realización preferida, el fermento láctico se ha seleccionado del grupo consistente en el género *Streptococcus* y *Lactobacillus*.

En una forma de realización preferida, el fermento láctico comprende al menos una cepa de *Lactococcus lactis*.

55 El fermento láctico puede comprender cualquier cepa de *Lactococcus lactis* conocida en la técnica, tal como cepas de *Lactococcus lactis* subesp. *Cremoris*, *Lactococcus lactis* subesp. *Hordniae* o *Lactococcus lactis* subesp. *Lactis*.

En otra forma de realización preferida, el fermento láctico comprende una cepa de *Lactococcus lactis* subesp. *remoris* y una cepa de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*.

60 [0046] La composición se puede usar para preparar un producto lácteo con un sabor cremoso mejorado.

[0047] En una forma de realización preferida, el producto lácteo es un producto de leche fermentada, tal como yogur. En otra forma de realización preferida, el producto lácteo es un queso.

65 [0048] En una forma de realización preferida, el producto lácteo contiene al menos 0.75 ppm de diacetilo, tal como al menos 1.0 ppm de diacetilo, tal como al menos 1.5 ppm de diacetilo.

El producto lácteo mesófilo puede contener entre aproximadamente 0.75 ppm y 3.00 ppm de diacetilo, más

preferiblemente entre aproximadamente 1.00 y 2.50 ppm de diacetilo y de la forma más preferible entre aproximadamente 1.5 ppm y 2 ppm de diacetilo.

En una forma de realización preferida, el producto lácteo mesófilo contiene más del 1.5 ppm de diacetilo.

5 EL experto tendrá en cuenta numerosos métodos para decidir el contenido de diacetilo en los productos lácteos de la invención.

Por ejemplo, el contenido se puede determinar mediante métodos cromatográficos adecuados, tal como Cromatografía de Gases por Inyección de Espacio de Cabeza Estática (HS-GC).

10 [0049] Como se ha dicho anteriormente, un aspecto de la invención se refiere a un método para la fabricación de un producto lácteo con un sabor cremoso que comprende:

a) inocular un sustrato de leche con la composición, según el primer aspecto de la invención;

b) fermentar el sustrato de leche;

c) opcionalmente, añadir otros microorganismos y/o aditivos al sustrato de leche;

d) opcionalmente, el post-tratamiento del sustrato de leche; y

15 e) opcionalmente, el envasado del producto lácteo.

[0050] Como se ha descrito con anterioridad, para usar el sustrato de leche en la etapa a), este puede ser cualquier material de leche cruda y/o procesada que se pueda someter a la fermentación, según el método de la invención.

20 [0051] El sustrato de leche se puede inocular con la composición anterior mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, el sustrato de leche se puede inocular por inoculación directa en un vaso de fermentación.

[0052] En una forma de realización preferida, la etapa b) comprende la fermentación del sustrato de leche a una temperatura de aproximadamente por encima de 37 °C.

25 Preferiblemente, la fermentación se efectuará a una temperatura de entre aproximadamente 38 °C y 45 °C, más preferiblemente entre aproximadamente 39 °C y 42 °C.

En otra forma de realización preferida, el sustrato de leche fermentará a unos 40 °C.

Se conocen procesos de fermentación para usarlos en la producción de productos lácteos y el experto en la materia sabrá cómo seleccionar las condiciones del proceso adecuadas, tal como temperatura, oxígeno, cantidad y características de microorganismo(s), y tiempo de proceso.

30 Obviamente, se seleccionan unas condiciones de fermentación para obtener un producto de leche fermentada, adecuado para la producción de un producto lácteo con sabor mejorado y mejor textura.

[0053] Otros microorganismos y/o aditivos se pueden añadir al sustrato de leche antes, durante o después de la fermentación del sustrato de leche en la etapa (b).

Los microorganismos que se pueden añadir a los sustratos de leche contribuirán de manera ventajosa a las propiedades del producto lácteo.

Por ejemplo, el microorganismo puede mejorar o apoyar la producción de diacetilo, viscosidad, rigidez del gel, recubrimiento de boca, sabor, acidificación posterior y/o velocidad de acidificación del producto lácteo.

40 Opcionalmente, se pueden añadir otros ingredientes al sustrato de leche, tales como colores, estabilizantes, p. ej. pectina, almidón, almidón modificado, CMC, etc.; o ácidos grasos poliinsaturados, p. ej. ácidos grasos de omega-3. Tales ingredientes se pueden añadir en cualquier punto durante el proceso de producción, p. ej. antes o después de la fermentación.

45 [0054] Además, el sustrato de leche puede ser post-tratado por cualquier medio necesario para crear el producto lácteo deseado.

Por ejemplo, otros componentes, tales como aditivos crioprotectores y/o convencionales, que incluyen nutrientes tales como extractos de levadura, azúcares y vitaminas, se pueden añadir al sustrato de leche.

50 Además, el sustrato de leche se puede p. ej. homogeneizar o tratar con calor, es decir, pasteurizarlo.

[0055] El producto lácteo se puede empaquetar de cualquier manera adecuada conocida en el art. Por ejemplo, el producto lácteo se puede empaquetar en un contenedor sellado, que tenga un volumen con dentro del rango de p. ej. 25 a 1500 ml.

55 El producto se puede empaquetar en cualquier punto del proceso de producción, p. ej. se puede empaquetar después del paso de la inoculación y luego fermentar en el embalaje.

[0056] Los productos lácteos, que se obtienen mediante el método, incluyen como ejemplos típicos productos como yogur, crema agria, queso y suero de leche.

60 [0057] También es parte de la presente invención un producto lácteo que se obtenga mediante el método anterior.

[0058] En una forma de realización preferida, el producto lácteo es un producto de leche fermentada. Preferiblemente, el producto de leche fermentada es un yogur.

65 [0059] En otra forma de realización preferida, el producto lácteo es un queso.

[0060] En una forma de realización preferida, el producto lácteo contiene al menos 0.75 ppm de diacetilo, tal como al menos 1.0 ppm de diacetilo, tal como al menos 1.5 ppm de diacetilo.

[0061] El cuarto aspecto de la invención se refiere a la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697, que se depositó en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (DSMZ) con el número de acceso DSM24616. Aparte de esta cepa, la invención también pertenece a mutantes derivados de esta, es decir, se han obtenido usando la cepa depositada CHCC12697 como materia prima y donde la cepa mutante tiene las mismas propiedades o mejoradas con relación a la producción de diacetilo como la cepa madre.

La cepa mutante se puede derivar de CHCC12697, p. ej. mediante ingeniería genética, radiación, luz UV, tratamiento químico y/o métodos que inducen cambios en el genoma.

Según la invención, un mutante tendrá esencialmente las mismas características que la cepa madre en cuanto a los niveles de producción de acetato, acetaldehído, diacetilo y/o acetoína.

Se prefiere que el mutante produzca esencialmente al menos un 80 % o más, al menos un 90 % o más, al menos un 95 % o más, o incluso hasta un 100 % o más de acetato, acetaldehído, diacetilo y/o acetoína, comparado con su cepa madre.

[0062] Para el experto está claro que usando la cepa depositada como materia prima, el lector experto puede obtener, mediante mutagénesis convencional o técnicas de reaslamiento rutinarias, otros mutantes o derivados de los mismos, que retengan las características y ventajas pertinentes aquí descritas.

Por consiguiente, el término "un mutante de las mismas" del primer aspecto se refiere a cepas mutantes, obtenidas mediante el uso de la cepa depositada como materia prima.

[0063] Las formas de realización de la presente invención están descritas abajo, por medio de ejemplos no limitativos.

## Ejemplos

Ejemplo 1: selección para *Lactobacillus* spp. termófila con altos niveles de acetoína en leche hervida acidificada.

[0064] Se examinó una selección de 176 cepas de *Lactobacillus* sp. que tuvieran la capacidad de acidificar leche hervida a 30 °C, 37 °C, 40 °C y 43 °C durante aproximadamente 24 horas.

Se examinó la leche hervida acidificada de incubaciones a 37 °C, directamente después de la fermentación para compuestos orgánicos volátiles (COV), mediante Cromatografía de Gases de Espacio de Cabeza, como se describe en el ejemplo 5.

Se descubrió que una cepa, nombrada CHCC12697, producía altos niveles de acetoína (135 ppm), así como niveles completamente altos de acetaldehído (8 ppm) (no se muestran datos).

Se observó que esta cepa fue observada acidificaba la leche hervida tanto a una temperatura mesófila (30-37 °C), como a temperaturas termófilas (40-43 °C).

También se observó que la cepa crece a una alta DO en MRS, caldo suplementado con 2 % glucosa o 2 % lactosa o 2 % fructosa o 2 % galactosa a 40 y 43 °C.

La cepa no era resistente a antibióticos.

La secuenciación genética parcial 16S ARNr mostró que la cepa era un *Lactobacillus rhamnosus*.

Ejemplo 2: método para hacer yogur

[0065] Leche desnatada (DanMælk; Arla) fue fortificada con un 2 % de leche en polvo desnatada (Arla) y tratada térmicamente durante 20 minutos a 90 °C.

Esta solución fue inoculada con un fermento láctico antecedente y con o sin la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697.

[0065] Leche desnatada (DanMælk; Arla) fue fortificada con un 2 % de leche en polvo desnatada (Arla) y tratada térmicamente durante 20 minutos a 90 °C.

Esta solución fue inoculada con un fermento láctico antecedente y con o sin la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697.

[0066] El fermento láctico precedente, usado para hacer el yogur estaba compuesto por múltiples cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en un cultivo congelado de inoculación directa (SVD de F) inoculada a un índice de 0,02 %.

La cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, en la forma SVD de F, se añadió al fermento láctico precedente en las cantidades descritas en la sección del resultado.

En la inoculación, se contaron más de  $1 \times 10^{10}$  ufc/g de células para las cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* y más de  $1 \times 10^8$  ufc /g para las cepas de *Lactobacillus bulgaricus*.

[0067] La solución inoculada se calentó a 43°C y fermentó con un pH 4.55. El tiempo necesario para alcanzar el pH 4.55 es el tiempo de fermentación que se muestra en la Figura 1.

Cuando se alcanzó el pH 4.55, se bombeó el yogur, a través de una unidad de post-tratamiento a 25°C a una

presión de 2 bares y se rellenó en tazas plásticas, que más tarde se sometieron a un almacenamiento en frío. Las mediciones reológicas se hicieron un día después del almacenamiento en frío. La evolución del pH en el yogur se midió después de 1, 14, 28 y 42 días de almacenamiento en frío. Las mediciones de diacetilo se hicieron después de 7 días de almacenamiento en frío.

5

Ejemplo 3: método para medir la evolución del pH

[0068] En el día de análisis (después de 1, 14, 28 y 42 días de almacenamiento en frío) una cápsula plástica que contenía el yogur se retiró del almacenamiento en frío y se midió el pH, utilizando un ph-metro (pHM240, MeterLab). Antes de realizar las mediciones, se calibró el ph-metro (calibración de 2 puntos con 7.00 y 4.01 tampones). Al igual que las muestras, los tampones que se usaron para calibración se almacenaron en frío. La Figura 2 muestra la evolución del pH.

15

Ejemplo 4: método para medir la consistencia del gel y la viscosidad.

[0069] La consistencia del gel se midió mediante el uso de un reómetro Anton Paar con cambiador de muestra automático (reómetro DSR de Physica + ASC). El rotor de medición se colocó en la cápsula de medición que contenía una muestra de yogur de 20 ml, que se agitó a mano y se calentó a 13 °C. Una vez que el rotor se colocó en la muestra de yogur, se aplicó un tiempo de espera. Durante el tiempo de espera, se reconstruyó la mayor parte de la estructura rota por la colocación del rotor en la cápsula. Después, la consistencia del gel se midió por oscilación. Aquí la cepa se mantuvo constante a 0.3 % y la frecuencia se aumentó de 0.5 Hz a 30 Hz. De estas mediciones se pudo calcular el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G''), y de estos se obtuvo el módulo complejo (G\*):

25

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$$

[0070] Después, G\* a 1 Hz estaba correlacionado con la consistencia del gel y se usó para comparar las diferentes muestras (Figura 3).

30

[0071] Usando el mismo equipo (reómetro Anton Paar) se midió la viscosidad, aumentando la velocidad de cizalladura de 0.2707 1/s a 300 1/s con la medición de puntos (tensión de cizalladura) cada 10 s. Después disminuyó la velocidad de cizalladura de 275 1/s a 0.2707 1/s con la medición de puntos cada 10 s. La viscosidad del producto estaba correlacionada con la tensión de cizalladura a 300 1/s en una medición de la curva de flujo y representada en la Figura 3.

35

Ejemplo 5: método para medir compuestos volátiles (VOC)

40

[0072] Las muestras de yogur se analizaron mediante Cromatografía de Gases por Inyección de Espacio de Cabeza Estática (HSGC) que es una técnica potente para el análisis de matrices volátiles complejas. La disposición consistió en un muestreador de Espacio de Cabeza Estática conectado a un cromatógrafo de Gas con detector de ionización de llama (FID)

A continuación, hay una lista del equipo (incluyendo una columna) y software usado:

45

Automuestreador de HS: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.  
Software de HS: HSControl v. 2.00, Perkin Elmer.  
GC: Autosystem, XL Perkin Elmer.  
Software GC: Turbochrom navegador, Perkin Elmer.  
Columna: HP-FFAP 25 m x 0.20 mm x 0.33 µm, Agilent Technologies

50

[0073] Los estándares de concentración conocidos se usaron para determinar factores de respuesta (calibración), se usaron controles para controlar que los factores de respuesta usados fueran estables dentro de series analíticas, al igual que series entremedias y a lo largo del tiempo (meses). La concentración de volátiles (ppm) en muestras y controles se determinó utilizando los factores de respuesta que proceden de estándares.

55

[0074] Se prepararon muestras añadiendo 200 µL de 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1 g de muestra de yogur.

60

[0075] El contenido en diacetilo está representado en la Figura 4.

*Resultados*

65

[0076] Los gráficos de las figuras 1-4 resumen los resultados obtenidos en el yogur, hecho con cultivos de bacterias del ácido láctico con y sin la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697.

5 [0077] La presencia de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 en el cultivo de bacterias del ácido láctico usado para hacer el yogur no influye en el tiempo de fermentación (Figura 1), acidificación posterior (Figura 2) o en las características reológicas del yogur (Figura 3).

10 [0078] Cuando la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 está presente en el cultivo de bacterias del ácido láctico usado para hacer el yogur, se pueden medir cantidades significativamente mayores de diacetilo en el yogur (Figura 4).

Ejemplo 6: análisis sensorial del yogur

15 [0079] Para documentar el efecto de la presencia de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 en un cultivo de yogur, se realizó una evaluación sensorial del sabor cremoso, utilizando un panel programado. La prueba se efectuó como una prueba 2-AFC (elección forzada entre alternativas AFC)/prueba de comparación igualada.

Esta prueba es apropiada cuando dos muestras deberían ser evaluadas focalizando en un atributo (en este caso, sabor cremoso).

20 Esta prueba se debería considerar unilateral, ya que el objetivo era confirmar que la presencia de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 produce un sabor cremoso mejorado.

[0080] De un total de 20 porciones, se les pidió a los evaluadores que indicaran la muestra (entre dos) que tenía la máxima intensidad de sabor cremoso.

25 Señalaron el yogur que contenía la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 en 15 de 20 porciones como las que tenían la máxima intensidad de sabor cremoso.

Este número constituye una diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

30 [0081] Referencia de la prueba 2-AFC (elección forzada entre alternativas AFC)/prueba de comparación igualada: Meilgaard M.C., Civille, G.V. & Carr, B.T. (2007). Sensory Evaluation Techniques, 4 Ed. Capítulo 7: Attribute Difference Tests: How does attribute X Differ Between Samples? pp. 105-128. CRC Press

35 Ejemplo 7: proyección de VOC seleccionados pertinentes para el sabor de yogur producido por dos cepas de *Lactobacillus rhamnosus*.

[0082] Para decidir el efecto en niveles de VOC relevante para el sabor del yogur usando *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 y *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12534, respectivamente, en productos lácteos fermentados, se efectuaron pruebas con unas condiciones de fermentación del yogur (43 °C) en la leche (0.1 % de grasa, 3.7 % de proteína y 4.8 % de lactosa) donde las cepas se evaluaron solas o con (30 % de inóculo) cultivos de yogur (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) como en el estado de la técnica.

40 Los niveles de acetoína, acetaldehído, etanol y diacetilo se determinaron después de 16 horas de fermentación, como se describe en el ejemplo 5.

45 [0083] Las pruebas se realizaron en placas de microtitulación que usan leche (0.1 % de grasa, 3.7 % de proteína y 4.8 % de lactosa) y cultivos de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 y de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12534 (10 g/l) durante la noche.

La manipulación de líquidos se realizó mediante el robot Multiprobe II PLUS (Perkin Elmer).

50 *Resultados:*

[0084]

Tabla 1: niveles de VOC en la leche fermentada con CHCC12534; CHCC12697 o un cultivo de yogur (base).

	Acetaldehído	Etanol	Diacetilo	Acetoína
CHCC12534 (0.003 g/l)	2.8	2.4	2.7	60.5
CHCC12697 (0.003 g/l)	3.7	1.9	2.8	67.4
Base (0.007g/l)	5.8	1.8	1.8	36.5
Leche	0.1	0.3	0.0	0.0

55 [0085] Ambos CHCC12697 y CHCC12534 producen niveles significativamente más altos de diacetilo y acetoína que el cultivo de yogur, usado como estado de la técnica, incluso menos de la mitad de la proporción de inoculación.

El cultivo de yogur produce niveles de acetaldehído significativamente más altos (proporción de inoculación más alta).

60 Los perfiles de CHCC12697 y CHCC12534 no son significativamente diferentes entre sí a nivel de cepa única (Tabla 1 y Figura 5).

Tabla 2: niveles de VOC en la leche fermentada con CHCC12534 y un cultivo de yogur (CHCC12534 y base), CHCC12697 y un cultivo de yogur (CHCC12697 y base) o un cultivo de yogur (base).

	Acetaldehído	Etanol	Diacetilo	Acetoína
CHCC12534 (0.003 g/l) y base (0.007 g/l)	3.7	2.4	5.0	61.8
CHCC12697 (0.003 g/l) y base (0.007 g/l)	12.7	4.2	5.2	127.9
Base (0.007 g/l)	5.8	1.8	1.8	36.5
Leche	0.1	0.3	0.0	0.0

5 [0086] CHCC12697 (30 % de inóculo) con cultivo de base de yogur produce niveles significativamente más altos de acetoína, acetaldehído y etanol en comparación con CHCC12534 (30 % de inóculo) con una base de yogur y en comparación con sólo cultivos de base.

10 CHCC12697 Y CHCC12534 (ambos como 30 % de inóculo) con un cultivo de base de yogur no produce niveles significativamente diferentes de diacetilo (Tabla 2 y Figura 6).

[0087] La adición del 30 % de CHCC12697 en un cultivo de yogur resultó en un aumento de VOC según la Tabla 3.

15 Tabla 3: Aumento de VOC en un cultivo de yogur con una adición del 30 % de CHCC12697 o del 30 % de CHCC12534  
CHCC12697 CHCC12534

CHCC12697	CHCC12534	
Acetaldehído	119%	-36%
Etanol	133%	33%
Diacetilo	189%	178%
Acetoína	246%	68%

20 Ejemplo 8: propiedades sensoriales del yogur con *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697.

[0088] Para analizar la consistencia del gel, el grosor de la boca y el sabor cremoso del yogur con *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697, el yogur se hizo en contenedores en escala 3L de leche desnatada homogeneizada con un 2 % de leche desnatada en polvo añadida.

La base fue pasteurizada a 92 °C durante 20 minutos y enfriada a 43 °C para la inoculación.

25 Un fermento láctico, según el estado de la técnica, (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) fue inoculado a 0,02 %.

*Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 fue añadido como un cultivo durante la noche (15 g por lote).

30 [0089] Los yogures fermentaron a pH 4.55, después se agitaron, enfriaron y envasaron en contenedores de 200 ml. La evaluación sensorial de la muestra se realizó 7 días después mediante un panel sensorial de 5 miembros.

El panel usó la muestra de referencia (sin cultivo de sabor añadido) para crear puntos fijados (valor 0) para un orden de clasificación de las muestras.

35 Después, se valoró la muestra en comparación con la muestra de referencia (-2 a 5) para cada descriptor y los valores medios para todas las valoraciones se usaron para generar puntuaciones de valor medio para cada descriptor (Tabla 4).

Tabla 4: evaluación sensorial de muestra de yogur con *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 añadida.

	Consistencia del gel	Grosor de la boca	Sabor cremoso	Acetaldehído	Diacetilo
CHCC12697 ( <i>Lb. rhamnosus</i> )	2	1.8	1.5	0.8	1.8
Estado de la técnica/Sin sabor	0.1	0.5	1	0.1	0.25

40 [0090] La adición de CHCC12697 al yogur produce una alta consistencia del gel, un buen grosor de boca y un sabor cremoso mejorado.

Ejemplo 9: método para hacer queso Gouda40+

45 [0091] El queso Gouda40+ se hizo de 150 L de leche entera pasteurizada (72 °C durante 20 seg.).

La leche se enfrió a 5 °C y se estandarizó según el nivel de proteína (3.4 a 3.7 %) con un 38 % de nata antes de su uso (proporción grasa/proteína).

La estandarización se calculó en base al contenido de proteína de la leche y centrándose en un queso Gouda con un 40 % de grasa en la sustancia seca.

Después de la estandarización de la leche se precalentó en un intercambiador de calor a la temperatura de premaduración de 32 °C y se bombeó hacia las artesas de queso.

5 Continuó agitándose lentamente (235 r.p.m.) hasta que el cuajo se extendió en la leche.

[0092] El queso Gouda40+ se hizo utilizando los parámetros de la Tabla 5.

[0093] Una adición del 0.01 % (p/p) de cultivo de acidificación (CHN-19, Chr.

10 Hansen A/S), 0.02 % (p/p) de cuajo (Chy-Max Plus, Chr.Hansen A/S), 0.01 % (p/p) CaCl<sub>2</sub> (34 % solución) y se añadió un 0.01% (p/p) de ácido nítrico a cada artesa de queso.

Se añadió un 0.02 % (p/p) del cultivo adjunto (*Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697) a una artesa para probar el efecto de la cepa en el olor y sabor a diacetilo después de 7 semanas de maduración.

15 [0094] Se salaron los quesos durante 20 horas en un 22 % de solución salina a 10 °C.

Los quesos fueron recubiertos, envasados al vacío en bolsas plásticas y almacenados a 9 °C durante 1 semana, seguida de 3 semanas a 13 °C y 2 semanas a 9 °C.

De ahí en adelante se almacenó el Gouda40+ a 5 °C.

20 Tabla 5: parámetros para hacer queso Gouda40+

Paso	Duración	Valor
Prefermentación	35 min	32 °C
Tiempo de cuajo	35 min	
Preagitación	20 min	
Sin suero	5 min	52.5 kg
Medio agitado	10 min	
Tiempo de escaldadura	15 min	38 °C / 45 kg de agua a 51 °C
Agitación Final	40 min	
Cuajo hacia el final de la artesa	5 min	
Pre-presión	25 min	1 bar / 10 min - 2 bares / 15 min
Presión 1	15 min	2 bares / 15 min
Presión 2	15 min	3.5 bares 15 min
Presión 3	90 min	5 bares / 90 min

Ejemplo 10: análisis químico de queso

25 [0095] Para documentar el efecto de la presencia de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 en un queso Gouda40+, se realizó una evaluación sensorial del olor y sabor a diacetilo, respectivamente, utilizando un panel programado.

[0096] La evaluación sensorial se efectuó realizando una prueba de clasificación.

Las muestras se mantuvieron a 13 °C antes de la evaluación sensorial.

30 Las muestras se sirvieron de forma aleatoria en cajas plásticas con una tapa y marcadas con un número aleatorio de tres dígitos.

Las muestras de queso se marcaron a una escala de entre 1-8, donde uno implica un olor o sabor de baja intensidad y ocho un olor o sabor de alta intensidad.

Se efectuó un análisis de la varianza para cada uno de los descriptores sensoriales.

35 Los resultados del ANOVA se explicaron mediante un gráfico que muestra el valor medio del descriptor sensorial, como lo han valorado 12 evaluadores.

Las porciones de terreno también mostraron un intervalo alrededor de cada promedio.

Los intervalos visualizados se basaron en el procedimiento de diferencia significativa mínima (LSD) de Fisher.

Se construyeron de manera que, si dos promedios son iguales, sus intervalos coincidirán el 95.0 % del tiempo.

40 Cualquier par de intervalos que no coincida verticalmente indica un par de promedios con una diferencia estadísticamente significativa.

[0097] La adición de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 al queso Gouda40+ aumentó significativamente la percepción sensorial de olor y sabor a diacetilo (Fig. 7 y 8).

45 Ejemplo 11: análisis químico del queso

[0098] Para documentar el efecto de la presencia de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 en un queso Gouda40+, se realizó un análisis químico del contenido de diacetilo, utilizando la cromatografía de gas como se describe en el Ejemplo 5, excepto la preparación de muestra del queso.

50

[0099] Se probaron los tapones de queso utilizando una jeringa desechable de 3 mL.

El fondo se quitó con un cuchillo y la jeringa se presionó hacia dentro del queso, de manera que se retiró el "tapón". El "tapón" se transfirió a un frasco de espacio de cabeza de 20 mL. Para analizar los compuestos sensibles al oxígeno, se enjuagó el frasco con nitrógeno antes de cerrarlo con la tapa. No se añadió ningún ácido a las muestras de queso.

5 [0100] La adición de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 al queso Gouda40+ aumentó significativamente el nivel de diacetilo en el queso (Fig. 9).

Depósitos y soluciones profesionales

10 [0101] El solicitante pide que la muestra de los microorganismos depositados, declarados más abajo, solo esté disponible para un experto, hasta la fecha en la que se conceda la patente.

15 [0102] La cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 se depositó el 01-03-2011 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig y se le concedió el n.º de acceso: DSM 24616.

20 [0103] El depósito se realizó según el tratado de Budapest, en cuanto al reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines de procedimiento de patente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición adecuada para la preparación de un producto lácteo, que comprende un fermento láctico y una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, donde la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* es *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 que fue depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (DSMZ) con el número de acceso DSM24616 o una cepa mutante de la misma, donde la cepa mutante se obtiene usando la cepa depositada como materia prima y donde la cepa mutante tiene las mismas propiedades o mejoradas con relación a la producción de diacetilo como la cepa madre.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, donde el cultivo lácteo es un cultivo lácteo termófilo.
- 15 3. Composición según la reivindicación 2, donde el cultivo lácteo se selecciona del grupo consistente en los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*.
- 20 4. Composición según la reivindicación 1, donde dicha composición comprende la bacteria en forma de un concentrado congelado, seco o liofilizado.
5. Composición según la reivindicación 4, donde la concentración de células viables en la composición se encuentra en el rango de  $10^4$  a  $10^{12}$  unidades formadoras de colonias por gramo de la composición.
- 25 6. Uso de la composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la preparación de un producto lácteo.
7. Uso según la reivindicación 6, donde el producto lácteo es un producto de leche fermentado.
8. Uso según la reivindicación 7, donde el producto de leche fermentado es un yogur.
- 30 9. Uso según la reivindicación 8, donde el producto lácteo es un queso.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde el producto lácteo comprende al menos 0.75 ppm de diacetilo.
- 35 11. Uso según la reivindicación 10, donde el producto lácteo comprende al menos 1.5 ppm de diacetilo.
12. Un método para la producción de un producto lácteo, que comprende:
- a) inocular un sustrato de leche con la composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
  - b) fermentar el sustrato de leche;
  - c) opcionalmente, añadir otros microorganismos y/o aditivos al sustrato de leche;
  - 40 d) opcionalmente, realizar un post-tratamiento del sustrato de leche; y
  - e) opcionalmente, envasar el producto lácteo.
- 45 13. Método, según la reivindicación 12, donde la etapa b) comprende la fermentación del sustrato de leche a una temperatura por encima de 35 °C.
14. Método, según la reivindicación 13, donde la etapa b) comprende la fermentación del sustrato de leche a una temperatura entre 38 °C y 45 °C.
- 50 15. Cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (DSMZ) con el número de acceso DSM24616 o una cepa mutante de la misma, donde la cepa mutante se obtiene usando la cepa depositada como materia prima y donde la cepa mutante tiene las mismas propiedades o mejoradas con relación a la producción de diacetilo que la cepa madre.

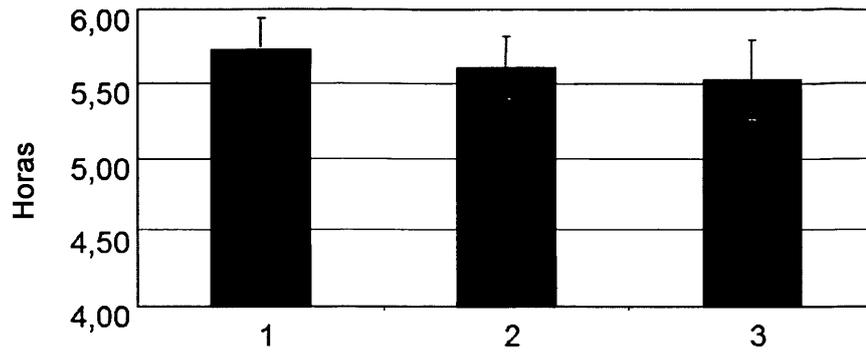


Figura 1

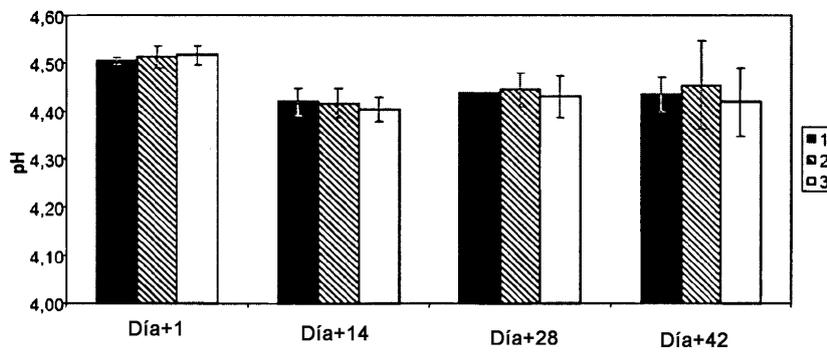


Figura 2

Tensión de cizalladura a 300 1/s (Pa)  
Consistencia del gel (G\*) a 1Hz

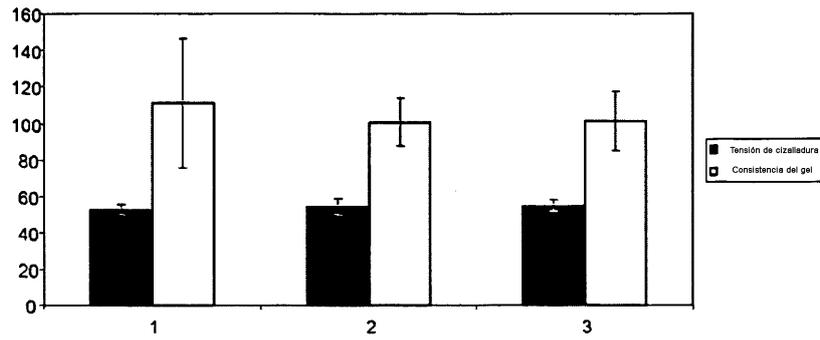


Figura 3

Diacetilo (ppm)

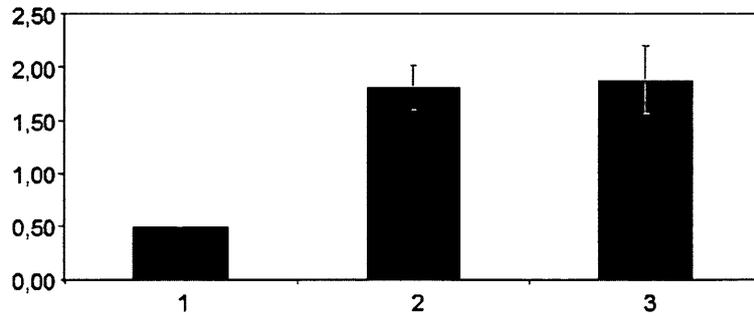


Figura 4

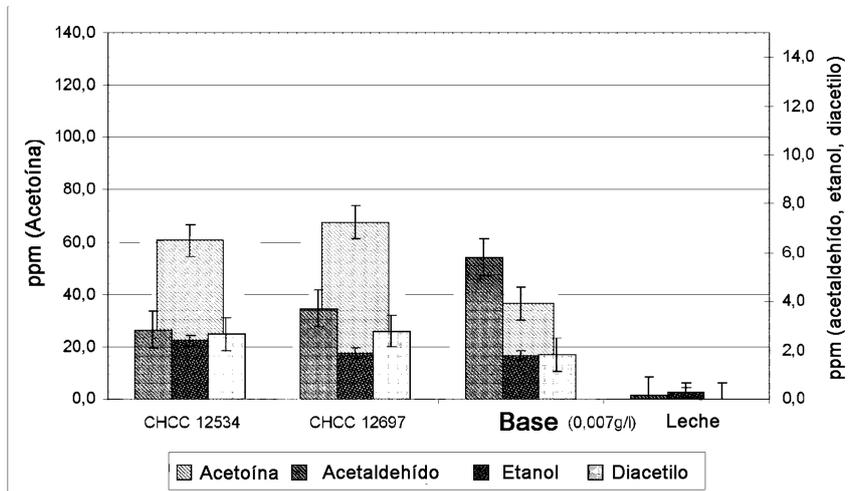


Figura 5

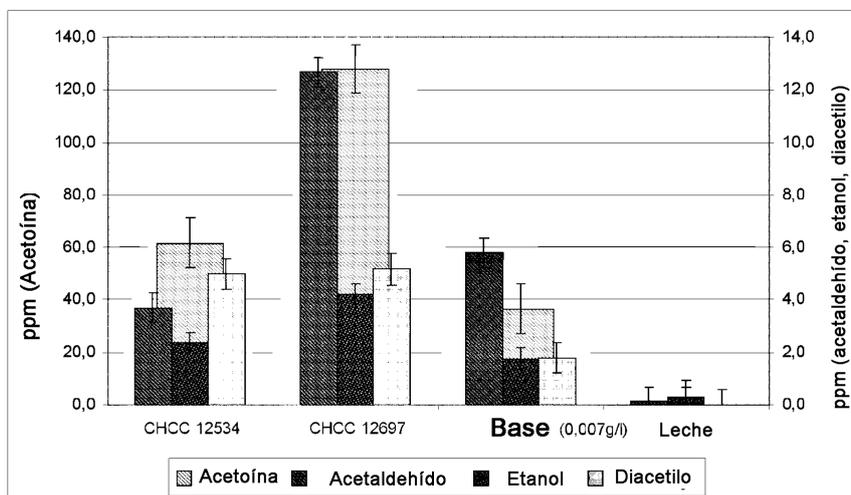


Figura 6

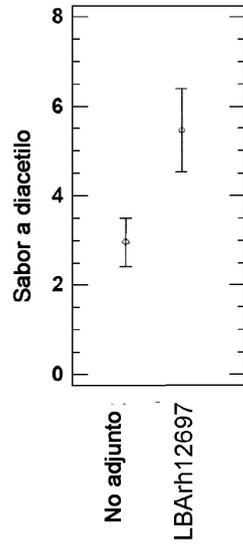


Figura 7

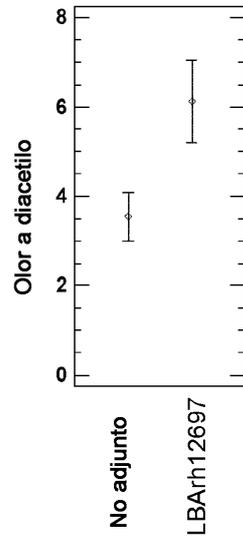


Figura 8

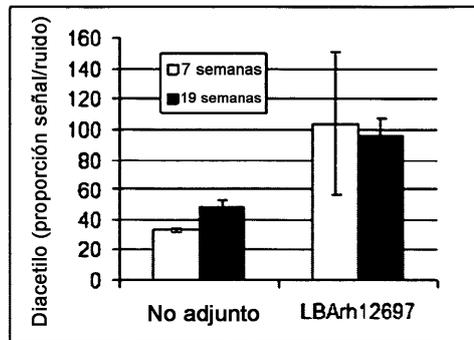


Figura 9