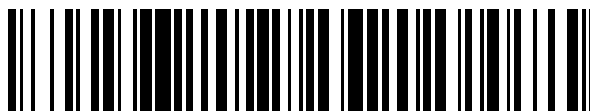


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 422**

51 Int. Cl.:

A23C 19/032 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
C12R 1/13 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
A23C 19/05 (2006.01)
A23C 19/072 (2006.01)
A23C 20/02 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2007 PCT/FR2007/000085**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2007 WO07083021**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2007 E 07717991 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 1986502**

54 Título: **Composición y procedimiento de aromatización de productos lácteos, cepa de bacteria láctica, utilización de dicha composición o cepa**

30 Prioridad:

20.01.2006 FR 0600546

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.07.2017

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1
1411 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**MORNET, ANNIE y
GOODWINS, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 627 422 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

Composición y procedimiento de aromatización de productos lácteos, cepa de bacteria láctica, utilización de dicha composición o cepa

5 La presente invención se refiere a la industria láctea, en particular a la fabricación de productos lácteos, y más particularmente a la fabricación de quesos, principalmente la fabricación de queso de pasta prensada no cocida.

La fabricación de productos lácteos requiere la utilización de diferentes microorganismos que tienen funciones específicas en la tecnología alimentaria.

10 Principalmente, las bacterias lácticas se usan en la acidificación de la leche lo que provoca la fermentación de la leche en cuajada. Las bacterias lácticas se introducen en la leche a fermentar en forma de fermentos, denominados igualmente fermentos de acidificación, cultivos iniciadores o iniciadores.

15 Otros microorganismos son a su vez utilizados para la maduración de los quesos. En este caso, se habla de la flora de maduración o agentes de maduración o incluso de no iniciadores. Estos microorganismos permiten transformar la cuajada de leche en un producto parcialmente lipolisado, proteolisado, enriquecido en compuestos aromáticos. Los compuestos aromáticos son los compuestos que desarrollan el sabor del queso. Están constituidos, por ejemplo, por aminoácidos, ácidos grasos, péptidos aromáticos o compuestos volátiles, tales como ésteres, derivados volátiles cetónicos o sulfurados, etc ... Se entiende por sabor en el presente documento, el conjunto de sensaciones olfativas, gustativas y trigeminales percibidas durante la degustación.

20 Los agentes de maduración comúnmente utilizados son bacterias, por ejemplo bacterias del género *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Igualmente pueden ser levaduras o mohos, como por ejemplo microorganismos del género *Candida*, *Debariomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* o *Penicillium*.

La maduración es de gran importancia para dar sabor al producto lácteo.

25 Sin embargo, la adición de agentes de maduración tradicionales a los fermentos de acidificación es insuficiente en algunos casos para desarrollar el sabor deseado en el producto lácteo. En efecto, los agentes de maduración tradicionales no permiten que se aromatice suficientemente el producto lácteo, en particular cuando la duración de maduración es corta o reducida. En este caso, no se obtiene el perfil aromático buscado y pueden aparecer otros sabores indeseables, como por ejemplo el amargor.

Con el fin de responder a las exigencias de los consumidores y de los industriales, ha llegado a ser indispensable encontrar nuevos microorganismos susceptibles de madurar y aromatizar los productos lácteos.

30 Por otra parte, se conoce la utilización de microorganismos del género *Lactobacillus* de tipo no lítico.

Además, se conoce la utilización de agentes de maduración del género *Brevibacterium* para la aromatización de queso.

Sin embargo, la utilización combinada de estas dos cepas no permite obtener una maduración y una aromatización de los productos lácteos que pueda responder a las exigencias antes mencionadas.

35 El documento EP 0384553 A2 describe la utilización de una cepa de *L. helveticus*, de una cepa de *Brevibacterium linens*, de una cepa de *Geotrichum candidum* y de una cepa de *Debaromyces hansenii* para la fabricación de un queso de tipo "Tilsit".

El documento RU 2260978 describe un fermento que comprende, entre otras, *L. helveticus* y *B. linens*.

40 El documento de Valence et al., *Journal of Dairy Research*, vol 67, pp 261-271, (2000), describe cepas de *L. helveticus* que tienen diferentes propiedades líticas.

La invención tiene por objeto proponer un nuevo medio para aromatizar productos lácteos que presenta numerosas cualidades y que permite desarrollar el sabor deseado a los productos lácteos y esto de manera significativa, rápida y permanente.

45 Para este fin, la invención tiene por objeto una composición para la aromatización de productos lácteos, principalmente quesos, que comprende al menos una combinación de microorganismos, comprendiendo dicha combinación al menos microorganismos de tipo lítico y al menos un agente de maduración, tal como se define en las reivindicaciones.

50 Se entiende por microorganismo de tipo lítico, cualquier bacteria de acidificación o de maduración que presente altas propiedades enzimáticas. En particular, en el presente caso, se trata de microorganismos que liberan, por autólisis, después de un tiempo convencional de maduración, 40% o más de sus enzimas proteolíticas intracelulares en su

medio circundante en condiciones convencionales de utilización (es decir, en condiciones de presión físicas, de salinidad y de pH similares a las presentes en un producto lácteo).

5 Típicamente, para medir el % de enzimas proteolíticas intracelulares liberadas en el medio circundante por autólisis, los expertos en la técnica podrán comparar la actividad intracelular de la dipeptidasa PepD de una cantidad determinada de microorganismos con la actividad enzimática de la dipeptidasa PepD liberada por la misma cantidad de microorganismos en el medio circundante después de 24 horas a 40°C en un medio tamponado a pH 5,8 con tampón de fosfato de potasio 0,1 M.

10 Los agentes de maduración son bacterias del género *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Otros agentes de maduración conocidos son levaduras o mohos, como por ejemplo microorganismos del género *Candida*, *Debariomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* o *Penicillium*.

De hecho, la utilización de microorganismos de tipo lítico en combinación con al menos un agente de maduración para la maduración de productos lácteos permite por una parte potenciar, es decir, aumentar, incluso reforzar, el desarrollo del sabor con relación a una utilización tradicional de microorganismos de la flora de maduración.

15 Típicamente, la relación entre el número de microorganismos de tipo lítico y los agentes de maduración podrá estar comprendida entre 30/70 y 70/30, preferiblemente la relación podrá estar comprendida entre 40/60 y 60/40.

Esta sinergia se manifiesta no sólo por la obtención de una cantidad significativamente mayor de compuestos aromatizantes convencionales en el queso, tales como los del tipo de diacetilo, 2-butanona, acetoina, DMSD (disulfuro de dimetilo), 1-octen-3-ol, DMTS (trisulfuro de dimetilo) y ácido butírico.

20 La acción de los microorganismos de tipo lítico en combinación con un agente de maduración permite además, por sinergia con dicho agente de maduración, promover el desarrollo del sabor por dicho agente de maduración. Principalmente permite con *Brevibacterium linens* producir más compuestos sulfurados.

Además, la utilización de microorganismos de tipo lítico para la maduración de productos lácteos permite disminuir la proporción de compuestos responsables del sabor de tipo amargo.

25 Por último, la utilización de microorganismos de tipo lítico en combinación con un agente de maduración permite la producción de péptidos de pequeño tamaño (inferior a 1 kDa), hidrófilos, que no se producen cuando las diferentes cepas se cultivan independientemente. Esta sinergia permite por tanto la producción de diferentes péptidos que proporcionan nuevos gustos (por ejemplo, del tipo caldo de carne, umami, sabroso) al producto lácteo acabado.

30 Otra ventaja de la presente invención es que el microorganismo de tipo lítico se puede utilizar conjuntamente con las bacterias utilizadas para la acidificación de productos lácteos, es decir con los fermentos de acidificación (por ejemplo del tipo *Lactococcus lactis* y/o *Streptococcus thermophilus*).

Ventajosamente, dicho agente de maduración es un microorganismo del género *Arthrobacter* o *Brevibacterium*, en particular del género *Brevibacterium linens*.

35 La utilización de la combinación de microorganismos del género *Lactobacillus helveticus* de tipo lítico y microorganismos del género *Brevibacterium* permite reforzar el desarrollo del sabor por los microorganismos del género *Brevibacterium*.

Según la presente invención, dicho microorganismo de tipo lítico es la cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 depositada a nombre de Danisco France SAS, 20 rue de Brunel, 75017 París, en la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes) el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3554.

40 En otro modo de realización ventajosa, dicho agente de maduración es la cepa *Brevibacterium* 3306 depositada a nombre de Danisco France SAS, 20 rue de Brunel, 75017 París, en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3556.

45 En otro modo de realización ventajosa, dicho agente de maduración es la cepa *Brevibacterium* 3383 depositada a nombre de Danisco France SAS, 20 rue de Brunel, 75017 París, en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3555.

En un modo de realización particular, dichos microorganismos de tipo lítico y dichos agentes de maduración están mezclados o en forma separada.

Ventajosamente, dichos microorganismos de tipo lítico y dichos agentes de maduración están en forma de una mezcla de cepas liofilizada o congelada, o en forma de cepas acondicionadas por separado.

50 La presente invención tiene igualmente por objeto una cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 depositada a nombre de Danisco France SAS, 20 rue de Brunel, 75017 París, en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3554.

Esta cepa permite potenciar el sabor desarrollado por los agentes de maduración de un producto lácteo.

La presente invención tiene además por objeto un procedimiento de aromatización de un producto lácteo, principalmente un queso de pasta prensada no cocida, que comprende añadir a la leche una composición aromatizante.

5 La adición de una composición aromatizante a la leche proporciona al procedimiento de aromatización de un producto lácteo un ahorro de tiempo ya que permite reducir el tiempo de maduración. Además, permite disminuir la obtención de compuestos responsables de sabores amargos indeseables lo que limita el riesgo de retirada de la venta de los productos lácteos que no cumplen las exigencias de los consumidores.

10 En un modo de realización ventajosa, la concentración de microorganismos de tipo lítico y de los agentes de maduración está comprendida entre 10^4 y 10^8 UFC/g de producto lácteo, preferiblemente alrededor de 10^6 UFC/g de producto lácteo. Típicamente, la relación entre el número de microorganismos de tipo lítico y los agentes de maduración podrá estar comprendida entre 30/70 y 70/30, preferiblemente la relación podrá estar comprendida entre 40/60 y 60/40.

15 En un modo de realización particularmente ventajosa del procedimiento, se añaden los microorganismos de tipo lítico y los agentes de maduración en una proporción de 10^6 a 10^9 UFC por litro de leche, preferiblemente alrededor de 10^8 UFC por litro de leche.

Preferiblemente, la leche es de origen animal.

20 Por último, la invención tiene por objeto la utilización de una composición que comprende una combinación de microorganismos, comprendiendo dicha combinación al menos un microorganismo de tipo lítico y al menos un agente de maduración para la aromatización de productos lácteos, principalmente quesos.

La utilización de dicha composición para la aromatización de productos lácteos permite obtener un producto lácteo significativamente madurado, es decir significativamente madurado con relación a un procedimiento de aromatización convencional. Además, esta utilización permite obtener un producto lácteo madurado que no presenta malos gustos ni malos olores.

25 En un modo de realización ventajosa, dicho agente de maduración utilizado es preferiblemente del género *Brevibacterium*.

30 Ventajosamente, el producto lácteo se selecciona entre quesos de pasta blanda, de pasta prensada no cocida, de pasta cocida, de pasta fresca, de pasta azul, quesos fundidos y «*analogue cheese*» (a base de polvo de caseína y/o proteínas séricas), queso modificado enzimáticamente o «*enzyme modified cheese*», requesón, así como yogur, nata madurada, bebidas lácteas, leche fermentada, un retenido de producto lácteo, un hidrolizado de proteínas vegetales, por ejemplo, de soja, o una leche infantil.

Incluso más ventajosamente, el producto lácteo es de tipo queso de pasta prensada no cocida, y preferiblemente de tipo Gouda o Cheddar.

35 La invención se comprenderá mejor y otros objetos, detalles, características y ventajas de la misma aparecerán más claramente en la descripción explicativa detallada siguiente, y varios modos de realización de la invención dados como ejemplos simplemente ilustrativos y no limitativos, con referencia a las figuras 1 y 2 adjuntas.

La figura 1 representa la comparación del efecto sobre la producción de productos aromáticos utilizando una composición aromatizante de acuerdo con la invención y una composición aromatizante convencional.

40 La figura 2 representa los cromatogramas obtenidos por HPLC de muestras de quesos fabricados y tratados con las cepas *Brevibacterium* 3306, *Brevibacterium* 3383 y la cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210.

La invención se refiere a una composición aromatizante de productos lácteos, principalmente quesos, que comprende al menos una combinación de microorganismos, comprendiendo dicha combinación al menos un microorganismo de tipo lítico y al menos un agente de maduración.

45 Dicho microorganismo de tipo lítico es la cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3554.

Los agentes de maduración son bacterias del género *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Otros agentes de maduración conocidos son levaduras u hongos del género *Candida* o *Debariomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* o *Penicillium*.

50 Ventajosamente, dicha composición comprende además al menos un microorganismo del género *Arthrobacter*, *Brevibacterium* y ventajosamente *Brevibacterium linens*.

El género *Brevibacterium* pertenece a la familia corineformes. Las bacterias que pertenecen a este género son bacterias gram+, heterofermentadoras.

En un modo de realización ventajosa, dicho agente de maduración es la cepa *Brevibacterium* 3306 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3556.

- 5 En otro modo de realización ventajosa, dicho agente de maduración es la cepa *Brevibacterium* 3383 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3555.

En un modo de realización particular, dichos microorganismos de tipo lítico y dichos agentes de maduración están mezclados o en forma separada.

- 10 Ventajosamente, dichos microorganismos de tipo lítico y dichos agentes de maduración están en forma de una mezcla de cepas liofilizada o congelada, o en forma de cepas acondicionadas por separado.

Igualmente se puede añadir por separado del agente de maduración la cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3554.

- 15 La utilización de una composición aromatizante de productos lácteos según la invención se realiza de manera convencional para los expertos en la técnica. En el caso de la fabricación de un producto lácteo, está se realiza de manera habitual en este campo, y principalmente por fermentación de un producto lácteo por incorporación de un fermento.

Principalmente, es posible mezclar, previamente a la siembra del medio que se ha de fermentar, que en este caso es leche, la combinación que comprende al menos un microorganismo de tipo lítico y al menos un agente de maduración directamente con el fermento de acidificación láctico o gran cantidad de levadura.

- 20 Sin embargo es posible incorporar por separado o simultáneamente en el medio que se ha de fermentar, la composición aromatizante que comprende al menos un microorganismo de tipo lítico y al menos un agente de maduración y el fermento láctico.

Los microorganismos de tipo lítico y los agentes de maduración se pueden incorporar, simultáneamente o por separado, en forma seca, liofilizada o congelada.

- 25 La presente invención tiene además por objeto un procedimiento de aromatización de un producto lácteo, principalmente un queso de pasta prensada no cocida, obtenido por un procedimiento que comprende la adición a la leche de una composición aromatizante.

El producto lácteo comprende leche de origen animal y/o vegetal.

Como leche de origen animal, se pueden citar leche de vaca, cabra, oveja, camello, búfala o sus combinaciones.

- 30 Como leche de origen vegetal, se puede citar cualquier sustancia fermentable de origen vegetal que pueda ser utilizada según la invención, principalmente que proceda de granos de soja, arroz, coco o malta.

- 35 En un modo de realización particularmente ventajosa del procedimiento, los microorganismos de tipo lítico y los agentes de maduración se añaden en una proporción de 10^6 a 10^9 UFC por litro de leche, preferiblemente alrededor de 10^8 UFC por litro de leche. Típicamente, la proporción de microorganismos de tipo lítico estará comprendida entre 30 y 70% con relación a la cantidad total de agentes de maduración. De esta forma en el producto lácteo acabado, la concentración de microorganismos de tipo lítico y agentes de maduración está comprendida entre 10^4 y 10^8 UFC/g de producto lácteo, preferiblemente alrededor de 10^6 UFC/g de producto lácteo.

- 40 Ventajosamente, el producto lácteo se selecciona entre quesos de pasta blanda, de pasta prensada no cocida, de pasta cocida, de pasta fresca, de pasta azul, queso fundidos y «*analogue cheese*» (a base de polvo de caseína y/o proteínas séricas), queso modificado enzimáticamente o «*enzyme modified cheese*», requesón, así como yogur, nata madurada, bebidas lácteas, una leche fermentada, un retenido de producto lácteo, un hidrolizado de proteínas vegetales, por ejemplo de soja, o una leche infantil.

Incluso más ventajosamente, el producto lácteo es de tipo queso de pasta prensada no cocida y preferiblemente de tipo Gouda o Cheddar.

- 45 Entre los quesos, se pueden citar entre otros Banon, Bleu d'Auvergne, Brie, Boulette d'Avesnes, Carphilly, Camembert, Cantal, Carré de l'Est, Chanco, Charource, Cheddar, Chesire, Cotija, Coulommiers, Danbo, Dauphin, doble Gloucester, Edam, Emmental, Epoisse, Feta, Gorgonzola, Gouda, Jarisberg, Limberger, Livarot, Mimolette, Manchego, Maroilles, Monterey Jack, Mozzarella, Munster, tipo parmesano, Pelardon, Pont-l'Evêque, Raclette, Red Leicester, Roquefort, Saint-Félicien, Saint-Marcellin, Saint-Nectaire, Saint-Paulin, Stilton, Tilsit, Tomme de Savoie, Vacherin Mont-d'Or y Vieux-Lille.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención aunque sin limitar su alcance.

Preparación de queso de tipo Cheddar:

Se reconstituye leche incorporando a 930 g de leche desnatada en polvo 8,36 L de agua. A continuación, se añade una solución acuosa de cloruro de calcio (Calciol® de Marshall a 500 g/L de agua) a una concentración de 0,35 mL/L de leche reconstituída.

5 El medio de fermentación así preparado está listo para ser inoculado por fermentos de acidificación (Choozit RA073® de Danisco) y o bien una composición aromatizante de acuerdo con la invención (que comprende una cepa de *Lactobacillus helveticus* de tipo lítico LbH 210 asociada a dos cepas del género *Brevibacterium* 3383 y 3306) o bien una composición aromatizante convencional (que comprende una cepa de *Lactobacillus* de tipo no lítico Lb 67 asociada a dos cepas del género *Brevibacterium* 3383 y 3306).

10 Por tanto se utilizan dos cubas de 10 L de tipo Pierre Guerrin®.

A continuación se añade una cantidad de nata (1000 g por cuba) con el fin de obtener 33 gramos de materias grasas por litro de leche. La temperatura se mantiene a 32°C y la velocidad de agitación a 5 (según la cuba de 10 L de tipo Pierre Guerrin®).

15 En la primera cuba, se añaden simultáneamente: la cepa lítica LbH 210 en la proporción de 1×10^8 UFC/L de medio de fermentación, las cepas 3383 y 3306 en la proporción de 1×10^8 UFC/L de medio de fermentación y un fermento de acidificación convencional (Choozit RA073® de Danisco) en la proporción de 2×10^9 UFC/L de medio de fermentación.

20 En la segunda cuba, se añaden simultáneamente: la cepa no lítica Lb67 (depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3553), en la proporción de 2×10^8 UFC/L de medio de fermentación, las cepas 3383 y 3306 en la proporción de 1×10^8 UFC/L de medio de fermentación y un fermento de acidificación convencional (Choozit RA073® de Danisco) en la proporción de 2×10^9 UFC/L de medio de fermentación.

Luego, en cada una de las cubas, la mezcla se somete a continuación a maduración durante 45 minutos con agitación (velocidad 5).

25 El cuajo, que tiene una concentración de 520 mg de quimosina por litro de cuajo, se añade a la mezcla después de la maduración en una proporción de 25 mL por 100 litros de leche. El pH se registra durante la fabricación utilizando un medidor de pH. La coagulación se desarrolla durante 20 a 30 minutos.

Después de la coagulación, la cuajada obtenida se deja reposar 20 minutos y luego se corta. El corte se realiza longitudinal y transversalmente. El conjunto formado por cuajada y suero se calienta de 32°C a 42°C y se somete a una agitación de velocidad 5 durante 120 minutos.

30 El suero que se forma se separa de forma continua.

La cuajada de cada una de las cubas se coloca en dos moldes de 14 cm de diámetro.

A continuación, la cuajada en cada uno de los moldes se corta en trozos iguales (4 a 8) aproximadamente cada 15 minutos para retirar el suero y luego se le da la vuelta.

35 A partir del momento en el que el pH de cada cuajada alcanza 5,2, cada cuajada se corta en pequeños trozos (de menos de un centímetro de diámetro) y se añade 3% de NaCl en masa con respecto a la masa de la cuajada. A continuación se mezcla cada cuajada y se moldea en un molde de 14 cm de diámetro y se prensa sucesivamente a diferentes presiones. La presión ejercida inicialmente es de 1,5 bares durante 30 minutos y luego esta presión se aumenta cada 30 minutos en 0,5 bares. Por último, se mantiene la presión de 3 bares durante una noche.

40 24 horas después de la inoculación, cada cuajada moldeada se pesa y se envuelve en filme transparente a vacío, de manera impermeable.

A continuación, los quesos se conservan a 4°C durante aproximadamente una semana.

45 A continuación, las muestras de queso se someten a un procedimiento de maduración acelerada poniéndolas en suspensión («slurrying»), según el método *IBT standard method PM 4,0*. Se utiliza este método para entender en una escala de tiempo reducida a una semana (en lugar de tres meses para una maduración convencional), los mecanismos bioquímicos de la maduración. En estas condiciones se aceleran los procesos enzimáticos implicados en la maduración.

50 Para esto, se tritura una muestra de 100 g de queso (fabricado con una composición aromatizante de acuerdo con la invención o una composición aromatizante convencional) en 50 mL de agua en presencia de 1 g de citrato trisódico y 300 mg de ácido ascórbico. A continuación, cada mezcla se pone a vacío durante una semana a 30°C con el fin de obtener una suspensión denominada final.

Después se efectuaron ensayos de la suspensión final obtenida.

El primer ensayo consiste en cuantificar la presencia de aminoácidos en cada una de las suspensiones.

Los resultados se dan en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Comparación de la cantidad de aminoácidos obtenida con diferentes composiciones de maduración:

| | <i>Brevibacterium</i> 3306 y 3383 + <i>Lactobacillus helveticus</i> Lb 67 | <i>Brevibacterium</i> 3306 y 3383 + <i>Lactobacillus helveticus</i> LbH 210 |
|---|--|--|
| Cantidad de aminoácidos en mg/g de suspensión final | 10,2 | 10,9 |

5 En presencia de microorganismos líticos, se obtiene una mayor cantidad de aminoácidos y por lo tanto un mayor sabor, estando los aminoácidos fuertemente implicados en el desarrollo del sabor de un producto lácteo.

A continuación, se analiza una muestra de cada una de las suspensiones finales (obtenida con una composición aromatizante de acuerdo con la invención o con una composición aromatizante convencional) por cromatografía de gases (CG) para determinar los componentes volátiles implicados en el desarrollo del sabor de un producto lácteo.

Protocolo de la CG:

10 En un frasco engastable de 10 g se introducen: 3 g de cloruro de sodio Normapur del 99,5%, 5 g de muestra a analizar (en el caso presente 5 g de suspensión denominada "final" y 2 mL de agua ultra pura.

La extracción se realiza en un dispositivo de tipo Headspace HS40XL® de Perkin-Elmer. El tiempo de calentamiento aplicado es 30 minutos, la temperatura de la muestra 60°C, la temperatura de la aguja 80°C y la temperatura de transferencia 100°C.

15 La separación y dosificación se efectúa en un dispositivo de tipo CG Autosystème XL® de Perkin-Elmer. La columna utilizada es del tipo CP-SIL5CB (Varian®), de tipo sílice fundida Wcot 30 m x 0,32 mm (diámetro interno).

La fase estacionaria está constituida por 100% de dimetilpolisiloxano. El espesor de la película es 0,5 µm.

El gas portador es helio con un caudal igual a 1,6 mL/minuto.

20 El ciclo aplicado es el siguiente: 40°C durante 2 minutos y luego 10°C hasta 160°C, y luego 160°C durante 3 minutos.

El detector es un detector de tipo de ionización de llama. La temperatura máxima aplicada es 250°C.

Los resultados se presentan en la figura 1.

La superficie de los picos del cromatograma obtenido se cuantifica según unidades arbitrarias que están representadas en el eje de ordenadas del gráfico de la figura 1.

25 El conjunto de compuestos volátiles es el siguiente: es decir, diacetilo, 2-butanona, acetoina, DMDS, 1-octen-3-ol, DMTS y ácido butírico están presentes en cantidades significativamente mayores cuando se utiliza una composición que incorpora una cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 (cepa lítica) combinada con dos cepas de *Brevibacterium* que cuando se utiliza una composición que incorpora una cepa *Lactobacillus helveticus* Lb 67 (cepa no lítica) combinada con dos cepa de *Brevibacterium*. Estos resultados son tanto más significativos cuando se ha incorporado comparativamente en las muestras una cantidad dos veces mayor de *Lactobacillus helveticus* no lítica que de *Lactobacillus helveticus* lítica.

30

Por último, las diferentes muestras de queso se analizan por cromatografía de líquidos en fase inversa para determinar los compuestos no volátiles implicados en el desarrollo del sabor de un producto lácteo.

35 Las diferentes muestras de queso proceden de quesos fabricados bien con una composición aromatizante que comprende *Lactobacillus helveticus* LbH 210 (cepa lítica) en presencia de *Brevibacterium* 3383 y 3306, o bien únicamente *Lactobacillus helveticus* LbH 210 (cepa lítica), bien únicamente *Brevibacterium* 3383, o bien únicamente *Brevibacterium* 3383.

Protocolo de la HPLC utilizada:

40 5 g de queso de cada muestra previamente pesados se trituran en *Valentin* (sic) en un tubo de 50 mL. El hecho de triturar cada muestra permite optimizar la extracción y obtener una muestra homogénea.

A continuación, se añaden al queso triturado 20 mL de tampón de citrato a pH 3,0. La muestra se homogeneiza luego con un Ultra-Turrax durante 20 segundos. La operación se repite hasta la obtención de una mezcla homogénea. A continuación, el tubo se coloca entonces en un horno a 40°C durante 1 hora. Después de esta etapa,

la materia grasa se encuentra en la superficie. Con el fin de extraerla mejor, se aconseja colocar los tubos en hielo con el fin de congelar la fase grasa.

Una vez que se ha extraído la fase grasa, la muestra se centrifuga a 3000 rpm durante 35 minutos.

Después de centrifugación, los péptidos se encuentran en el líquido sobrenadante.

- 5 Para realizar el análisis por HPLC, es necesario retirar 1 mL de líquido sobrenadante, colocarlo en un tubo Eppendorf® de 1,5 mL y centrifugar a 13.000 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.

10 Después de centrifugación, se retira 1 mL de líquido sobrenadante con ayuda de una jeringa de filtración y se filtra a través de un filtro Acrodisc Nylon 13-0,45 µm, se recupera el filtrado en un tubo de HPLC y se engasta. La muestra está entonces lista para ser analizada por cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa (HPLC en fase inversa) usando un gradiente de agua/acetronitrilo durante un período de 80 minutos utilizando una columna Phenomenex Jupiter® 10 µm C18 de 300 Å 250x4,6 mm.

15 Además, las muestras de queso se fabrican y tratan de una manera similar a las muestras mencionadas anteriormente, con la excepción de que los microorganismos inoculados simultáneamente con el fermento de acidificación son bien cepas *Brevibacterium* 3306, bien cepas *Brevibacterium* 3383 o incluso cepas *Lactobacillus helveticus* LbH 210.

Los resultados se presentan en la figura 2 y en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2: Comparación de la cantidad de ciertos compuestos no volátiles implicados en el sabor del queso de tipo Cheddar en diferentes muestras

| | Superficie de los picos en unidades arbitrarias | | | |
|--------------------------------------|---|----------------------|---------------------|---------------------|
| | 3306 | 3383 | LbH210 | 3306+3383+LbH210 |
| Elución a aproximadamente 17 minutos | 17,594,796 (2 picos) | 17,409,966 (2 picos) | 1,213,530 (2 picos) | 16,662,131 (1 pico) |
| Elución a aproximadamente 18 minutos | 272,259 | 312,993 | 451,919 | 4,650,971 |
| Elución entre 45 y 51 minutos | 28,910,454 | 36,486,252 | 10,075,686 | 2,397,232 |

20 Se obtuvo, en comparación con la utilización de cepas aisladas, con la utilización de la combinación de las cepas *Brevibacterium* 3306 + *Brevibacterium* 3383 + *Lactobacillus helveticus* LbH 210:

- una fuerte disminución de péptidos hidrófobos de gran tamaño (cuyo tiempo de elución está comprendido entre 45 y 51 minutos en la figura 2). Estos péptidos confieren generalmente el amargor al producto lácteo y se deben evitar,
 - una cantidad significativa de péptidos hidrófilos de pequeño tamaño, cuya naturaleza está modificada (se obtiene un solo pico a aproximadamente 17 minutos cuya área es equivalente a la suma de las áreas de los dos picos obtenidos con la utilización por separado de cepas de maduración, en la figura 2). Estos péptidos confieren generalmente sabores apreciados en los productos lácteos (tales como por ejemplo gusto a caldo de carne o gustos sabrosos), y
 - la aparición de péptidos hidrófilos de pequeño tamaño no presentes cuando se utilizan las cepas aisladamente (cuyo tiempo de elución es aproximadamente 18 minutos en la figura 2). Estos péptidos pertenecen a la gama de péptidos que confieren generalmente sabores apreciados en los productos lácteos y que permiten variar o mejorar el sabor obtenido durante la maduración.
- 25
- 30

REIVINDICACIONES

1. Composición aromatizante de productos lácteos que comprende la cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3554 y al menos un agente de maduración seleccionado de bacterias del género *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*.
2. Combinación para la aromatización de productos lácteos que comprende, acondicionados por separado, la cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3554, y al menos un agente de maduración seleccionado entre las bacterias del género *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*.
3. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 o combinación de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque el al menos un agente de maduración es un microorganismo del género *Arthrobacter* o *Brevibacterium*.
4. Composición o combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque el al menos un agente de maduración es de la especie *Brevibacterium linens*.
5. Composición o combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque dicho al menos un agente de maduración es la cepa *Brevibacterium* 3306 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3556.
6. Composición o combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque dicho al menos un agente de maduración es la cepa *Brevibacterium* 3383 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3555.
7. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6, caracterizada porque la cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3554 y dicho al menos un agente de maduración están en forma de una mezcla de cepas liofilizada o congelada.
8. Cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3554.
9. Cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3554 en combinación con fermentos de acidificación del tipo *Lactococcus lactis* y/o *Streptococcus thermophilus*.
10. Procedimiento de aromatización de un producto lácteo, principalmente un queso de pasta prensada no cocida, que comprende la adición a la leche de una composición o una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque la concentración de microorganismos de tipo lítico y agentes de maduración está comprendida entre 10^4 y 10^8 UFC/g de producto lácteo, preferiblemente alrededor de 10^6 UFC/g de producto lácteo.
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, caracterizado porque se añade la cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3554 y los agentes de maduración en una proporción de 10^6 a 10^9 UFC por litro de leche, preferiblemente alrededor de 10^8 UFC por litro de leche.
13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado porque la leche es de origen animal.
14. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado porque la cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3554 y los agentes de maduración se añaden simultáneamente o por separado.
15. Utilización de una composición de microorganismos que comprende al menos la cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3554 y al menos un agente de maduración seleccionado entre las bacterias del género *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* para la aromatización de productos lácteos, principalmente quesos.
16. Utilización de una combinación que comprende, acondicionados por separado, al menos la cepa *Lactobacillus helveticus* LbH 210 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006 con el número CNCM 1-3554 y al menos un agente de maduración seleccionado entre bacterias del género *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* para la aromatización de productos lácteos, principalmente quesos.

17. Utilización de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, caracterizada porque dicho al menos un agente de maduración es del género *Brevibacterium*.

5 18. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizada porque el producto lácteo se selecciona entre quesos de pasta blanda, quesos de pasta prensada no cocida, de pasta cocida, de pasta fresca, de pasta azul, quesos fundidos y « analogue cheese », y queso modificado enzimáticamente, requesón así como yogur, nata madurada, bebidas lácteas, una leche fermentada, un retenido de producto lácteo, un hidrolizado de proteínas vegetales o una leche infantil.

19. Utilización de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizada porque el producto lácteo es de tipo queso de pasta prensada no cocida y preferiblemente de tipo Gouda o Cheddar.

10

FIGURA 1

Superficie de los picos en unidades arbitrarias

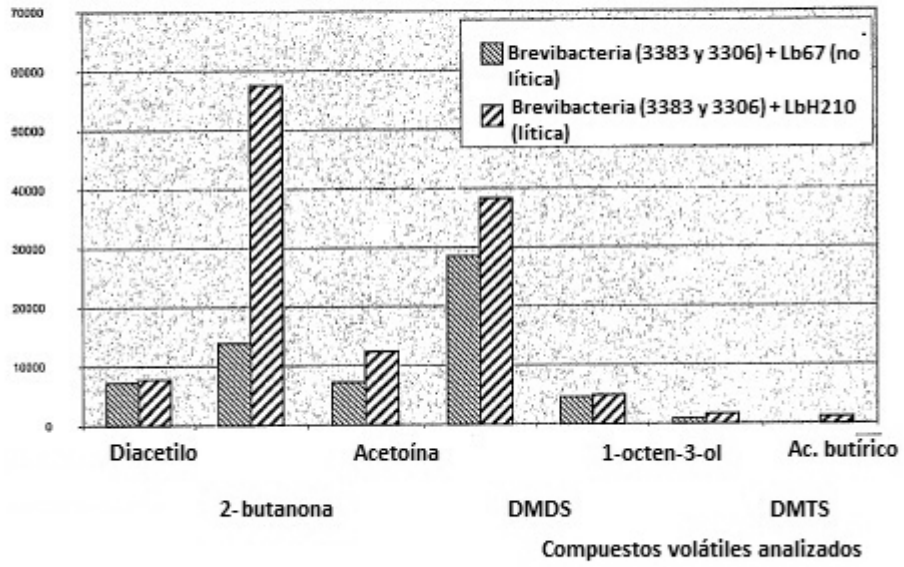


FIGURA 2

