

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 815**

51 Int. Cl.:

A23C 9/123 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2007 PCT/EP2007/056252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2007 WO07147890**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2007 E 07786806 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2034847**

54 Título: **Bacterias ácido lácticas con post-acidificación reducida**

30 Prioridad:

23.06.2006 EP 06115993

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

30.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BANG SIEMSEN JENSEN, NIELS y
JOHANSEN, ANNETTE HELLE**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 644 815 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

Bacterias ácido lácticas con post-acidificación reducida

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a bacterias ácido lácticas que tienen propiedades de post-acidificación bajas o reducidas, y a un método para suministrar dichas bacterias. Además, la invención se refiere al uso de tales bacterias para la fabricación de productos lácteos fermentados, y a productos lácteos que contienen las bacterias.

Antecedentes de la invención

[0002] Las cepas de la especie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* son componentes esenciales de los cultivos bacterianos usados para la producción de leches fermentadas y yogures en particular. Dichas cepas normalmente producen ácido láctico durante el tiempo de conservación de los productos lácteos fermentados con los cultivos bacterianos de los cuales las cepas son un componente. A este fenómeno frecuentemente se le denomina "post-acidificación". Tales cepas normalmente no contribuyen a la textura aumentada de los productos lácteos obtenidos por fermentación con los cultivos bacterianos de los cuales las cepas son un componente.

[0003] Según la legislación en la mayoría de países de la UE, los cultivos iniciadores para utilizar en la producción de yogur deben estar compuestos por cepas del tipo *Lactobacillus bulgaricus* y cepas del tipo *Streptococcus thermophilus*. Además, la acidificación de la leche tiene lugar más rápido cuando los cultivos iniciadores están compuestos por ambos tipos de cepas, en comparación con solamente un único tipo de cepa.

[0004] Una tendencia en el mercado de las leches fermentadas son los productos con un desarrollo de acidez que va de moderada a inexistente durante el tiempo de conservación (post-acidificación baja) y una textura (o viscosidad) elevada. Al seleccionar cepas del tipo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para usar o bien solas o como componente de un cultivo para la producción de leche fermentada y yogur, el desarrollador del producto tiene que elegir entre las cepas conocidas que tienen la siguiente combinación de propiedades:

- baja post-acidificación y baja potencia texturizante; o
- alta post-acidificación y baja potencia texturizante; o
- alta post-acidificación y alta potencia texturizante,

ya que no existe ninguna cepa *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que combine de manera satisfactoria un perfil de post-acidificación baja y un perfil de texturización alta.

[0005] Con el uso de cualquiera de las cepas conocidas anteriores, el producto de leche fermentada tendrá un alto grado de post-acidificación o una textura baja, resultante del uso del cultivo bacteriano. Las productoras de lácteos suelen elegir trabajar con cultivos en los que las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* combinan una post-acidificación baja y una textura baja. Para aumentar la textura del producto de leche fermentada, añaden agente(s) espesante(s) a la base de leche antes de que la fermentación tenga lugar.

45 Resumen de la invención

[0006] El problema al que se enfrenta la persona experta es proporcionar cepas alternativas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que combinen un perfil de post-acidificación baja y un perfil de texturización alta, lo que hace que la adición de agentes espesantes sea superflua. Varios científicos han tratado de obtener tales cepas, pero sin éxito. En Möller et al. (2001) la mutagénesis química (con el mutágeno MNNG (N-metil-N-nitroso-N-nitroguanidina)) de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (cepa de Visby 231) se realiza para obtener mutantes con una menor post-acidificación. La cepa mutagenizada se colocó en placas manualmente y las colonias se transfirieron manualmente a placas de microtitulación que contenían leche. Después de la incubación se midió el pH pocillo por pocillo para aproximadamente 2000 aislados usando un microelectrodo. Se aislaron cuatro mutantes con pH final más alto que la cepa madre. La mutagénesis y selección por cribado descritas no dio como resultado ninguna mutante con textura alta y post-acidificación baja.

[0007] Los presentes inventores han demostrado sorprendentemente que sí es posible proporcionar tales cepas, y han desarrollado un método para suministrar tales cepas, dicho método que difiere del método de Möller et al (2001) en que los presentes inventores usan cepas de alta texturización como cepas madre y en que se usa un mutágeno débil. Al realizar el método de la invención, los presentes inventores han identificado sorprendentemente cepas que tienen propiedades de texturización mejoradas con respecto a sus cepas madre. De este modo, los presentes inventores han concebido un método para desarrollar cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que contribuyen sustancialmente a una textura aumentada de los productos lácteos obtenidos por fermentación por una cepa de la invención, o por cultivos bacterianos de los cuales una cepa de la invención es un componente, sin post-acidificar significativamente los productos lácteos.

[0008] Los productos lácteos resultantes se caracterizan por un moderado sabor agradable y menos agrio que los productos conocidos previamente.

5 Descripción detallada

[0009] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que se selecciona del grupo consistente en: CHCC10019 (DSM19252); CHCC8535 (DSM 18144); y CHCC7159 (DSM 17959); y mutantes de las mismas que tienen sustancialmente las mismas propiedades post-acidificantes y texturizantes.

[0010] Una forma de realización del primer aspecto es una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que:

- 15 a) produce menos ácido cuando está presente en un producto lácteo fermentado (por ejemplo, durante el almacenamiento) que otras cepas altamente texturizantes de la misma especie; y/o
- b) aumenta la textura del producto lácteo fermentado con la cepa a un nivel más alto que las cepas post-acidificantes de la misma especie.

[0011] Formas de realización interesantes de dicha cepa son una cepa que

- 25 a) tiene un pH, medido en un ensayo estándar (ensayo para la determinación de las propiedades de post-acidificación) en el rango de 4.25-4.55 (por ejemplo en el rango de 4.30-4.55; o en el rango de 4.35-4.55) después de 14 días y/o después de 21 días y/o después de 28 días de almacenamiento; y
- b) tiene una propiedad de texturización, medida en Pa utilizando el ensayo para la determinación de la viscosidad, de no menos de 25 (por ejemplo de no menos de 30; no menos de 35; no menos de 39; no menos de 42; no menos de 44; no menos de 45; no menos de 46; no menos de 47; no menos de 48; o no menos de 50);

o una cepa que

- 35 a) reduce el pH, medido en un ensayo estándar (ensayo para la determinación de las propiedades de post-acidificación) en menos de 0,30 unidades de pH (por ejemplo menos de 0,20 unidades de pH) después de 14 días de almacenamiento; y
- b) tiene una propiedad de texturización, medida en Pa utilizando el ensayo para la determinación de la viscosidad, de no menos del 25 (por ejemplo de no menos de 30; no menos de 35; no menos de 39; no menos de 42; no menos de 44; no menos de 45; no menos de 46; no menos de 47; no menos de 48; o no menos de 50);

o una cepa que

- 45 a) reduce el pH, medido en un ensayo estándar (ensayo para la determinación de las propiedades de post-acidificación) en menos de 0,20 unidades de pH (por ejemplo menos de 0,15; menos de 0,11; menos de 0,08; menos de 0,07; menos de 0,06; menos de 0,05; menos de 0,04; menos de 0,03; o incluso menos de 0,02 unidades de pH) a 8 grados C después de 7 días de almacenamiento; y
- b) tiene una propiedad de texturización, medida en Pa utilizando el ensayo para la determinación de la viscosidad, de no menos de 25 (por ejemplo no menos de 30; no menos de 35; no menos de 39; no menos de 42; no menos de 44; no menos de 45; no menos de 46; no menos de 47; no menos de 48; o no menos de 50).

[0012] Por el término "reduce el pH" debería entenderse la reducción del pH respecto al punto de partida, es decir, un pH de 4.55. Una reducción de por ejemplo 0,30 unidades de pH significa que el pH resultante es 4.25. En dos formas de realización interesantes, la producción de ácido reducida no se debe a una inactivación significativa o completa de la actividad de beta galactosidasa; y/o no debido a una inactivación significativa o completa de la actividad de lactato deshidrogenasa. Mediante el término "no debido a una inactivación significativa" se entiende una reducción de la actividad inferior al 30% (por ejemplo inferior al 20% o incluso inferior al 10%).

[0013] En este momento se prefiere una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que se selecciona del grupo consistente en: CHCC10019 CHCC8535 y CHCC7159 y mutantes de cualquiera de estas que tienen sustancialmente las mismas propiedades de post-acidificación y texturización, y la más preferida es la cepa CHCC7159 o una mutante de la misma que tiene sustancialmente las mismas propiedades de post-acidificación y texturización. En el presente contexto, el término "mutante de la misma" debería entenderse como una cepa derivada de una cepa de la invención mediante, por ejemplo, ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico. Se prefiere que la mutante sea una mutante equivalente funcionalmente, por ejemplo una mutante que tiene sustancialmente las mismas propiedades de post-acidificación y texturización que la cepa madre. Tal

mutante forma parte de la presente invención. Especialmente, el término "mutante de la misma" se refiere a una cepa obtenida sometiendo una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de la invención (tal como CHCC10019; CHCC8535; CHCC7159; CHCC3984; CHCC3606 o CHCC5713) a cualquier tratamiento de mutagenización usado de forma convencional, incluyendo un tratamiento con un mutágeno químico tal como etano metano sulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o una mutante de origen espontáneo. La cepa mutante preferiblemente debería cumplir al menos una de las combinaciones a) y b) anteriores. Aunque en este momento se prefiere proporcionar la cepa por mutagénesis aleatoria o por selección de mutantes de origen espontáneo, es decir, sin el uso de técnicas de ADN recombinante, se prevé que se pueda proporcionar mutantes de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mediante tal tecnología, incluyendo técnicas de mutagénesis dirigida y PCR y otras modificaciones *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN. El término "sustancialmente la misma propiedad de post-acidificación" preferiblemente debería entenderse en el sentido de que el valor de pH puede variar hasta +/- 0,1 unidades de pH (por ejemplo 0,05, 0,01, o 0,00 unidades) respecto a la cepa madre, y el término "sustancialmente la misma propiedad de texturización" debería entenderse preferiblemente en el sentido de que el valor de Pa puede variar hasta 20% (por ejemplo hasta 10% o hasta 5%) y/o +10/-2 unidades (por ejemplo +5; +3, +/-2, +/-1,0, +/-0,5 o 0,0 unidades) respecto a la cepa madre.

[0014] En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para suministrar una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que produce menos ácido cuando está presente en un producto lácteo fermentado (por ejemplo, durante el almacenamiento del producto acabado) en comparación con una cepa madre y que tiene una propiedad de texturización, medida en Pa utilizando el ensayo para la determinación de la viscosidad, de no menos de 25 y, el método comprende tratar una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (la cepa madre), donde la cepa madre se selecciona del grupo consistente en: CHCC3984 (DSM19251); CHCC3606 (DSM18142) y CHCC5713 (DSM18143); y mutantes de cualquiera de estas que tienen sustancialmente las mismas propiedades de post-acidificación y texturización, con un mutágeno (preferiblemente un mutágeno moderado o débil), tal como un mutágeno seleccionado del grupo consistente en: etil metano sulfonato (por ejemplo 1%); ácido nitroso (por ejemplo 0,05 M); metil metano sulfonato (por ejemplo 20 mM); nitrosoguanidina (por ejemplo 25 µM); e ICR-170 mostaza de acridina (por ejemplo 5 µg/ml), o con radiación, tal como con rayos X (por ejemplo 2000 r/min); o rayos UV (por ejemplo 600 erg/mm² por min). Actualmente se prefiere el mutágeno EMS (etil metano sulfonato).

[0015] Actualmente se prefiere que la cepa madre sea una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que es altamente texturizante en crecimiento en leche, pero también es altamente post-acidificante, tal cepa se selecciona de entre las cepas que tienen las propiedades siguientes:

a) propiedad de texturización alta, tal como una cepa que, medida utilizando el ensayo para la determinación de la viscosidad, tiene un Pa de no menos de 25 (tal como no menos de 30; no menos de 35; no menos de 39; no menos de 42; no menos de 44; no menos de 45; no menos de 46; no menos de 47; no menos de 48; o no menos de 50); y

b) propiedad de post-acidificación alta, tal como una cepa que reduce el pH, medida en un ensayo estándar (ensayo para la determinación de las propiedades de post-acidificación) como superior a 0,20 (por ejemplo superior a 0,30 o 0,40, o incluso superior a 0,50) unidades de pH después de 7 días de almacenamiento.

[0016] Ejemplos de tales cepas son CHCC3984, CHCC3606 y CHCC5713, y mutantes de cualquiera de estas (tales como mutantes equivalentes funcionales, por ejemplo mutantes que tienen sustancialmente las mismas propiedades de post-acidificación y texturización). Todas estas cepas, al igual que las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que se pueden obtener mediante el método de la invención, forman parte de la presente invención.

[0017] En una forma de realización interesante, el método de la invención comprende además:

incubar mutantes individuales en un medio (por ejemplo en placas indicadoras de pH; en placas de microtitulación que contienen medio por ejemplo suplementado con un indicador de pH; o en tubos de ensayo que contienen un medio por ejemplo suplementado con un indicador de pH); y seleccionar una mutante del medio con un pH final significativamente más alto tras la incubación que la cepa madre.

[0018] Convenientemente, el pH se mide por un electrodo de pH, o utilizando un indicador de pH tal como púrpura de bromofenol/verde de bromofenol, y el medio es leche, por ejemplo medio estándar.

[0019] En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la invención para la fabricación de un producto lácteo fermentado, tal como un yogur.

[0020] La invención también se refiere a un método para la fabricación de un producto lácteo, que comprende la mezcla de una cepa según la invención con leche, así como un producto lácteo obtenible mediante el método. Los productos lácteos resultantes se caracterizan por un sabor moderado agradable y menos agrio que los

productos conocidos previamente.

[0021] En otro aspecto, la invención se refiere a un producto lácteo obtenible mediante un método que comprende mezclar una cepa según la invención con leche, donde dicho producto lácteo contiene la cepa. Se proporciona un método para la propagación de una bacteria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que comprende mezclar una cepa de la invención, o una composición que comprende dicha cepa, con un medio de crecimiento, tal como leche (por ejemplo, medio estándar).

[0022] En otro aspecto más, la invención se refiere a un producto lácteo que contiene bacterias de la invención.

[0023] En un último aspecto, se proporciona una composición que se puede utilizar para la fermentación de leche, que comprende una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la invención. Un ejemplo de tal composición es un cultivo iniciador que, además de la cepa de la invención, contiene otras cepas o aditivos para la conservación. La composición puede ser en forma seca, liofilizada, congelada o líquida.

Definiciones

[0024] En el presente contexto, el término "leche" incluye leche sin grasa, leche baja en grasa, leche entera, leche sin lactosa (producida hidrolizando la lactosa mediante la enzima lactasa en glucosa y galactosa, u otro método), leche concentrada o leche en polvo. La leche sin grasa es un producto de leche no grasa o desnatada. La leche baja en grasa se define típicamente como leche que contiene de aproximadamente de 1% a aproximadamente 2% de grasa. La leche entera normalmente contiene un 2% de grasa o más. Como se utiliza en este caso, el término "leche" también abarca leches de fuentes animales y vegetales. Las fuentes animales de leche incluyen, pero de forma no limitativa, leche humana, de vaca, oveja, cabra, búfala, camella, llama, yegua y cierva. Las fuentes vegetales de leche incluyen, pero de forma no limitativa, leche extraída de soja o avena. Además, el término "leche" se refiere no solo a leche entera, sino también a leche desnatada o a cualquier componente líquido derivado de ésta.

[0025] Por el término "cepa de texturización alta" debería entenderse una cepa que, cuando se usa para inocular un medio estándar en una proporción de 1×10^5 - 1×10^6 ufc/g, a una temperatura de incubación de 43°C, hasta un pH de 4.55, contribuye a una tensión de cizallamiento de la leche fermentada superior a 25 Pa cuando se evalúa instrumentalmente 20 horas después del fin de la fermentación/coagulación como se describe en "Ensayo para la determinación de la viscosidad". Por el contrario, por el término "cepa de texturización baja" debería entenderse una cepa que, cuando se usa para inocular un medio estándar en una proporción de 1×10^5 - 1×10^6 ufc/g, a una temperatura de incubación de 43°C, hasta un pH de 4.55, contribuye a una tensión de cizallamiento de la leche fermentada inferior a 25 Pa cuando se evalúa instrumentalmente 20 horas después del fin de la fermentación/coagulación como se describe en el ensayo para la determinación de la viscosidad.

[0026] Por el término "cepa de acidificación alta" debería entenderse una cepa que, cuando crece conforme al "Ensayo para la determinación de las propiedades de post-acidificación", reduce el pH en más de 0,20 unidades de pH después de 7 días de almacenamiento (el pH baja de 4.55 a 4.35 o más). Por el contrario, por el término "cepa de acidificación baja" debería entenderse una cepa que, cuando crece conforme al "Ensayo para la determinación de las propiedades de post-acidificación" reduce el pH en no más de 0,20 unidades de pH después de 7 días de almacenamiento (el pH baja de 4.55 a 4.35 o a un valor de pH en el rango de pH 4.55 a 4.35, ambos límites incluidos). Por el término "medio estándar" debería entenderse leche reconstituida a partir de polvo de leche desnatada, con un contenido de materia seca del 9,5%, y que se ha sometido a tratamiento térmico a 99 grados C durante 15 minutos en un proceso discontinuo.

[0027] El uso de los términos "un/a" y "el/la/los/las" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se debe interpretar teniendo en cuenta que cubre el singular y el plural, a menos que se indique lo contrario de manera explícita o el contexto lo contradiga claramente. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, con el significado de "que incluye, pero no está limitado a") a menos que se especifique lo contrario. La enumeración de rangos de valores en este documento está meramente destinada a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado decreciente dentro del rango, a menos que se indique lo contrario de manera explícita, y cada valor separado se incorpora a la especificación como si hubiera sido mencionado individualmente. Todos los métodos aquí descritos se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquier ejemplo y de todos los ejemplos, o de expresiones de ejemplificación (por ejemplo, "tal(es) como"), proporcionados en este documento está destinado meramente a aclarar más la invención y no plantea una limitación del alcance de la invención a menos que se indique lo contrario. Ninguna expresión de la especificación se debe interpretar como indicativa de que un elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

Leyendas de las figuras

[0028]

La Figura 1 representa un gráfico de pH vs tiempo a 43°C de la cepa mutante CHCC8535 y la cepa madre CHCC5713. Cf. Ejemplo 1.

La Figura 2 representa un gráfico de pH vs tiempo a 43°C de la cepa mutante CHCC7159 y la cepa madre CHCC3606. Cf. Ejemplo 1.

La Figura 3 representa la media de la tensión de cizallamiento medida en tres muestras independientes producidas con cepas diferentes del tipo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Las barras de error abarcan 2 desviaciones estándar respecto a las medias. Cf. Ejemplo 1.

La Figura 4 representa un gráfico de pH vs tiempo a 43°C de la cepa mutante CHCC10019 y la cepa madre CHCC3984. Cf. Ejemplo 2.

La Figura 5 representa la media de la tensión de cizallamiento medida en tres muestras independientes producidas con la cepa mutante CHCC10019 y la cepa madre CHCC3984. Las barras de error abarcan 2 desviaciones de estándar respecto a las medias. Cf. Ejemplo 2.

Ejemplos

Métodos generales

[0029] Según un método de la invención, una cepa madre de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que tiene propiedades de texturización alta y propiedades de post-acidificación alta se trata con un mutágeno químico. Se realiza un cribado de las cepas resultantes para encontrar mutantes con propiedades de post-acidificación baja, y luego se realiza un cribado de las mutantes para encontrar propiedades de texturización alta. El método se describe con mayor detalle más adelante:

Ensayo para la determinación de la viscosidad (propiedades texturizantes)

[0030] Se usan concentrados congelados de la cepa para inocular 200 mL de leche reconstituida a partir de polvo de leche desnatada (el medio estándar). La leche tenía un contenido de materia seca del 9,5% y se había sometido a un tratamiento térmico a 99°C durante 15 minutos en un proceso discontinuo a presión ambiente. Los concentrados congelados de *Lactobacillus bulgaricus* típicamente muestran un contenido en células de entre $1 \cdot 10^9$ y $1 \cdot 10^{10}$ ufc/g.

El índice de inoculación fue de 1g de concentrado por 10L de leche, por lo tanto entre $1 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^6$ UFC/mL de leche. La incubación se produjo a 43°C hasta que el pH llegó a 4.55, en cuyo punto se había producido la coagulación de la leche. La leche fermentada luego se enfrió a 5°C bajo agitación periódica (colocándola en un baño de hielo durante 20 minutos, y luego en un frigorífico).

[0031] 20 horas después de alcanzar el pH 4.55, la leche fermentada se puso a 13°C y se agitó suavemente con una varilla equipada con un disco perforado (diámetro = 3 cm) hasta lograr la homogeneidad de la muestra. La agitación consistió en 20 movimientos hacia arriba y hacia abajo de la varilla en la muestra. Las propiedades reológicas de la muestra se evaluaron a 13°C en un reómetro (StressTech, Reologica Instruments, Suecia) equipado con un sistema de medición coaxial de copa/peso (CC25).

[0032] La prueba de viscosimetría se realizó con índices de cizallamiento variables de 0,27 a 300 1/s en 21 pasos. Los índices de cizallamiento se aumentaron y luego disminuyeron y las curvas ascendente y descendente de tensión de cizallamiento y viscosidad aparente se registraron. Los tiempos de retraso, integración y equilibrio fueron de 5 s, 10 s y 5 min, respectivamente. Para un análisis ulterior se eligió una tensión de cizallamiento a 300 s⁻¹.

[0033] La tensión de cizallamiento se mide en unidades Pa. Por definición, la viscosidad es igual a la tensión de cizallamiento dividida entre la velocidad de cizallamiento. La viscosidad y la tensión de cizallamiento son, por lo tanto, directamente proporcionales y expresan las mismas propiedades siempre que los valores de tensión de cizallamiento se determinen a una velocidad de cizallamiento fija de 300 1/s.

Ensayo para la determinación de las propiedades de post-acidificación

[0034] Los concentrados congelados de la cepa se usan para inocular 200 mL de leche reconstituida a partir de polvo de leche desnatada (el medio estándar). La leche tenía un contenido de materia seca del 9,5% y se había sometido a un tratamiento térmico a 99°C durante 15 minutos en un proceso discontinuo.

[0035] Los concentrados congelados de *Lactobacillus bulgaricus* típicamente muestran un contenido en células de entre $1 \cdot 10^9$ y $1 \cdot 10^{10}$ ufc/g. El índice de inoculación fue de 1g de concentrado por 10L de leche, por lo tanto entre $1 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^6$ UFC/mL de leche. La incubación se produjo a 43°C hasta que el pH llegó a 4.55, en cuyo punto se había producido la coagulación de la leche. La leche fermentada luego se enfrió a 5°C bajo agitación periódica (colocándola en un baño de hielo durante 20 minutos, y luego en un frigorífico). El pH de la leche fermentada enfriada se midió utilizando un electrodo de pH, apropiadamente después de 1, 7, 14, 21 y 28 días

de almacenamiento.

Método para la preparación del medio estándar

5 [0036] Disolución del polvo de leche desnatada (Arla Ingredients, Dinamarca - polvo de leche de calor medio Milex 240) en agua durante no más de 30 min. El objetivo para la preparación de leche es una materia seca de 9,5 % (p/p).

[0037] La leche debería ser esterilizada mediante el siguiente perfil de temperatura:

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Calentamiento	->99±1	<20
Esterilización	99±1	15±1
Enfriamiento	99±1->40±5	<40

[0038] Posteriormente, la leche debería almacenarse a <7 °C. La leche no debería usarse antes del día siguiente.

15 Propagación de las bacterias

[0039] Se conocen cepas de la especie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que aumentan la textura de leches fermentadas, y que post-acidifican. Tales cepas se usan preferiblemente como cepas madre. Las cepas bacterianas de ácido láctico normalmente se añaden a la leche que se desea fermentar como solución líquida, como polvo liofilizado o como gránulos congelados. El recuento bacteriano del líquido, polvo y gránulos puede variar de 1E⁶ a 1E¹² unidades formadoras de colonias por gramo (1·10⁶ a 1·10¹² ufc/g), aplicando técnicas estándar de recuento celular. El líquido, polvo o gránulos se añaden normalmente a niveles de alrededor del 0,0005-1% a la leche.

25 Mutagénesis

[0040] La bacteria, tal como de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que proporciona una textura alta al crecer en la leche, pero también tiene una alta post-acidificación, se mutageniza químicamente, preferiblemente con un mutágeno moderado, por ejemplo con EMS (etil metano sulfonato). El EMS da lugar a sustituciones de pares de bases aleatorias en el material genético (el cromosoma y plásmidos) de la bacteria mutagenizada. Después de la mutagénesis, los cultivos mutagenizados se colocan en placas en medios.

[0041] Protocolo preferido: las cepas madre se inocularon a partir de existencias congeladas en caldo MRS (Difco) durante 24 horas a 37°C, anaeróticamente. Para la mutagénesis, después de una noche los cultivos se agitaron en vórtex a velocidad máxima durante 1 minuto para separar cadenas putativas de células y se trataron con EMS (10 ml/ml) durante 2 horas a 37 °C. El tratamiento con EMS resultó en más del 99% de la destrucción de las células. Los cultivos tratados con EMS se congelaron a -80 °C en glicerol al 20% y esta materia se usó para los cribados.

40 Cribado

[0042] Varios miles de colonias se escogieron de forma aleatoria por un robot seleccionador de colonias y se colocaron en placas de microtitulación con 200 microL de leche, por ejemplo suplementadas con un indicador de pH (tal como púrpura de bromofenol/verde de bromofenol). Cada uno de los pocillos de las placas de microtitulación corresponde a una fermentación de leche modelo. El pH de la leche en los pocillos que contienen mutantes se compara con los correspondientes pocillos que contienen la cepa de tipo salvaje (una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que confiere una textura alta al crecer en leche, pero también tiene una post-acidificación alta, tal como las cepas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC3984, CHCC3606 y CHCC5713). Se identifican mutantes con un pH final de la leche después de acidificaciones a 43 °C significativamente más alto que las cepas tipo salvaje, por ejemplo por análisis colorimétrico (utilizando un indicador de pH) o utilizando un electrodo de pH. Las acidificaciones a mayor escala (200 ml) se realizan registrando el pH en un sistema de registro con electrodos de pH estándar para verificar que las mutantes den lugar a una menor post-acidificación.

[0043] Para controlar que las mutantes obtenidas tengan el mismo potencial texturizante que la cepa madre, se fermentaron muestras de leche con las mutantes y las cepas madre hasta alcanzar los mismos valores de pH final y las propiedades reológicas de las leches fermentadas obtenidas se evaluaron y se compararon por técnicas estándar.

60 Ejemplo 1: preparación y propiedades de las cepas de LB CHCC7159 y CHCC8535

[0044] CHCC7159 y CHCC8535 son bacterias ácido lácticas de tipo *Lactobacillus bulgaricus*. Estas cepas son

capaces de acidificar la leche en condiciones industrialmente pertinentes y se caracterizan por una post-acidificación baja. La cepa CHCC7159 es una mutante obtenida de CHCC3606, a la que se comparó. CHCC8535 es una mutante de CHCC5713, a la que se comparó. La mutagénesis (protocolo preferido) y el cribado se efectuaron como se ha descrito anteriormente.

5

[0045] Se usaron concentrados congelados de CHCC7159, CHCC8535, CHCC3606 y CHCC5713 para inocular 200 mL de leche reconstituida a partir de polvo de leche desnatada. La leche tenía un contenido de materia seca del 9,5% y se había sometido a tratamiento térmico a 99°C durante 15 minutos en un proceso discontinuo. Los concentrados congelados de *Lactobacillus bulgaricus* típicamente muestran un contenido en células de entre $1 \cdot 10^9$ y $3 \cdot 10^{10}$ ufc/g. El índice de inoculación fue 1g de concentrado por 10L de leche, por lo tanto entre $1 \cdot 10^5$ y $3 \cdot 10^6$ UFC/mL de leche. La incubación se produjo a 43°C hasta que el pH llegó a 4.55, punto en el que la coagulación de la leche se había producido. Luego la leche fermentada se enfrió a 5°C.

10

[0046] Un gráfico pH vs tiempo muestra que CHCC8535 alcanzó el pH 4.60 en menos de 20 horas, lo que demuestra que las cepas son capaces de acidificar leche bajo condiciones de inoculación e incubación que son pertinentes industrialmente (Figura 1).

15

[0047] Un gráfico pH vs tiempo muestra que CHCC7159 alcanzó el pH 4.60 en alrededor de 21 horas, lo que demuestra que las cepas son capaces de acidificar leche bajo condiciones de inoculación e incubación que son pertinentes industrialmente (Figura 2).

20

[0048] CHCC7159 y CHCC8535 fueron a lo largo de toda la fermentación menos acidificantes que sus cepas madre respectivas. CHCC8535 mostró un pH después de 20 horas de 4.17, que era 0,32 unidades de pH superior a la cepa madre. CHCC7159 mostró un pH después de 20 horas de 4.64, que era 0,50 unidades de pH superior a la cepa madre.

25

CHCC7159 Y CHCC8535 son capaces de generar una textura elevada en una leche fermentada

[0049] El día después de la incubación, la leche fermentada se puso a 13°C y se agitó suavemente mediante una varilla equipada con un disco perforado hasta lograr la homogeneidad de la muestra. Las propiedades reológicas de la muestra se evaluaron en un reómetro (StressTech, Reologica Instruments, Suecia) equipado con un sistema de medición coaxial C25. La prueba de viscosimetría se realizó con índices de cizallamiento variables de 0,27 a 300 1/s en 21 pasos. Los índices de cizallamiento se aumentaron y luego disminuyeron y las curvas ascendente y descendente de tensión de cizallamiento y viscosidad aparente se registraron. Los tiempos de retraso, integración y equilibrio fueron de 5 s, 10 s y 5 min, respectivamente. Para un análisis ulterior se eligió una tensión de cizallamiento a 300 s-1. Las leches fermentadas incubadas con concentrados de CHCC7159 y CHCC8535 eran más texturizantes que las leches fermentadas producidas con sus respectivas cepas madre (Figura 3). Los valores de tensión de cizallamiento registrados fueron de media 45 y 55 Pa para las dos cepas mutantes, mientras fueron de alrededor de 40 Pa o menos para las cepas madre.

30

35

40

Conclusión

[0050] Las cepas CHCC7159 y CHCC8535 combinan las propiedades siguientes:

45

- son capaces de generar una textura alta en una leche fermentada - superior a 40 Pa bajo las condiciones experimentales evaluadas
- son capaces de acidificar leche hasta pH 4.60 en menos de 24 horas
- alcanzan un pH después 20 horas que es superior a 4.15 bajo las condiciones experimentales evaluadas

50

Ejemplo 2: preparación y propiedades de la cepa de LB CHCC10019

[0051] CHCC10019 es una bacteria ácido láctica de tipo *Lactobacillus bulgaricus*. CHCC10019 es capaz de acidificar leche bajo condiciones pertinentes industrialmente y se caracteriza por una post-acidificación baja. La cepa CHCC10019 es una mutante obtenida de CHCC3984, a la que se compara. La mutagénesis y el cribado se efectuaron como se ha descrito anteriormente ("protocolo preferido"). El mutágeno utilizado fue EMS.

55

[0052] Se prepararon cultivos CHCC10019 y CHCC3984 para crecimiento durante una noche mediante la inoculación de 10 mL leche reconstituida a partir de de polvo de leche desnatada.

60

La leche tenía un contenido de materia seca del 9,5% y se había sometido a un tratamiento térmico a 99°C durante 15 minutos en un proceso discontinuo.

Se tomó material biológico de ampollas congeladas de las cepas respectivas.

La incubación se produjo a 37°C durante 24 horas.

65

[0053] Los cultivos de CHCC10019 y CHCC3984 en crecimiento durante una noche se usaron para inocular 200 mL de leche reconstituida a partir de polvo de leche desnatada (medio estándar). La leche usada fue la misma

que se ha descrito anteriormente. El índice de transferencia fue del 1%. Para cada cepa se incubaron dos botellas de leche. Se usó una botella para obtener una curva de acidificación; la segunda botella se usó para obtener producto para determinar las propiedades reológicas.

5 [0054] Los cultivos de *Lactobacillus bulgaricus* en crecimiento durante una noche típicamente muestran un contenido en células de entre $1 \cdot 10^6$ y $1 \cdot 10^8$ ufc/g. El índice de inoculación fue de 1g de cultivo en crecimiento durante una noche por 100 g de leche, por lo tanto entre $1 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^6$ UFC/mL leche.

10 [0055] La incubación se realizó a 43°C durante 20 horas. Una segunda botella preparada bajo las mismas condiciones se incubó a 43°C hasta que el pH alcanzó 4.55, momento en el que la coagulación de la leche se había producido. Esta botella se enfrió hasta 5°C hasta que se realizó el análisis de las propiedades reológicas el día siguiente.

15 [0056] Un gráfico pH vs tiempo muestra que CHCC10019 alcanzó un pH 4.50 en alrededor de 7h 30min, lo que demuestra que la cepa es capaz de acidificar leche bajo condiciones de inoculación e incubación, que son pertinentes industrialmente, véase la figura 4.

20 [0057] A lo largo de toda la fermentación, CHCC10019 fue menos acidificante que su cepa madre. CHCC10019 mostró un pH de 4.22 después de 20 horas, que era 0,64 unidades de pH superior a la cepa madre.

CHCC10019 es capaz de generar una textura elevada en una leche fermentada

25 [0058] El día tras la incubación, la leche fermentada se puso a 13°C y se agitó suavemente mediante una varilla equipada con un disco perforado hasta lograr la homogeneidad de la muestra. Las propiedades reológicas de la muestra se evaluaron como se describe en el ejemplo 1. Para los resultados, véase la figura 5. Las leches fermentadas incubadas con CHCC10019 eran más texturizantes que las leches fermentadas producidas con CHCC3984. Los valores de tensión de cizallamiento registrados fueron de media 45 Pa para la cepa mutante, mientras que fueron de alrededor de 35 Pa para las cepas madre.

30 [0059] CHCC7159 se depositó el 8 de febrero de 2006 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) y recibió el número de registro DSM 17959. CHCC3606, CHCC5713 y CHCC8535 se depositaron el 30 de marzo de 2006 en DSM y recibieron los números de registro DSM 18142, DSM 18143, y DSM 18144, respectivamente. CHCC10019 y CHCC3984 se depositaron el 3 de abril de 2007 y recibieron los números de registro DSM 19252 y DSM 19251, respectivamente. Todos los depósitos se hicieron según el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes.

35 [0060] En este documento se describen formas de realización preferidas de esta invención, incluyendo el mejor modo conocido para que los inventores lleven a cabo la invención. Puede que a los expertos en la técnica se les ocurran variaciones de esas formas de realización preferidas al leer la descripción precedente. Los inventores esperan que los expertos empleen tales variaciones según sea apropiado, y es la intención de los inventores que la invención se ponga en práctica de formas distintas a las específicamente descritas en este documento. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del objeto nombrado en las reivindicaciones anexas del presente documento según lo permita la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de la misma están incluidos por la invención a menos que se indique lo contrario aquí o que el contexto lo contradiga claramente.

Referencias

50 [0061]

Möller, C., Bockelmann, W., y K. J. Heller, 2001. Isolierung von *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mutanten zur herstellung eines joghurts mit milder geschmackscharakteristik. Kieler Milchwirtschaftliche forchungsberichte 53,167-185.

55 WO2006/063142

EP518096A1

EP638642A

US5545554A

60 [0062] Guide To Short-Term Tests For Detecting Mutagenic And Carcinogenic Chemicals. Prepared for the IPCS by the International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. OMS, 1985. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc51.htm>

REIVINDICACIONES

1. Método para suministrar una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que tiene una propiedad de texturización, medida en Pa utilizando el ensayo para la determinación de la viscosidad, de no menos de 25 y que produce menos ácido cuando está presente en un producto lácteo fermentado en comparación con una cepa madre, método que comprende tratar una cepa madre de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* con un mutágeno, preferiblemente EMS, donde la cepa madre se selecciona de entre las cepas que tienen las propiedades siguientes:
- a) propiedad de texturización alta; y
b) propiedad de post-acidificación alta;
- y donde la cepa madre se selecciona del grupo consistente en: CHCC3984 depositada como DSM19251; CHCC3606 depositada como DSM18142 y CHCC5713 depositada como DSM18143 y mutantes de cualquiera de estas que tengan sustancialmente las mismas propiedades de post-acidificación y texturización.
2. Método según la reivindicación 1, donde el mutágeno es un mutágeno moderado o débil.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde la cepa madre se selecciona entre las cepas que tienen las propiedades siguientes:
- a) propiedad de texturización alta, medida en Pa utilizando el ensayo para la determinación de la viscosidad, de no menos de 25; y
b) propiedad de post-acidificación alta, es decir, una cepa que reduce el pH, medida en un ensayo estándar tal como el ensayo para la determinación de las propiedades de post-acidificación, en más de 0,20 unidades de pH después de 7 días de almacenamiento.
4. Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que se selecciona del grupo consistente en: CHCC10019 depositada como DSM19252; CHCC8535 depositada como DSM 18144 y CHCC7159 depositada como DSM 17959 y mutantes de las mismas que tienen sustancialmente las mismas propiedades de post-acidificación y de texturización.
5. Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la reivindicación 4, que:
- a) produce menos ácido cuando está presente en un producto lácteo fermentado, por ejemplo durante el almacenamiento, que una cepa de texturización alta de la misma especie; y/o
b) aumenta la textura del producto lácteo fermentado con la cepa a un nivel más alto que una cepa de post-acidificación baja de la misma especie.
6. Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la reivindicación 4 o 5, que se puede obtener mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y que tiene una propiedad de texturización, medida en Pa utilizando el ensayo para la determinación de la viscosidad, de no menos de 25.
7. Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que
- a) reduce el pH, medido en un ensayo estándar tal como el ensayo para la determinación de las propiedades de post-acidificación, a un valor en el rango de 4.25-4.55 después de 14 días de almacenamiento; y
b) tiene una propiedad de texturización, medida en Pa utilizando el ensayo para la determinación de la viscosidad, de no menos de 25.
8. Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que
- a) reduce el pH, medido en un ensayo estándar tal como el ensayo para la determinación de las propiedades de post-acidificación, en menos de 0,30 unidades de pH después de 14 días de almacenamiento; y
b) tiene una propiedad de texturización, medida en Pa utilizando el ensayo para la determinación de la viscosidad, de no menos de 25.
9. Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, que
- a) reduce el pH, medido en un ensayo estándar tal como el ensayo para la determinación de las propiedades de post-acidificación, en menos de 0,20 unidades de pH a 8 grados C después de 7 días de almacenamiento; y
b) tiene una propiedad de texturización, medida en Pa utilizando el ensayo para la determinación de la viscosidad, de no menos de 25.
10. Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, que se

ES 2 644 815 T3

selecciona del grupo consistente en: CHCC10019 depositada como DSM19252; CHCC8535 depositada como DSM 18144; y CHCC7159 depositada como DSM 17959; y mutantes de cualquiera de estas, que

- 5 a) reducen el pH, medido en un ensayo estándar tal como el ensayo para la determinación de las propiedades de post-acidificación, en menos de 0,20 unidades de pH a 8 grados C después de 7 días de almacenamiento; y
- b) tienen una propiedad de texturización, medida en Pa utilizando el ensayo para la determinación de la viscosidad, de no menos de 25.
- 10 11. Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, que es CHCC7159 o una mutante de la misma que tiene las mismas propiedades de post-acidificación y texturización.
- 15 12. Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* seleccionada del grupo consistente en CHCC3984 depositada como DSM19251; CHCC3606 depositada como DSM 18142 y CHCC5713 depositada como DSM 18143; y mutantes de cualquiera de estas, que tiene una propiedad de texturización, medida en Pa utilizando el ensayo para la determinación de la viscosidad, de no menos de 25.
- 20 13. Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la reivindicación 12, seleccionada del grupo consistente en CHCC3984 depositada como DSM19251; CHCC3606 depositada como DSM 18142 y CHCC5713 depositada como DSM 18143; y mutantes de cualquiera de estas que tienen sustancialmente las mismas propiedades de post-acidificación y texturización.
- 25 14. Producto lácteo obtenible mediante un método que comprende mezclar una cepa según la reivindicación 4 a 11 con leche, donde dicho producto lácteo contiene la cepa.
- 30 15. Producto lácteo que contiene bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11.
16. Uso de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11 para la producción de productos lácteos fermentados.

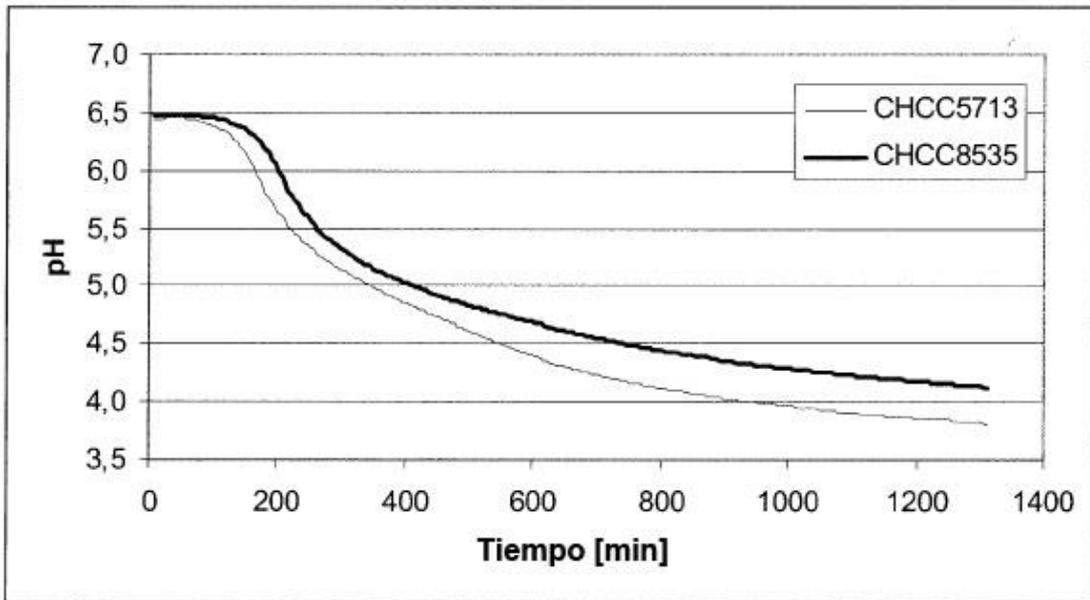


Fig. 1

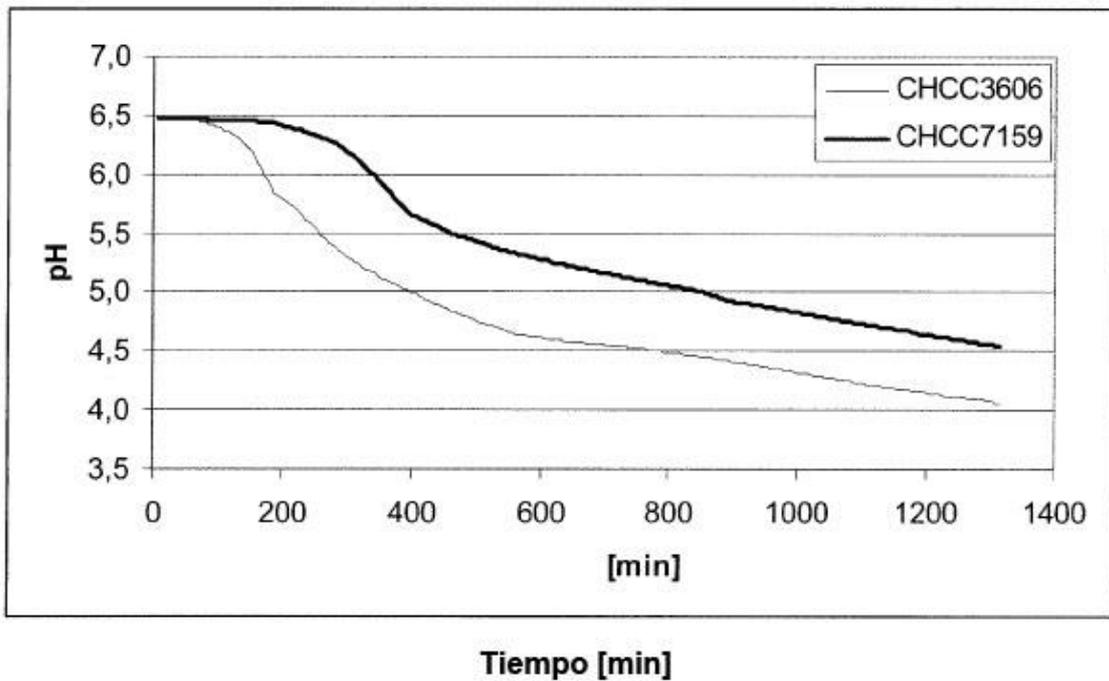


Fig. 2

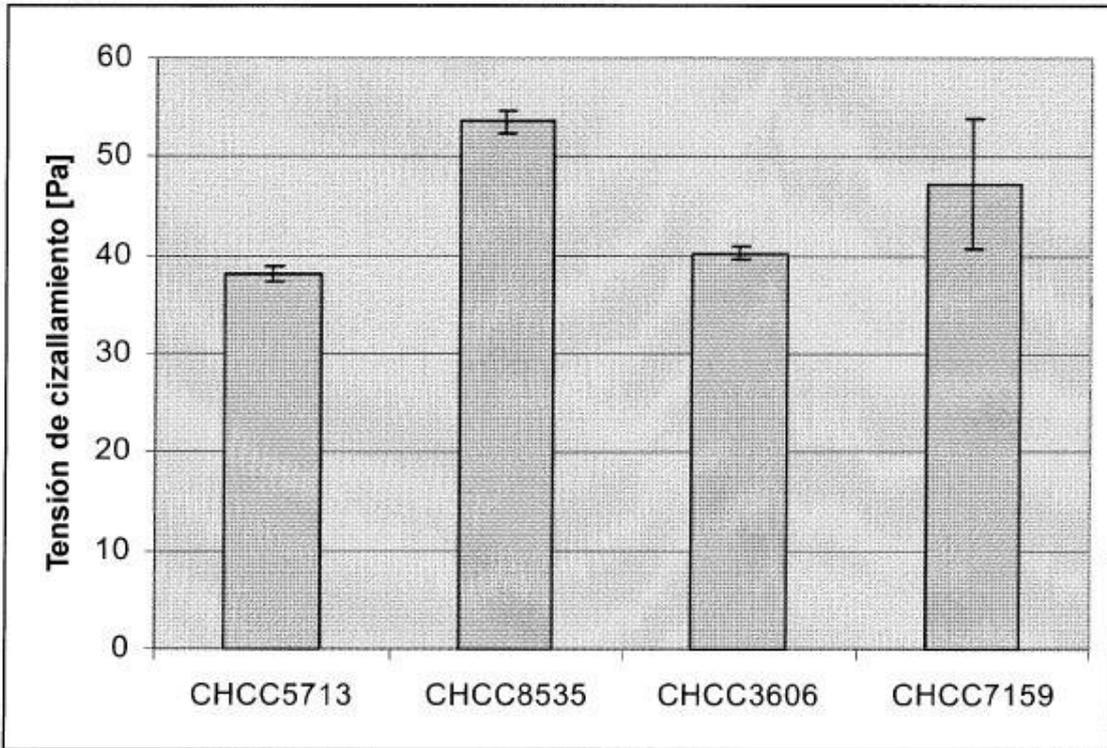


Fig. 3

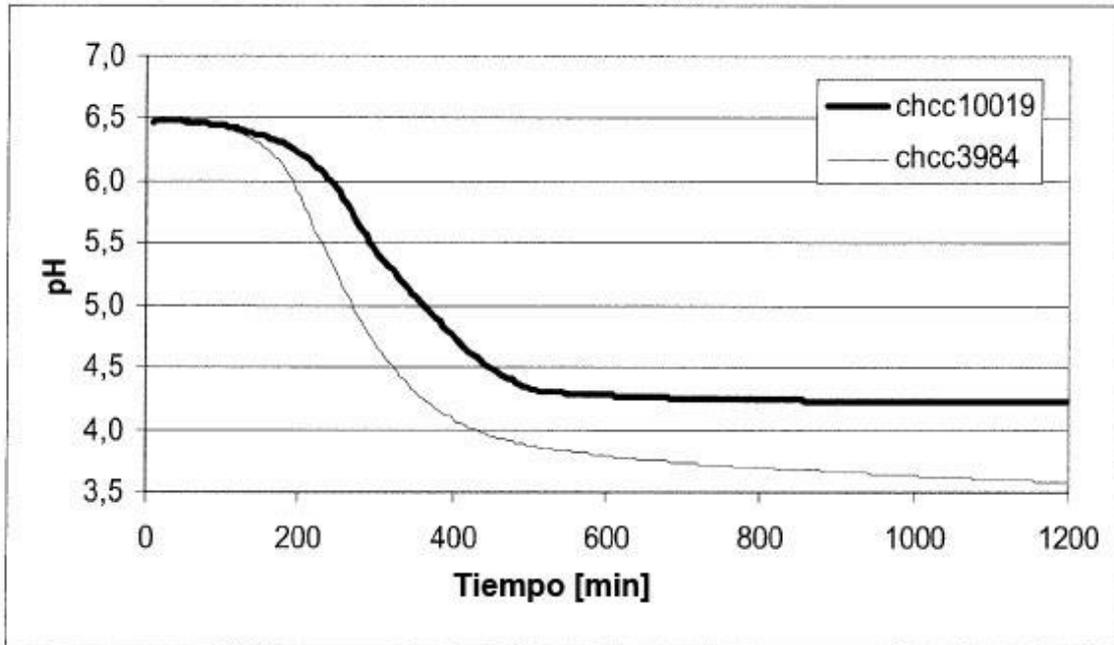


Fig. 4

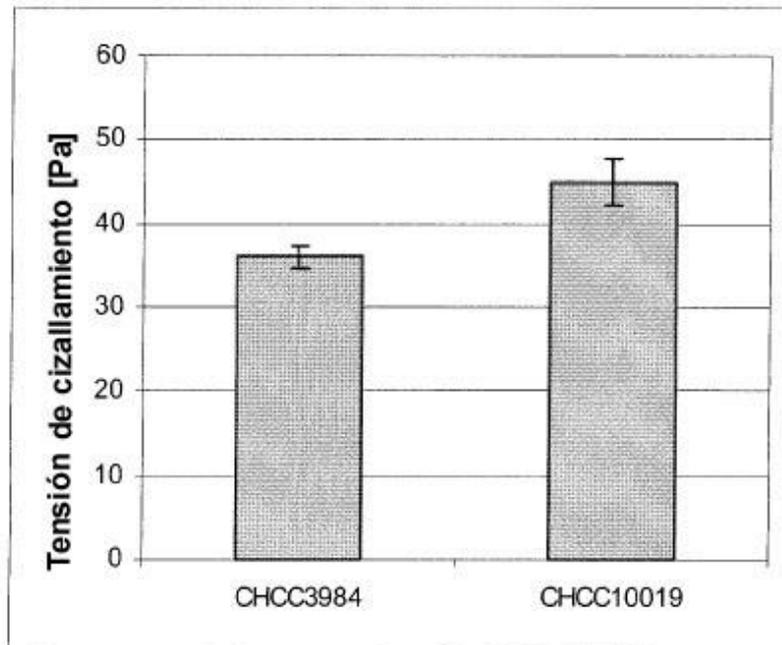


Fig. 5