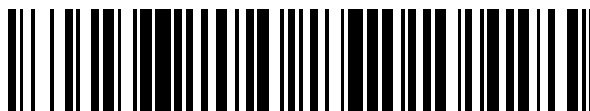


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 069**

51 Int. Cl.:

A23C 3/03 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

A23C 19/05 (2006.01)

A23C 19/097 (2006.01)

A23C 19/032 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2007 PCT/IB2007/003555**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2008 WO08084289**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2007 E 07825703 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2117327**

54 Título: **Método para preparar una leche para aplicaciones lácteas de leche, leche obtenida mediante dicho método y usos de la misma**

30 Prioridad:

20.12.2006 IT MI20062451

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

23.02.2018

73 Titular/es:

**MOFIN S.R.L. (100.0%)
VIA PIETRO CUSTODI, 12
28100 NOVARA, IT**

72 Inventor/es:

MOGNA, GIOVANNI

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 656 069 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

Método para preparar una leche para aplicaciones lácteas de leche, leche obtenida mediante dicho método y usos de la misma

5 La presente invención se refiere a un método, denominado proceso de Mofinazione, para preparar una leche prevista para aplicaciones lácteas de leche, a la leche obtenida con dicho método y a los usos de la misma. Dicho método incluye un tratamiento térmico oportuno de la leche, seguido de una maduración previa referente a la adición y al desarrollo dentro de dicha leche de cepas bacterianas oportunas seleccionadas para este propósito, en particular cepas con un valor probiótico.

10 Se sabe que la coagulación es la base del proceso de caseación que conduce a la formación de queso, yogur y otros productos lácteos.

15 El fenómeno de coagulación consiste en una modificación estructural de las micelas de caseína que se unen entre sí para formar agregados debido a la acción del calor, la acidificación y, como consecuencia, de una acción enzimática.

20 La coagulación de la leche debida al calentamiento térmico se debe principalmente a la desnaturalización de las proteínas séricas que se agregan entre sí y se complejan sucesivamente con la caseína formando coprecipitados a temperaturas por encima de 70 °C.

25 Por el contrario, la coagulación ácida se debe a la agregación de las micelas de caseína debido a la pérdida de fosfato de calcio de las propias micelas; la reducción del pH para el aumento de concentración de ácidos dentro de la leche provoca la protonación/neutralización de las funciones de caseína con carga negativa.

30 Esto provoca una disminución del potencial zeta (un parámetro determinante para la estabilidad de los sistemas dispersados y definido como el valor de potencial eléctrico que puede registrarse en la superficie de la doble capa eléctrica que habitualmente está alrededor de cualquier partícula dispersada en un líquido) lo que, a su vez, aumenta la solubilización de las sales de calcio.

Dicho fenómeno induce un paso progresivo de calcio desde el fosfocaseinato de calcio de la micela de caseína hasta la matriz acuosa de la leche.

35 A valores de pH de entre 5,7 y 5,8, el 50 % del calcio coloidal se pasa a la disolución, mientras que a un pH = 4,6 (punto isoeléctrico de la caseína) la desmineralización de la caseína es completa y por tanto la desestabilización de las micelas de caseína, que se agregan conduciendo a la formación de coágulos, es la mayor.

40 La coagulación enzimática de la leche tiene lugar mediante la adición de sustancias, generalmente definidas como "coagulantes de la leche" que pueden ejercer una acción hidrolítica sobre la caseína k, con una desestabilización relativa de las micelas de caseína, lo que fomenta la agregación de las propias micelas para dar la formación de un gel denominado "cuajada".

La maduración de la cuajada se realiza mediante:

- 45 - enzimas coagulantes;
- enzimas producidas por bacterias lácticas usadas durante el procesamiento;
- 50 - enzimas residuales típicas de la leche fresca;
- enzimas producidas por microorganismos que contaminan la leche.

55 Dicha maduración determina generalmente las características estructurales y organolépticas de los diferentes quesos listos para su uso.

Estas últimas representan una variable no controlada y, hasta ahora, una variable incontrolable tanto en cuanto al número como a la topología.

60 Dicho complemento enzimático resultante de la flora bacteriana que contamina la leche puede afectar de una manera absolutamente negativa a las características organolépticas de los diferentes quesos producidos.

65 La coagulación enzimática también puede definirse como coagulación de "cuajo", ya que desde tiempos inmemoriales en el proceso de caseación se usan el "cuajo" o la cuajada, que es una preparación enzimática de origen animal constituida por el extracto natural de abomaso bovino, ovino y caprino, preparado según métodos conocidos tradicionales. Las principales enzimas coagulantes que existen en el cuajo son renina y pepsina.

La coagulación de cuajo es ciertamente el tipo más usado para la fabricación de quesos en todo el mundo.

El efecto coagulante de las enzimas puede dividirse esquemáticamente en tres etapas sucesivas: la primera etapa consiste en el ataque enzimático sobre la caseína micelar con hidrólisis del enlace fenilalanina-metionina (en la posición 105-106 de la estructura primaria de la caseína k) y conduce al desprendimiento de un glicopéptido de caseína fuertemente hidrófilo; la segunda etapa consiste en la formación de enlaces hidrófobos y puentes salinos de fosfato de calcio entre las micelas de caseína desestabilizadas. De hecho, las moléculas de caseína que ya no están protegidas por el glicopéptido se dañan mutuamente y, gracias al calcio existente en forma iónica dentro de la leche, comienzan a unirse entre sí produciendo el fenómeno de floculación; la tercera etapa sigue a la floculación y consiste en un refuerzo de la red de caseína mediante la formación de un número cada vez mayor de enlaces de diferente naturaleza.

Dentro de la matriz de caseína, que constituye la estructura de soporte del gel caseoso, la parte sérica permanece atrapada.

Durante la tercera etapa, el gel se vuelve siempre más espeso tras el aumento de enlaces intermicelares; las micelas se aproximan unas a otras y el coágulo se contrae provocando la expulsión del suero. Este fenómeno, también denominado drenaje o sinéresis, se ve acelerado por el corte de la cuajada, el aumento de la temperatura y el aumento de la acidez (con una reducción relativa del pH) producido por bacterias lácticas que, al desarrollarse, transforman rápidamente la lactosa en ácido láctico. Solo las dos primeras etapas descritas anteriormente determinan la coagulación real, concretamente el paso de la caseína del estado de suspensión coloidal al estado de gel, mientras que la tercera etapa consiste esencialmente en la gelación de toda la masa de leche y el comienzo de fenómenos proteolíticos no específicos en otros sitios de la caseína k y en caseínas α_s y β .

La velocidad y el transcurso de la floculación y la gelación siguiente afectan en un grado determinante a las características reológicas de la cuajada con referencia a la elasticidad, textura, permeabilidad y contractilidad del coágulo y por consiguiente la capacidad de sinéresis del suero.

Varios factores afectan a las etapas anteriormente descritas, en particular las dos primeras etapas.

La duración de la primera etapa (también denominada "tiempo de floculación") depende de la temperatura, que debe ser, dentro de límites razonables, próxima a la óptima para la eficacia catalítica de la enzima; la concentración de la enzima total, calcio y fósforo; los índices de acidez libre (pH); la estructura terciaria y cuaternaria de la caseína (lo que puede facilitar o bloquear el acceso de la enzima a los sitios de ataque).

Las características de la segunda etapa (gelación) dependen principalmente de la concentración de proteína y caseína, la concentración de los iones de calcio y fosfato libres; la acidez libre (concretamente, el pH) y la temperatura que aumenta la velocidad de las reacciones.

El desarrollo de estas dos etapas puede seguirse y evaluarse por medio de un equipo denominado lactodinamógrafo, gracias al cual puede medirse el tiempo de floculación (o "endurecimiento") correspondiente a la primera etapa y el grado de la gelación correspondiente a la segunda etapa.

Por tanto, es posible establecer por adelantado si las características de la leche que está examinándose son tales como para hacerla adecuada para la caseación. Por tanto, dicho lactodinamógrafo permite determinar el tiempo de coagulación y la consistencia del coágulo de leche. Se proporciona información referente a dicha técnica, por ejemplo, en el "Trattato di tecnologia casearia" de Ottavio Salvadori del Prato, Ed. Agricole, 1998, páginas 203-205.

La aptitud de la leche a la coagulación de cuajo, es decir, su reactividad frente al cuajo, constituye por tanto, junto con su aptitud fermentativa, concretamente la tendencia al crecimiento de las bacterias lácticas, un parámetro fundamental para una transformación láctea correcta y óptima.

El tratamiento térmico de mejora al que debe someterse necesariamente la leche antes de su uso industrial es un factor particularmente delicado. De hecho, si se lleva a cabo a temperaturas demasiado altas y/o durante tiempos excesivamente prolongados, dicho tratamiento reduce notablemente la aptitud a la coagulación de la leche y, por consiguiente, la calidad de los productos lácteos resultantes de la misma.

Dicho tratamiento térmico de mejora de la leche se lleva a cabo habitualmente mediante pasteurización o esterilización.

Según lo que se conoce habitualmente, la pasteurización es un tratamiento de mejora térmico con el propósito principal de eliminar los microorganismos patógenos existentes en la leche, así como reducir en gran medida una gran parte de la flora microbiana restante, tal como levaduras, bacterias coliformes y microorganismos denominados generalmente "antilácteos", ya que son responsables de defectos estructurales y/u organolépticos de los productos lácteos de leche obtenidos a partir de dicha leche.

En realidad, en los últimos años se ha encontrado que algunas especies microbianas patógenas, tales como por ejemplo determinadas cepas del género *Listeria*, pueden sobrevivir a dicho tratamiento.

5 En algunos casos, derivados lácteos de leche fuertemente contaminados por *Listeria monocytogenes*, todavía existente tras la pasteurización tradicional de la leche, han determinado acontecimientos de mortalidad en los consumidores.

10 Habitualmente, la pasteurización consiste en calentar la leche a una temperatura por debajo de su punto de ebullición durante un tiempo oportuno. La leche pasteurizada puede estar destinada tanto a la dieta humana como a la transformación láctea; aquella para un uso como alimento tiene habitualmente una vida útil de almacenamiento de 6 días en condiciones refrigeradas.

Normalmente, dicha pasteurización incluye las siguientes etapas:

- 15 - etapa de precalentamiento, a una temperatura de entre 40 °C y 45 °C;
- etapa de homogenización, en la que la leche sale desde una boquilla a alta presión [15 MPa-20 MPa (150-200 bar)] rompiendo por tanto coágulos de grasa y eliminando la tendencia a la formación de nata en superficie;
- 20 - etapa de desgasificación, en la que se eliminan las burbujas de aire llevando la leche a 45° a un vacío parcial;
- etapa de pasteurización real, que puede ser de dos clases: baja y lenta, o alta y rápida; en el primer caso, se lleva la leche a una temperatura de 63 °C durante aproximadamente 30 min, en el segundo caso a una temperatura de entre 72 °C y 75 °C durante 10-20 segundos;
- 25 - etapa de enfriamiento, hasta una temperatura que depende del procedimiento tecnológico.

Por el contrario, la esterilización es un procedimiento que puede destruir cualquier forma microbiana, vegetativa o en forma de esporas, así como las formas víricas, entre las que se encuentran los bacteriófagos.

30 Dicho procedimiento se usa cuando es necesario almacenar la leche durante 3-6 meses a temperatura ambiente.

El procedimiento tecnológico más comúnmente usado es la UHT (ultraalta temperatura), realizado a 140-144 °C durante 2-4 segundos.

35 La esterilización, debido a las altas temperaturas alcanzadas por la leche durante el procedimiento, provoca la alteración de algunos componentes de la misma, en particular proteínas y azúcares, comprometiendo, en cada caso, su aptitud a la coagulación natural.

40 En conclusión, la purificación de leches previstas para transformación láctea se lleva a cabo ahora exclusivamente mediante pasteurización de un tipo tradicional (a una temperatura de entre 72 °C y 75 °C durante 10-20 segundos), el único tratamiento adecuado para el mantenimiento de la aptitud a la coagulación natural de la leche fresca.

45 Sin embargo, lo mismo no puede reducir la carga (cantidad) de las cepas formadoras de esporas bacterianas (por ejemplo algunas especies de los géneros *Clostridium* y/o *Bacillus*) a niveles residuales aceptables, así como los microorganismos termodúricos no formadores de esporas (por ejemplo, algunas especies de los géneros *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Pediococcus*) que existen originalmente dentro de la leche.

50 La persistencia sustancial de las cepas "antilácteas" anteriormente mencionadas en la leche prevista para aplicaciones lácteas de leche (también tras la purificación mediante pasteurización tradicional) da lugar a una calidad reducida de los productos lácteos finales (por ejemplo, debido a fenómenos de hinchamiento del queso y, generalmente, a alteraciones cualitativas-cuantitativas de la cinética de fermentación/maduración que comprometen las peculiaridades organolépticas de los propios productos).

55 Además, en las condiciones de pasteurización anteriores también se observa que no se eliminan los fagos (con referencia particular a los específicos de las bacterias lácticas). Dicho problema puede comprometer el crecimiento de los cultivos microbianos usados dentro del procesamiento lácteo (iniciadores seleccionados, lacto o sero-injertos naturales), con graves problemas tecnológicos y pérdidas económicas inaceptables.

60 Además, tal como se mencionó anteriormente, la eliminación incompleta de los agentes patógenos, tales como algunas especies de *Listeria*, sobre todo la especie *Listeria monocytogenes*, puede representar un grave problema sanitario, haciendo que el producto ya no sea adecuado para el consumo.

65 Con respecto a esto, merece la pena indicar que dichas especies patógenas han mejorado, a lo largo de los años, su propia capacidad para resistir las condiciones de pasteurización tradicionales habitualmente empleadas (72 °C-

75 °C, durante 10-20 segundos). A causa de este fenómeno, debido a la selección natural y evolutiva de las especies, con la pasteurización tradicional anterior ya no es posible garantizar la eliminación deseada (o reducción por debajo de un umbral aceptable) de dichos patógenos.

5 Además, se sabe que, además del empeoramiento progresivo de las calidades higiénicas-microbiológicas de la leche y los productos resultantes de la misma debido al desarrollo de especies microbianas posiblemente patógenas descritas anteriormente, un problema adicional está representado por las toxinas termorresistentes producidas a partir de microorganismos patógenos que contaminan posiblemente la leche, y por la presencia de enzimas todavía activas tras la etapa de pasteurización tradicional.

10 Dichas enzimas pueden ser tanto de naturaleza endógena, intrínseca de la composición de la leche, y de las que una de las más representativas es la fosfatasa alcalina, como de naturaleza bacteriana.

15 El artículo científico a nombre de G. Hadland *et al.*; que tiene el título "Cold-ripening as a means of reducing the adverse effects of heating and cool-aging on the rennet-coagulation of milk", Dairy Research Institute, The Agricultural College, Vollebakk, Noruega, divulga un método en el que se almacenaron muestras de leche a 4-5 °C. Antes del almacenamiento, se añadió el 0,25-1,0 % de iniciador lácteo normal a las muestras.

20 La solicitud de patente WO2004/052112 A1 divulga un método en el que se añaden cepas a la leche suministrada a la fábrica de queso en el momento de almacenamiento; la leche almacenada se procesa de manera normal durante las 24 horas posteriores, por ejemplo para pasteurizarse.

25 La solicitud de patente WO2002/43503 A1 divulga un método en el que se pasteuriza leche, por ejemplo, a 88 °C durante 30 minutos o a 95 °C durante aproximadamente 38 segundos. La leche sometida a tratamiento térmico se enfría hasta la temperatura de incubación (40-46 °C) y se somete a fermentación con bacterias de ácido láctico.

30 La solicitud de patente EP 1142481 A1 divulga un método en el que se pasteuriza leche a 90 °C durante 1 minuto. La leche pasteurizada se enfrió hasta temperatura ambiente, se inoculó con *Lactobacillus helveticus* CM4 y se agitó para producir una mezcla.

35 El artículo encontrado en la base de datos WPI Week 1994227 Derwent Publications Ltd., Londres GB; AN 1994-224520 XP002474534 y SU 1813394 A1 (Sibe Tech Inst), 7 de mayo de 1993, divulga un método que comprende pasteurizar leche desnatada, enfriar, introducir agente de acidificación *L. acidophilus*, acidificar para producir un coagulado y enfriar, para mejorar la calidad y reducir el tiempo de coagulación. Para mejorar la calidad, se mezcla leche desnatada con suero de queso, antes de la pasteurización.

40 El artículo científico a nombre de Calvo M. *et al.*; que tiene el título "Rennet-clotting properties and starter activity on milk acidified with carbon dioxide" JOURNAL OF FOOD PROTECTION, DES MOINES, IO, EE. UU., vol. 56, n.º 12, diciembre de 1993, páginas 1073-1076, divulga un método en el que se acidifica leche usando dióxido de carbono y se calienta a 60 o 70 °C durante 30 minutos, seguido de la adición de cepas bacterianas.

45 La combinación típica de tiempo/temperatura de una pasteurización tradicional no puede llevar la actividad enzimática total residual por debajo de un umbral aceptable con los propósitos de una buena transformación láctea y, por tanto, de la calidad de los productos lácteos de leche obtenidos. Por tanto, sería útil poder proporcionar una leche prevista para aplicaciones lácteas que esté sustancialmente libre de sustancias contaminantes no deseadas y desfavorables o dañinas.

50 En particular, sigue existiendo la necesidad de proporcionar una leche prevista para aplicaciones lácteas, en la que la cantidad residual de fagos, actividades enzimáticas desfavorables, microorganismos termodúricos, agentes patógenos y sus toxinas, con frecuencia presentes dentro de la leche de partida, sea sustancialmente nula (o al menos esté por debajo de un valor considerado aceptable desde los puntos de vista sanitario e industrial), sin alterar cualitativa-cuantitativamente (en un sentido negativo) la tendencia de dicha leche a la coagulación.

55 Un objeto de la presente invención es proporcionar una respuesta adecuada a la necesidad indicada anteriormente.

60 Este y otros objetivos, que resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, se han logrado por el solicitante según la reivindicación 1. El solicitante ha encontrado de manera inesperada que, sometiendo la leche prevista para aplicaciones lácteas a un tratamiento térmico a una temperatura apropiada particular, seguido de la adición y el desarrollo sucesivo (maduración previa), dentro de dicha leche tratada, de una cantidad eficaz de al menos una cepa bacteriana seleccionada apropiadamente, es posible obtener una leche sustancialmente libre de las sustancias contaminantes no deseadas anteriormente descritas y que conserva la tendencia original a la coagulación.

65 Otro objeto de la presente invención es un método para producir una leche adecuada para aplicaciones lácteas, tal como se notifica en la reivindicación independiente adjunta.

Un objeto adicional de la presente invención es la leche obtenible mediante el método de la presente invención.

Otro objeto de la presente invención es entonces el uso de dicha leche anteriormente mencionada en el sector lácteo.

5

En las reivindicaciones dependientes adjuntas se notifican realizaciones preferidas de la presente invención.

En la siguiente descripción se indican en detalle características y ventajas de la presente invención; además, también se muestran, a modo de ejemplo, en la tabla 1 adjunta, en la que:

10

la tabla 1 muestra el tromboelastograma de:

1- una leche de referencia, sometida a tratamiento térmico a 72 °C durante 40 segundos (es decir, en condiciones de una pasteurización tradicional);

15

2- la misma leche sometida a tratamiento térmico a 82,5 °C durante 40 segundos, sin maduración previa (comparativa);

20

3- la misma leche sometida a tratamiento térmico a 82,5 °C durante 40 segundos y, sucesivamente, sometida a maduración previa con la cepa bacteriana LMG-P-21385 mediante incubación a una temperatura de 9 °C durante 18 horas (comparativa);

25

4- la misma leche, anteriormente mantenida en condiciones refrigeradas a 4 °C durante 4 días, sometida a tratamiento térmico a 72 °C durante 40 segundos;

5- la misma leche, anteriormente mantenida en condiciones refrigeradas a 4 °C durante 4 días, sometida a tratamiento térmico a 82,5 °C durante 40 segundos, sin maduración previa (comparativa);

30

6- la misma leche, anteriormente mantenida en condiciones refrigeradas a 4 °C durante 4 días, sometida a tratamiento térmico a 87,5 °C durante 40 segundos y, sucesivamente, sometida a maduración previa con la cepa bacteriana LMG-P-21385 mediante incubación a una temperatura de 9 °C durante 18 horas.

El solicitante ha encontrado de manera completamente inesperada que, sometiendo una leche prevista para aplicaciones lácteas durante un intervalo de tiempo oportuno a un tratamiento térmico a una temperatura de entre 83 y 90 °C, seguido de la adición y el desarrollo (maduración previa), dentro de dicha leche sometida a tratamiento térmico, de una cantidad eficaz de al menos una cepa bacteriana fisiológicamente compatible apropiada, es posible obtener una leche que mantiene inalterada su tendencia original a la coagulación y que, mientras tanto, está sustancialmente libre de agentes contaminantes no deseados (anteriormente descritos). Por el contrario, dichos contaminantes todavía están presentes, en un grado diferente, en la leche pasteurizada según técnicas convencionales conocidas por el experto en la técnica.

35

40

El método según la reivindicación 1 para la preparación de una leche prevista para aplicaciones lácteas, incluye al menos una etapa a) (denominada tratamiento térmico), en la que se somete la leche de partida a un tratamiento térmico hasta una temperatura de entre 83 y 90 °C durante un tiempo de entre 20 y 60 segundos.

45

En una realización preferida, dicha temperatura es de aproximadamente 85 °C y el tiempo del tratamiento térmico es de 40 segundos.

Dicha etapa a) incluye:

50

- calentar dicha leche hasta una temperatura preferiblemente de entre 83 °C y 90 °C (más preferiblemente de aproximadamente 85 °C), durante un tiempo preferiblemente de entre 20 segundos y 1 minuto (más preferiblemente, de aproximadamente 40 segundos);

55

- enfriar la leche así sometida a tratamiento térmico a una temperatura de entre 1 °C y 15 °C, preferiblemente entre 3 y 12 °C, sin embargo en función de las condiciones de tratamiento de la etapa posterior.

El método de la presente invención incluye además al menos una etapa b) (denominada etapa de maduración previa), en la que a la leche sometida a tratamiento térmico resultante de la etapa a) se le añade una cantidad eficaz de al menos una cepa microbiana fisiológicamente compatible, seguido del desarrollo, en condiciones oportunas dentro de dicha leche, de la cepa microbiana añadida.

60

Ventajosamente, dicho desarrollo de al menos una cepa microbiana permite restaurar la tendencia original a la coagulación de la propia leche gracias a la producción y la actividad catalítica de enzimas específicas producidas por las cepas añadidas.

65

En el método según la reivindicación 1, dicha cepa se selecciona del grupo que consiste en: *Lactobacillus plantarum* LMG-P-21385 depositada el 31/01/2002, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* LMG-P-21387 depositada el 15/03/2002, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* LMG-P-21388 depositada el 31/01/2002 y *Lactobacillus plantarum* LMG-P-21389 depositada el 15/03/2002 (todas a cargo de la colección de bacterias BCCM/LMG de Gante, Bélgica) y mezclas de las mismas.

Los acrónimos relacionados con las cepas anteriores mostradas se refieren a los números de registro de los depósitos relativos llevados a cabo por la empresa MOFIN S.r.l., Via Pietro Cu-stodi, 12, Novara, según el tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos del 04/28/1977.

Las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*, especie *plantarum* (con los números de depósito LMG-P-21385 y LMG-P-21389) se caracterizan por:

aislamiento: a partir de muestras fecales humanas con métodos conocidos por el experto en la técnica;

crecimiento en un caldo de cultivo de MRS (DIFCO, ref. 288130) a 30 °C;

están en forma de vástagos individuales, cortos, de cadena corta; crecen bien a 30 °C; no generan esporas; grampositivas; con heterofermentación opcional;

a temperaturas superiores a 70 °C, dichas cepas se inactivan; por tanto, cuando se someten a condiciones de pasteurización tradicionales, se produce su degradación completa.

Las cepas pertenecientes al género *Lactococcus*, especie *lactis* (que tienen los números de depósito LMG-P-21387 y LMG-P-21388), se caracterizan por:

aislamiento: a partir de muestras de leche de vaca precalentadas a 25 °C durante 15 minutos, con aislamientos posteriores según lo que se prevé habitualmente por la técnica conocida del sector;

crecimiento en leche a 30 °C durante la noche (posibilidad de crecer también en caldo de cultivo M17 a 30 °C);

están en forma de células ovoides alargadas con un diámetro de entre 0,5 y 1 µm; crecimiento en dobles o cadenas cortas; no generan esporas; grampositivas; microaerófilas; pH final, tras el crecimiento en caldo que tiene glucosa como fuente de carbono, entre 4,0 y 4,5; homofermentaciones forzosas; forman ácido láctico partiendo de glucosa, galactosa, maltosa y lactosa y, en menor grado, también a partir de otros azúcares;

a temperaturas superiores a 70 °C se inactivan, por tanto, cuando se someten a las condiciones de una pasteurización tradicional, se produce su degradación completa.

Dichas cepas pueden usarse solas o en mezcla entre las mismas en una razón mutua variable en función de las combinaciones de cepas.

En una de las realizaciones preferidas de la presente invención, la mezcla consiste en las siguientes cepas: LMG-P-21385 en una cantidad de entre el 10 % y el 40 %; LMG-P-21387 en una cantidad de entre el 10 % y el 40 %; LMG-P-21388 en una cantidad de entre el 10 % y el 40 %; LMG-P-21389 en una cantidad de entre el 10 % y el 40 %.

En la etapa b), dicha al menos una cepa bacteriana (o mezcla de cepas bacterianas) se añade a la leche resultante de la etapa a) en la forma física más oportuna, seleccionada de líquida, anhidra o congelada, dependiendo del tipo de leche y/o del tipo de microorganismos empleados.

Preferiblemente, es suficiente con añadir cantidades muy bajas de las cepas anteriores a la leche sometida al tratamiento térmico resultante de a).

Independientemente de la forma física del cultivo usado, la cantidad añadida a la leche es tal como para obtener una concentración de entre 10⁴ y 10⁹ UFC/ml de leche. Preferiblemente, dicha concentración es de entre 10⁵ y 10⁸ UFC/ml de leche; de manera particularmente preferida, entre 10⁶ y 10⁷ UFC/ml de leche.

Habitualmente, tras la adición de al menos una cepa microbiana según la invención a una leche resultante de a), se produce el desarrollo de dicha cepa en la leche en condiciones oportunas.

Preferiblemente, dicho desarrollo tiene lugar a temperaturas de entre 1 y 15 °C, preferiblemente desde 6 hasta 12 °C, durante un tiempo ≥ 1 hora, preferiblemente entre 4 y 48 horas, más preferiblemente desde 8 hasta 30 horas; de manera particularmente preferida, entre 12 y 24 horas.

Por ejemplo, dicho desarrollo se lleva a cabo a una temperatura de leche de 9 °C durante un tiempo de 18 horas. Por tanto, el método de preparación de la leche para un uso lácteo según la presente invención incluye las

siguientes etapas:

a) someter la leche a un tratamiento térmico a la temperatura y durante el tiempo según la reivindicación 1;

5 b) añadir y desarrollar en condiciones adecuadas, dentro de la leche resultante de la etapa a), una cantidad, según la reivindicación 1, de al menos una cepa bacteriana seleccionada de aquellas según la reivindicación 1. La leche obtenida con el método según la presente invención anteriormente descrito ha demostrado tener la misma tendencia original típica a la coagulación.

10 Por consiguiente, con la adición y el posterior desarrollo de al menos una cepa bacteriana, seleccionada de las descritas anteriormente, en la leche tras el tratamiento térmico de la misma, según la etapa a), era inesperadamente posible restaurar completamente la tendencia normal a la coagulación de la propia leche, sin alterar los parámetros de coagulación normales de la leche inicial.

15 Por tanto, un objeto de la presente invención también es el uso de dichas cepas anteriormente mencionadas para restaurar la tendencia a la coagulación de una leche sometida a tratamiento térmico en las condiciones anteriormente descritas.

20 Además, dicha leche ha demostrado estar sustancialmente libre de los agentes contaminantes no deseados mostrados anteriormente.

25 En particular, se ha mostrado que la leche obtenida con el método de la presente invención tiene una reducción significativa de *Listeria monocytogenes* en su variante termorresistente, con respecto a lo que se produce habitualmente por medio de una pasteurización tradicional.

En cuanto al problema de fagos, también se ha mostrado que dicho tratamiento térmico elimina completamente los mismos, evitando por tanto los graves problemas tecnológicos durante la transformación láctea.

30 Un aspecto ventajoso adicional e inesperado de la leche obtenida según el método de la presente invención es la notable reducción de actividad de las enzimas que existen de manera natural dentro de dicha leche y/o liberadas de las células de flora láctica tras su degradación durante la termización.

35 De hecho, el tratamiento térmico de una leche según la presente invención puede desnaturalizar de manera irreversible la mayoría de las enzimas y toxinas inicialmente existentes dentro de dicha leche. La leche, cuando se terminan las etapas de tratamiento térmico y maduración previa (proceso de Mofinazione), puede calentarse simplemente a la temperatura del procesamiento lácteo, manteniendo por tanto los valores probióticos, si los hay, o sometiéndose a un leve tratamiento térmico, tal como para inactivar las formas bacterianas usadas en el procedimiento de maduración previa.

40 La calidad de los productos alimenticios lácteos obtenidos a partir de los mismos resultados mejoró considerablemente, estando dicha leche sustancialmente libre de los agentes contaminantes residuales no deseados que, por el contrario, todavía existen dentro de la leche pasteurizada con métodos tradicionales.

45 El proceso de Mofinazione, además de las ventajas anteriormente descritas, garantiza adicionalmente un mejor rendimiento en la caseación ya que permite combinar dentro de la cuajada las proteínas séricas desnaturalizadas mediante el efecto térmico. Dicho de otro modo, la presente invención garantiza un mayor rendimiento del queso, con consiguientes ventajas indiscutibles de naturaleza económica.

50 Por tanto, un objeto de la presente invención también es la leche prevista para aplicaciones lácteas de leche obtenible con el método de la invención anteriormente descrito. Ventajosamente, los productos alimenticios resultantes de la caseación de dicha leche también están sustancialmente libres de los agentes residuales patógenos y/o contaminantes no deseados anteriormente mencionados. Por consiguiente, dichos productos se diferencian de los conocidos debido a la ausencia de defectos y por las mejores características sanitarias.

55 Otro aspecto extremadamente ventajoso es que dos de las cepas particularmente preferidas de la invención (*Lactobacillus plantarum* LMG-P-21385 y *Lactobacillus plantarum* LMG-P-21389) pertenecen a la especie *Lactobacillus plantarum*, un tipo con propiedades probióticas notables.

60 La maduración previa realizada con dichos microorganismos confiere, de esta manera, un valor probiótico a la propia leche y, por consiguiente, también al queso producido a partir de la misma.

65 Investigaciones analíticas llevadas a cabo por el solicitante han indicado la presencia de péptidos específicos tanto dentro de la leche sometida a maduración previa que tiene las dos cepas anteriormente mencionadas como dentro de los quesos obtenidos a partir de la misma; a la espera de investigaciones adicionales, se cree que dichos péptidos son bioactivos y que parte de las actividades probióticas de las dos cepas de *L. plantarum* pueden deberse a los mismos.

Por tanto, los productos alimenticios lácteos, en particular yogur y/o quesos, obtenibles a partir de la leche prevista para aplicaciones lácteas de leche según la presente invención también forman otro objeto de la presente invención.

5 La siguiente parte experimental muestra, a modo de ejemplo en absoluto limitativo, la tendencia a la coagulación de muestras de leche obtenidas con el método de la presente invención, en comparación con la de una leche tratada de una manera tradicional, y la reducción de la actividad catalítica de una enzima que existe de manera natural en la leche en altas concentraciones, la fosfatasa alcalina, tras diferentes condiciones de tratamiento térmico de la propia leche.

10 Ejemplo 1- Evaluación de la tendencia a la coagulación de la leche.

Con el fin de comprobar la tendencia a la coagulación de la leche obtenida según la presente invención, se llevaron a cabo pruebas de coagulación con muestras de leche pasteurizadas a 72 °C con un método de pasteurización tradicional y con muestras de leche sometidas a tratamiento térmico según el método de la presente invención, respectivamente a 82,5 °C y 87,5 °C. A dichas muestras no se les añadió ningún microorganismo antes de la determinación de su tendencia a la coagulación.

20 En paralelo, se llevaron a cabo las mismas pruebas de coagulación con muestras similares a las anteriormente mencionadas, pero sometidas a maduración previa con la cepa bacteriana LMG-P-21385 antes de someterse a la evaluación de la tendencia a la coagulación.

El registro de tromboelastogramas de las muestras anteriormente mencionadas se llevó a cabo con un lactodinamógrafo de FOSS Italia en las siguientes condiciones experimentales:

25 - temperatura de 32 °C;

- sustrato de leche de vaca que tiene pH = 6,75;

30 - cuajo líquido de ternera que tiene un título igual a 1:4000 (el 80 % de renina y el 20 % de pepsina), añadido en una cantidad de 23 µl por 10 ml de leche (0,23 %, v/v);

35 - dentro de las muestras a las que se les añadió la cepa bacteriana anteriormente mostrada, dicha adición se llevó a cabo partiendo de un cultivo líquido en una cantidad del 0,5 % (volumen/volumen, v/v) y se mantuvo la mezcla resultante durante 18 horas a 9 °C durante el desarrollo de dicha cepa antes del registro de tromboelastogramas.

El procedimiento adoptado fue el siguiente:

40 a un volumen de leche de las muestras anteriormente mencionadas (tanto aquellas sin adición del microorganismo como aquellas a las que se les añadió previamente el microorganismo mencionado), calentado a 32 °C, se le añadió una cantidad eficaz de cuajo (23 µl por 10 ml de leche, es decir el 0,23 % en v/v) para inducir la coagulación del mismo. Se soportaron los pocillos que contenían leche sobre una base móvil, que realiza un movimiento circular muy lento.

45 La punta sumergida dentro de la leche no encuentra, al principio, una gran fricción y permanece quieta, después, tras avanzar la coagulación, arrastra la punta que sigue de esta manera el movimiento de la base móvil.

50 Los tromboelastogramas resultantes son los notificados en la tabla 1 adjunta. El parámetro más importante para evaluar una tendencia óptima a la coagulación de una leche, con los propósitos de una caseación correcta, es el identificado como K20, que muestra el tiempo requerido, partiendo desde el comienzo del proceso de coagulación, para obtener dicha resistencia mecánica del coágulo para inducir un desplazamiento total de la punta de 20 mm.

Por tanto, el parámetro K20 está estrictamente conectado con las características reológicas del cuajo.

55 Valores altos de K20 son indicativos de un coágulo menos espeso, concretamente una mala tendencia de la leche a la coagulación en los tiempos requeridos para obtener un producto lácteo de leche con una buena calidad.

60 En la siguiente tabla 1 se presentan valores de pH y parámetro K20 de seis muestras de leche, con tromboelastogramas que se notifican en la tabla 1.

En particular, los tres primeros tromboelastogramas se han obtenido a partir de muestras de leche fresca, mientras que los tres últimos se han registrado partiendo de muestras de leche almacenadas en condiciones refrigeradas durante 4 días.

65 TABLA 1

muestra	pH	K20
leche pasteurizada a 72 °C durante 40 segundos (según el estado de la técnica)	6,68	6,02
leche termizada a 82,5 °C durante 40 segundos, sin maduración previa (comparativa)	6,68	16,46
leche termizada a 82,5 °C durante 40 segundos y sometida a maduración previa con LMG-P-21385 (procedimiento comparativo)	6,68	6,48
leche pasteurizada a 72 °C durante 40 segundos (según el estado de la técnica)	6,74	11,40
leche termizada a 87,5 °C durante 40 segundos, sin maduración previa (comparativa)	6,73	21,09
leche termizada a 87,5 °C durante 40 segundos y sometida a maduración previa con LMG-P-21385 (proceso de Mofinazione)	6,73	11,50

Tal como resulta evidente a partir de la tabla 1, las muestras de leche tras el tratamiento térmico a 82,5 °C u 87,5 °C muestran valores de K20 al menos 2-2,5 veces más largos que los valores típicos de la leche pasteurizada según el procedimiento convencional.

5 Por el contrario, las muestras de leche termizadas en las mismas condiciones, y posteriormente sometidas a maduración previa con la cepa LMG-P-21385, según la invención, han mostrado tener valores de K20 absolutamente comparables a los de la leche pasteurizada según el procedimiento convencional.

10 Por tanto, se muestra de manera inesperada que la adición y el desarrollo de dicho microorganismo en leche termizada según el método de la presente invención ha permitido restaurar la tendencia original a la coagulación de la leche.

15 Ejemplo 2 - Evaluación de la actividad catalítica residual de la fosfatasa alcalina en la leche.

La fosfatasa alcalina es una enzima que existe de manera natural dentro de la leche de partida; además, se libera tras la degradación térmica de casi todas las especies microbianas existentes en dicha leche.

20 Dicha enzima, como todas las moléculas proteicas, se desnaturaliza en condiciones de altas temperaturas, por tanto es un indicador válido tanto de la entidad del tratamiento térmico experimentado por una leche (combinación de tiempo/temperatura) como del nivel de actividades enzimáticas residuales en la leche tras el propio tratamiento térmico.

25 Con el fin de cuantificar la actividad residual de la enzima, se ha llevado a cabo un método internacional (FIL IDF 155A:199), basado en un procedimiento fluorimétrico continuo que usa, como sustrato, un éster monofosfórico aromático no fluorescente que, en presencia de la fosfatasa alcalina, experimenta una reacción de hidrólisis produciendo una molécula altamente fluorescente.

30 En la tabla 2 a continuación se notifican los valores de una actividad fosfatasa residual (en miliunidades de enzima/litro, mU/l) existente en una leche pasteurizada según el procedimiento tradicional y en una leche termizada a 85 °C durante 40 segundos.

TABLA 2

muestra	fosfatasa
leche pasteurizada a 72 °C durante 20 segundos	250 mU/l
leche termizada a 85 °C durante 40 s	25 mU/l

35 Tal como se muestra mediante los datos de la tabla 2, la actividad fosfatasa residual en una leche sometida a tratamiento térmico según el método de la presente invención es igual a aproximadamente una décima parte de la actividad residual típica de una leche pasteurizada a 72 °C durante 20 segundos.

40 Los datos muestran cómo el método de la presente invención puede reducir notablemente la concentración de enzimas activas, incluyendo también las antilácteas, si están presentes, que originan producciones defectuosas y de mala calidad de los productos lácteos de leche resultantes de las mismas.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar una leche prevista para aplicaciones lácteas de leche, que comprende:
- 5 - al menos una etapa a) que incluye:
- i) calentar una leche hasta una temperatura comprendida entre 83 °C y 90 °C, durante un tiempo comprendido entre 20 y 60 segundos,
- 10 ii) enfriar la leche así sometida a tratamiento térmico a una temperatura comprendida entre 1 °C y 15 °C; y
- al menos una etapa b) para una maduración previa de la leche resultante de la etapa a), mediante la adición y el siguiente desarrollo de una cantidad eficaz de al menos una cepa bacteriana que puede restaurar la tendencia a la coagulación original de la leche de partida, seleccionándose dicha al menos una cepa bacteriana del grupo que consiste en: *Lactobacillus plantarum* LMG-P-21385, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* LMG-P-21387, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* LMG-P-21388, *Lactobacillus plantarum* LMG-P-21389 y mezclas de las mismas.
- 15
2. Método según la reivindicación 1, en el que la temperatura es igual a aproximadamente 85 °C y el tiempo es igual a 40 segundos.
- 20
3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que se emplea una mezcla que consiste en las cuatro cepas *Lactobacillus plantarum* LMG-P-21385, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* LMG-P-21387, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* LMG-P-21388, *Lactobacillus plantarum* LMG-P-21389; preferiblemente dicha mezcla consiste en *Lactobacillus plantarum* LMG-P-21385 en una cantidad de entre el 10 % y el 40 %, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* LMG-P-21387 en una cantidad de entre el 10 % y el 40 %, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* LMG-P-21388 en una cantidad de entre el 10 % y el 40 %, y *Lactobacillus plantarum* LMG-P-21389 en una cantidad de entre el 10 % y el 40 %.
- 25
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha al menos una cepa se añade en una forma líquida, anhidra o congelada, preferiblemente una cantidad de dicha cepa es tal como para obtener una concentración en dicha leche de entre 10^4 y 10^9 UFC/ml de leche; preferiblemente, entre 10^5 y 10^8 UFC/ml; más preferiblemente, desde 10^6 hasta 10^7 UFC/ml.
- 30
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el desarrollo de dicha al menos una cepa bacteriana tiene lugar a una temperatura de entre 1 °C y 15 °C, preferiblemente desde 6 °C hasta 12 °C, durante un tiempo de entre 4 horas y 48 horas, preferiblemente desde 8 horas hasta 30 horas, más preferiblemente desde 12 horas hasta 24 horas.
- 35

TABLA 1

