

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 978**

51 Int. Cl.:

A23C 9/123 (2006.01)

A23C 9/133 (2006.01)

A23C 19/032 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2014** **E 14173196 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018** **EP 2957180**

54 Título: **Método de producción de un producto de leche fermentada con control mejorado de la acidificación posterior**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GARRIGUES, CHRISTEL;
GILLELADEN, CHRISTIAN;
CURIC-BAWDEN, MIRJANA;
JANZEN, THOMAS;
BIRKELUND, MIMI;
BUCHHORN, GÄELLE LETTIER;
SOERENSEN, KIM IB;
CHRISTENSEN, NANNA;
SVANE, CLAUS;
RIIS, SOEREN y
PEDERSEN, MARTIN BASTIAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 672 978 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 de producción de un producto de leche fermentada con control mejorado de la acidificación posterior

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos de producción de un producto de leche fermentada que comprenden etapas, en los que se fermenta leche por un cultivo iniciador que comprende bacterias del ácido láctico y en los que se termina la fermentación mediante una disminución de la concentración de los hidratos de carbono que pueden metabolizarse por las bacterias del ácido láctico. Los métodos de la presente invención proporcionan un control mejorado de la acidificación posterior, es decir la acidificación provocada por las bacterias después de la terminación de la fermentación, por ejemplo durante el procesamiento y almacenamiento adicionales.

10 Antecedentes de la invención

La mayor parte de los métodos actuales para producir productos de leche fermentada pueden caracterizarse por la siguiente serie de etapas:

(a) se fermenta leche usando un cultivo iniciador que comprende bacterias del ácido láctico (o LAB) que pueden metabolizar glucosa obtenida a partir de la lactosa presente en la leche;

15 (b) la fermentación provoca la producción de ácido láctico, que provoca una disminución del pH desde inicialmente de 6,4 a 6,8 (para leche de vaca) hasta un intervalo entre pH 3,8 y 4,7;

(c) se termina la fermentación mediante el enfriamiento rápido del producto de leche fermentada una vez que se ha alcanzado el pH deseado para el producto fermentado en cuestión.

Este método se usa, por ejemplo, para producir yogur y bebidas de yogur.

20 Se lleva a cabo el enfriamiento rápido del producto de leche fermentada a un valor de pH predeterminado para terminar la fermentación. Sin el enfriamiento del producto fermentado, la fermentación continuaría. Sin embargo, un enfriamiento rápido tiene desventajas, ya que conduce a pérdida de textura. El evitar una etapa de enfriamiento rápido también ahorraría una operación unitaria y, por tanto, reduciría los costes de producción.

25 Incluso en métodos que comprenden una etapa de enfriamiento rápido, se observa acidificación posterior, es decir la producción de ácido láctico por las LAB después de la terminación de la fermentación, es decir después de haberse alcanzado el pH deseado. Se considera que la acidificación posterior representa uno de los problemas más importantes durante la fermentación de productos lácteos hoy en día. La disminución adicional del valor de pH durante el procesamiento y almacenamiento del producto de leche fermentada conduce a problemas con la acidez elevada y vida útil reducida.

30 Uno de los enfoques para controlar la acidificación posterior consiste en producir productos lácteos con un pH relativamente ácido. En estos métodos se inhibe el crecimiento adicional de las LAB y la producción de ácido láctico por el pH ácido. Sin embargo, la producción adicional de ácido láctico sólo se inhibe y no se termina por completo y el método es obviamente inadecuado para la producción de productos de leche fermentada con un sabor suave.

35 Se supuso que la acidificación posterior está controlada por la actividad metabólica de *L. bulgaricus* y provocada por la ingesta de péptidos y se generaron cepas con una deficiencia en el metabolismo de aminoácidos para controlar la acidificación posterior (documentos US2010/0021586 y WO2006/042862A1). Se han descrito en la técnica anterior otros enfoques para controlar la acidificación posterior e incluyen procedimientos basados en el uso de cepas de LAB específicas caracterizadas por una débil actividad de acidificación posterior (documento WO2010/139765).

40 Un enfoque alternativo para minimizar la acidificación posterior se basa en el control de la razón de proteína con respecto a lactosa, el control de la capacidad tamponante y el mantenimiento de la capacidad tamponante y el pH dentro de un intervalo predeterminado durante la fermentación (documento WO2013/169205). Sin embargo, este enfoque requiere la determinación de varios parámetros de procedimiento durante la fermentación y puede requerir la adición de proteínas o lactosa o un tampón al medio de fermentación para garantizar que se mantienen los intervalos predeterminados durante la fermentación.

45 El documento US2005/196388 1 da a conocer en la reivindicación una cepa mutante de *L. bulgaricus* que carece de actividad beta-galactosidasa, en la que la cepa mutante porta una mutación sin sentido en una de las secuencias codificantes del operón lactosa. El mutante puede usarse en un método para preparar un producto de leche fermentada. El crecimiento y la acidificación de la cepa mutante son mucho más lentos que en su cepa madre, sin embargo la cepa mutante puede crecer sobre glucosa añadida.

50 Evidentemente, existe todavía la necesidad de métodos mejorados para producir productos de leche fermentada, métodos que proporcionan un mejor control de la actividad de acidificación posterior en el producto de leche fermentada.

Sumario de la invención

Ahora se resuelve este problema mediante los métodos de la presente invención, que proporcionan un producto lácteo con actividad de acidificación posterior extremadamente baja.

5 En particular, la presente invención proporciona un método de producción de un producto de leche fermentada que comprende una etapa en la que se fermenta leche, en el que:

(a) se inicia la fermentación por un cultivo iniciador, cultivo iniciador que comprende bacterias del ácido láctico que pueden metabolizar uno o varios hidratos de carbono añadidos a la leche,

10 (b) se termina la fermentación mediante una disminución de la concentración del uno o varios hidratos de carbono durante la fermentación, en el que la terminación de la fermentación se controla mediante la concentración de hidratos de carbono en la leche que va a fermentarse, y en el que a la terminación de la fermentación la concentración del hidrato de carbono metabolizado por las bacterias del ácido láctico está en el intervalo de entre 5 mg/g y 0,01 mg/g,

(c) la disminución también está provocada al menos por la actividad metabólica de las bacterias del ácido láctico, y

15 (d) se lleva a cabo la fermentación mediante un método que usa un cultivo iniciador que comprende al menos un deficiente en lactosa *Streptococcus thermophilus* y al menos un *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* deficiente en lactosa,

en el que el hidrato de carbono es un hidrato de carbono fermentable diferente de lactosa.

20 Los presentes inventores hallaron sorprendentemente que la terminación de la fermentación puede controlarse mediante la concentración de hidratos de carbono en la leche que va a fermentarse sin afectar significativamente a la eficiencia o el tiempo requeridos para la fermentación. Esto es sorprendente ya que se supuso que una reducción de los hidratos de carbono presentes en la leche que están disponibles para las LAB para fermentación inhibirían o retrasarían el procedimiento de fermentación y, por tanto, darían como resultado un procedimiento ineficaz que no puede usarse para la producción a gran escala de productos de leche fermentada, tales como yogur. Los inventores se llevaron además una sorpresa al observar que el procedimiento de fermentación avanza rápidamente hasta un punto en el que se han consumido esencialmente todos los hidratos de carbono por las LAB y entonces se termina casi por completo (figura 1; lactosa al 1%). Se esperaba que el procedimiento de fermentación en presencia de una concentración muy baja de hidratos de carbono disponible para las LAB daría como resultado una baja actividad de acidificación de las LAB a lo largo de un periodo prolongado de.

30 En una realización particular, el producto de leche fermentada se caracteriza porque el valor de pH del producto se mantiene dentro de un intervalo de 0,3 unidades de pH si se almacena después de la terminación de la fermentación a la temperatura usada para la fermentación en la etapa (ii) a lo largo de un periodo de 20 horas.

35 Esto no significa que el método incluya necesariamente una etapa en la que el producto de leche fermentada se mantiene a lo largo de un periodo de 20 horas después de la terminación de la fermentación a la temperatura usada para la fermentación en la etapa (ii). Esto es sólo una prueba funcional que puede usarse para confirmar la baja acidificación posterior. Mantener un valor de pH de un producto de leche fermentada dentro de un intervalo de 0,3 unidades de pH a lo largo de un periodo de 20 horas si se almacena a una temperatura para la fermentación es una indicación de una acidificación posterior muy baja.

40 En una realización adicional, la presente invención se refiere a métodos para producir un producto de leche fermentada que se caracterizan esencialmente por la ausencia de acidificación posterior, y en los que el producto de leche fermentada se caracteriza porque el valor de pH del producto se mantiene dentro de un intervalo de 0,1 unidades de pH si se almacena después de la terminación de la fermentación a la temperatura usada para la fermentación en la etapa (ii) a lo largo de un periodo de 20 horas. Mantener un valor de pH de un producto de leche fermentada dentro de un intervalo de 0,1 unidades de pH a lo largo de un periodo de 20 horas si se almacena a una temperatura para la fermentación es una indicación de ausencia de acidificación posterior.

45 En una realización adicional particular, la presente invención proporciona métodos de producción de un producto de leche fermentada, en los que se envasa el producto fermentado a una temperatura de entre 15 y 45°C.

Debido a la baja acidificación posterior, este método no requiere una etapa de enfriamiento después de la fermentación.

50 La presente invención proporciona además productos de leche fermentada obtenidos mediante estos métodos. Estos productos de leche fermentada se caracterizan por mantener el valor de pH del producto dentro de un intervalo de 0,3 unidades de pH a lo largo de un periodo de 20 horas si se almacena a la temperatura usada para la fermentación. Los productos se caracterizan además por una concentración muy baja de los hidratos de carbono que pueden metabolizarse por las LAB usadas para la fermentación. Pueden estar presentes otros hidratos de carbono en una concentración significativamente mayor.

Divulgación detallada de la invención

En general, la presente invención proporciona un método de producción de un producto de leche fermentada que comprende una etapa en la que se fermenta leche, en el que:

5 (a) se inicia la fermentación por un cultivo iniciador, cultivo iniciador que comprende bacterias del ácido láctico que pueden metabolizar uno o varios hidratos de carbono añadidos a la leche,

10 (b) se termina la fermentación mediante una disminución de la concentración del uno o varios hidratos de carbono durante la fermentación, en el que la terminación de la fermentación se controla mediante la concentración de hidratos de carbono en la leche que va a fermentarse, y en el que a la terminación de la fermentación la concentración del hidrato de carbono metabolizado por las bacterias del ácido láctico está en el intervalo de entre 5 mg/g y 0,01 mg/g,

(c) la disminución también está provocada al menos por la actividad metabólica de las bacterias del ácido láctico, y

(d) se lleva a cabo la fermentación mediante un método que usa un cultivo iniciador que comprende al menos un *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa y al menos un *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* deficiente en lactosa, en el que el hidrato de carbono es un hidrato de carbono fermentable diferente de lactosa.

15 En el contexto de la presente solicitud, el término “leche” se usa ampliamente en su significado habitual para referirse a líquidos producidos por las glándulas mamarias de animales o por plantas. Según la presente invención la leche puede haberse procesado y el término “leche” incluye leche entera, leche desnatada, leche libre de grasa, leche de bajo contenido en grasa, leche con toda la grasa, leche con reducción de lactosa o leche concentrada. La leche libre de grasa es un producto lácteo sin grasa o desnatado. La leche de bajo contenido en grasa se define
20 normalmente como leche que contiene desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 2% de grasa. La leche con toda la grasa contiene a menudo el 2% de grasa o más. El término “leche” pretende englobar leches de diferentes mamíferos y fuentes vegetales. Las fuentes de leche de mamífero incluyen, pero no se limitan a, de vaca, oveja, cabra, búfalo, camello, llama, yegua y cierva. Las fuentes vegetales de leche incluyen, pero no se limitan a, leche extraída de soja, guisante, cacahuete, cebada, arroz, avena, quinoa, almendra, anacardo, coco, avellana, cáñamo, semilla de sésamo y semilla de girasol.

En los métodos y productos de la presente invención, la leche derivada de vacas es la usada más preferiblemente como material de partida para la fermentación.

30 Está disponible comercialmente leche con reducción de lactosa (por ejemplo de Select Milk Producers Inc., Texas, EE.UU.). Puede producirse leche con reducción de lactosa según cualquier método conocido en la técnica, incluyendo hidrolizar la lactosa por la enzima lactasa para dar glucosa y galactosa, o mediante nanofiltración, electrodiálisis, cromatografía de intercambio iónico y centrifugación.

35 El término “base de leche” se usa ampliamente en la presente solicitud para referirse a una composición basada en leche o componentes lácteos que pueden usarse como medio para el crecimiento y la fermentación de LAB. La base de leche comprende componentes derivados de la leche y cualquier otro componente que pueda usarse con el fin de hacer crecer o fermentar LAB.

40 En el contexto de la presente solicitud, el término “bacterias del ácido láctico” o “LAB” se usa para referirse a bacterias de calidad alimentaria que producen ácido láctico como producto final metabólico principal de la fermentación de hidratos de carbono. Estas bacterias están relacionadas por sus características metabólicas y fisiológicas comunes y son habitualmente bacilos o cocos gram-positivos, de bajo contenido en GC, tolerantes a ácidos, sin esporulación, sin respiración, en forma de varilla. Durante la etapa de fermentación, el consumo de lactosa por estas bacterias provoca la formación de ácido láctico, reduciendo el pH y conduciendo a la formación de un coágulo de proteína. Por tanto, estas bacterias son responsables de la acidificación de leche y de la textura del producto lácteo. Tal como se usa en el presente documento, el término “bacterias del ácido láctico” engloba, pero no se limita a, bacterias pertenecientes al género de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp.,
45 *Lactococcus* spp., tal como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve* y *Leuconostoc* spp.

50 La etapa de fermentación del procedimiento para fabricar productos lácteos fermentados comprende la adición de un cultivo iniciador a leche. El término “iniciador” o “cultivo iniciador” tal como se usa en el presente contexto se refiere a un cultivo de uno o más microorganismos de calidad alimentaria, en particular bacterias del ácido láctico, que son responsables de la acidificación de la base de leche. Los cultivos iniciadores pueden estar frescos, congelados o liofilizados. Para la producción de un producto lácteo fermentado, el iniciador puede añadirse en una cantidad de desde el 0,01 hasta el 3%, preferiblemente desde el 0,01 hasta el 0,025 % en volumen de la cantidad total de leche.

55 El término “que pueden metabolizar uno o varios hidratos de carbono presentes en la leche” se usa en el contexto de la presente invención para describir la actividad metabólica de LAB que provoca la producción de ácido láctico como producto final metabólico principal de la fermentación de hidratos de carbono. Tal como se explicará en más detalle

a continuación, las LAB pueden metabolizar uno o varios hidratos de carbono presentes en la leche. Los hidratos de carbono pueden estar presentes en leche natural o pueden haberse añadido a la leche.

5 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona métodos que usan LAB que pueden metabolizar glucosa. La presente invención proporciona métodos que usan LAB con una deficiencia en el metabolismo de lactosa, LAB que pueden metabolizar otros hidratos de carbono, tales como glucosa.

10 Los métodos de la presente invención se caracterizan por una etapa en la que se fermenta leche y se termina la fermentación mediante una disminución de la concentración del uno o varios hidratos de carbono durante la fermentación. Esto significa que las LAB presentes en el medio de fermentación ya no pueden producir cantidades significativas de ácido láctico debido a una concentración muy baja de hidratos de carbono que pueden metabolizar.

15 En una realización, la terminación de la fermentación puede caracterizarse por un valor de pH que se mantiene dentro de un intervalo de menos de 0,3 unidades de pH mientras se mantiene el cultivo a la temperatura usada para la fermentación durante 20 horas. Por ejemplo, si se lleva a cabo un método de producción de un producto de leche fermentada que comprende una etapa en la que se fermenta leche tal como se describió anteriormente, puede someterse a prueba fácilmente si la terminación de la fermentación se debe a una disminución de la concentración del uno o varios hidratos de carbono durante la fermentación manteniendo el producto a la temperatura para la fermentación durante 20 horas. Si no cambia el pH en más de 0,3 unidades de pH durante ese tiempo, entonces la terminación de la fermentación estuvo provocada por la disminución de la concentración del uno o varios hidratos de carbono durante la fermentación.

20 Los métodos de la técnica anterior que terminan la fermentación mediante enfriamiento tan pronto como se alcanza el pH deseado no pueden pasar esta prueba, ya que los hidratos de carbono residuales disponibles para actividad metabólica provocarían una acidificación posterior significativa a la temperatura usada para la fermentación (curva inferior de las figuras 2 y 3).

25 Los métodos de la presente invención pueden caracterizarse además porque la disminución de la concentración de los hidratos de carbono también está provocada al menos por la actividad metabólica de las bacterias del ácido láctico. Esto significa que las bacterias del ácido láctico contribuyen a la disminución de los hidratos de carbono, aunque también pueden contribuir otros componentes, por ejemplo enzimas tales como lactasa, a la disminución del hidrato de carbono que pueden metabolizar durante la fermentación.

30 En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención comprenden una etapa en la que se envasa el producto fermentado a una temperatura de entre 15 y 45°C. Tal como se indicó anteriormente, uno de los principales problemas de la técnica anterior reside en la necesidad de un enfriamiento rápido del producto de fermentación para terminar la fermentación. Los métodos de la presente invención pueden comprender una etapa en la que se envasa el producto fermentado a una temperatura de entre 15 y 45°C. Esto muestra que al contrario que los métodos de la técnica anterior, un enfriamiento rápido no es necesario en absoluto.

35 La terminación de la fermentación puede caracterizarse por la concentración del uno o varios hidratos de carbono que pueden metabolizarse por las bacterias del ácido láctico. A la terminación de la fermentación, la concentración del hidrato de carbono metabolizado por las bacterias del ácido láctico está en el intervalo de entre 5 mg/g y 0,01 mg/g.

40 Tal como se indicó anteriormente, los métodos de producción de un producto de leche fermentada según la presente invención pueden caracterizarse además por un valor de pH particularmente estable durante el almacenamiento. El producto fermentado puede mantenerse dentro de un intervalo de 0,3 unidades de pH a lo largo de un periodo de 20 horas cuando se almacena a la temperatura usada para la fermentación.

En una alternativa adicional, los métodos de producción de un producto de leche fermentada según la presente invención pueden caracterizarse por una temperatura durante la fermentación de entre 22 y 45°C. Este intervalo de temperatura incluye el intervalo usado para los cultivos mesófilos y termófilos.

45 Según una realización, la presente invención proporciona un método tal como se describió anteriormente, en el que se fermentan cultivos tanto mesófilos como termófilos a una temperatura de entre 22 y 45°C.

La presente invención proporciona además productos de leche fermentada obtenidos mediante los métodos tal como se describieron anteriormente. Los productos de leche fermentada de la presente invención son preferiblemente productos alimenticios fermentados, incluyendo yogur, yogur de frutas, bebida de yogur o queso.

50 En su realización más preferida, todos los métodos de la presente invención son métodos para producir un yogur y el producto de la presente invención es yogur.

55 En el contexto de la presente solicitud, el término "yogur" se refiere a productos que comprenden *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y opcionalmente otros microorganismos tales como *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei*, o cualquier microorganismo derivado de los mismos. Las cepas de ácido láctico distintas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, se incluyen para

proporcionar al producto acabado diversas propiedades, tales como la propiedad de fomentar el equilibrio de la flora. Tal como se usa en el presente documento, el término “yogur” engloba yogur con textura firme, yogur batido, yogur para beber, *Petit Suisse*, yogur tratado térmicamente, yogur de estilo griego caracterizado por un alto nivel de proteína y productos similares al yogur.

- 5 En particular, el término “yogur” engloba, pero no se limita a, yogur tal como se define según los reglamentos franceses y europeos, por ejemplo productos lácteos coagulados obtenidos mediante una fermentación con ácido láctico sólo por medio de bacterias del ácido láctico termófilas específicas (es decir *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) que se cultiva simultáneamente y se encuentra que están vivas en el producto final en una cantidad de al menos 10 millones de UFC (unidades formadoras de colonias) / g. Los yogures pueden contener opcionalmente materias primas lácteas añadidas (por ejemplo, nata) u otros ingredientes tales como azúcar o agentes edulcorantes, uno o más saborizante(s), fruta, cereales o sustancias nutritivas, especialmente vitaminas, minerales y fibras, así como estabilizantes y espesantes. En una alternativa, el yogur satisface las especificaciones para los leches fermentadas y los yogures de la norma AFNOR NF 04-600 y/o la norma del código StanA-IIa-1975. Para satisfacer la norma AFNOR NF 04-600, el producto no debe haberse calentado después de la fermentación y las materias primas lácteas deben representar como mínimo el 70% (m/m) del producto acabado.

El queso, tal como el queso mozzarella y para pizza así como el feta, también puede prepararse mediante fermentación usando un cultivo iniciador que comprende *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Hoier *et al.* (2010) en *The Technology of Cheesemaking*, 2ª ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192).

LAB deficientes en lactosa y métodos de producción de un producto de leche fermentada usando LAB deficientes en lactosa

En una realización adicional, la presente invención proporciona LAB deficientes en lactosa.

- Los términos “deficiencia en el metabolismo de lactosa” y “deficientes en lactosa” se usan en el contexto de la presente invención para caracterizar LAB que perdieron o bien parcialmente o bien por completo la capacidad para usar lactosa como fuente para el crecimiento celular o el mantenimiento de la viabilidad celular. LAB respectivas pueden metabolizar uno o varios hidratos de carbono seleccionados de sacarosa, galactosa y/o glucosa u otro hidrato de carbono fermentable. Puesto que estos hidratos de carbono no están presentes de manera natural en la leche en cantidades suficientes como para soportar la fermentación por mutantes deficientes en lactosa, será necesario añadir estos hidratos de carbono a la leche. LAB deficientes y parcialmente deficientes en lactosa pueden caracterizarse como colonias blancas en un medio que contiene lactosa y X-Gal.

Tal como se describe en detalle en el ejemplo 2 a continuación, los presentes inventores aislaron varias LAB deficientes en lactosa, en particular cepas de *Streptococcus thermophilus* (ST) y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (LB). Estas LAB deficientes en lactosa metabolizan sacarosa.

- 35 Se derivaron las cepas de la cepa CHCC15914 que no es deficiente en lactosa. Por consiguiente, la presente invención proporciona una cepa de *Streptococcus thermophilus* aislada, cepa que es la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28909.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a las siguientes cepas de LAB deficientes en lactosa:

- 40 (a) una cepa de *Streptococcus thermophilus*, cepa que es:
- (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28952; o
- (b) una cepa de *Streptococcus thermophilus*, cepa que es:
- (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28953.

La presente invención se refiere además al uso de estas cepas en los métodos de producción de un producto de leche fermentada tal como se describe en el presente documento. Además, la invención se refiere a productos alimenticios fermentados, que comprenden una o varias de las siguientes cepas:

- (a) una cepa de *Streptococcus thermophilus*, cepa que es:
- 50 (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28952; o
- (b) una cepa de *Streptococcus thermophilus*, cepa que es:

- (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28953; y opcionalmente

(c) una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, cepa que es:

- 5 (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28910.

Los productos alimenticios fermentados pueden ser un yogur, un yogur de frutas, una bebida de yogur o un queso.

En algunas realizaciones, el método se caracteriza además como que comprende una etapa en la que se envasa el producto fermentado a una temperatura de entre 15 y 45°C.

- 10 En otras alternativas, el método puede caracterizarse porque el valor de pH de el producto fermentado se mantiene dentro de un intervalo de 0,3 pH o dentro de un intervalo de 0,1 unidades de pH si se almacena después de la terminación de la fermentación a la temperatura usada para la fermentación a lo largo de un periodo de 20 horas.

La concentración total de hidratos de carbono que pueden metabolizarse por las *Streptococcus thermophilus* y las *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* puede estar en el intervalo de 30 mg/g a 2 mg/g, o en el intervalo de 20 mg/g a 3 mg/g o en el intervalo de 10 mg/g a 4 mg/g.

- 15 Este modo de proceder tiene la ventaja de que puede usarse leche normal con una concentración de lactosa de aproximadamente el 5% (50 mg/g) en el procedimiento de producción y que la fermentación puede controlarse con precisión mediante la cantidad de hidrato de carbono añadida. Puede determinarse la concentración de hidrato de carbono que ha de añadirse en ensayos que someten a prueba las condiciones de fermentación deseadas, incluyendo el pH final, la temperatura, el cultivo iniciador, etc.
- 20 En una realización preferida de esta alternativa, se lleva a cabo la fermentación usando LAB que pueden metabolizar sacarosa (suc+) y se añade sacarosa a la leche antes de la fermentación. En una alternativa, la concentración de sacarosa está en el intervalo de 30 mg/g a 2mg/g, o en el intervalo de 20 mg/g a 3mg/g o en el intervalo de 10 mg/g a 4 mg/g.

La presente invención se refiere además a una composición que comprende

- 25 (a) una cepa de *Streptococcus thermophilus*, cepa que es:
 - (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28952, o
- (b) una cepa de *Streptococcus thermophilus*, cepa que es:
 - 30 (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28953; y
- (c) cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, cepa que es:
 - (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28910.

Leyendas de las figuras

- 35 La figura 1 compara la actividad de acidificación de *S. thermophilus* CHCC15914 y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CHCC10019 con la actividad de acidificación de *S. thermophilus* CHCC17862 y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CHCC18994 cuando se usan para fermentar leche complementada con sacarosa.

- 40 La figura 2 muestra la actividad de acidificación de diferentes razones de *S. thermophilus* CHCC17861 y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CHCC18994 cuando se usan para fermentar leche complementada con sacarosa y en comparación con la actividad de acidificación de *S. thermophilus* CHCC15914.

Cepas de LAB:

Los ejemplos posteriores usan cepas CH, algunas de las cuales se han depositado para solicitudes de patente anteriores de Chr. Hansen. Se proporciona información adicional sobre las cepas por la solicitud de patente respectiva y el depósito de la siguiente manera:

- 45 Se depositó *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CHCC10019 para el documento WO2011/000879 ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig el 03-04-2007 con el n.º de registro DSM 19252.

Las restantes cepas usadas en los ejemplos posteriores o bien se ha depositado para la presente solicitud o bien

están disponibles comercialmente de Chr. Hansen.

Ejemplo 1: Métodos para producir un producto lácteo usando LAB deficientes en lactosa

5 Se aislaron mutantes deficientes en lactosa de las cepas positivas para EPS de *S. thermophilus* (ST) CHCC15914 y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (LB) CHCC10019. Se seleccionaron las cepas después de mutagénesis mediante UV como colonias blancas (lo que indica un fenotipo deficiente en lactosa) sobre M17 con lactosa al 1% y X-Gal 200 mg/ml para CHCC15914, y resp. placas de agar MRS con lactosa al 1% y X-Gal 200 mg/ml para CHCC10019.

Ambas cepas silvestres presentan actividad β -galactosidasa, y las colonias silvestres aparecieron de color azul debido a la actividad de la β -galactosidasa.

10 A partir de CHCC10019, se aisló un mutante deficiente en lactosa y se designó como CHCC18994.

A partir de CHCC15914, se aislaron dos mutantes deficientes en lactosa y se designaron como CHCC17861 y CHCC17862, respectivamente.

Se determinaron las características de crecimiento de los mutantes deficientes en lactosa aislados de la siguiente manera:

15 Fenotipo de LB CHCC18994: lac-, suc-, gal-, glc+

Fenotipo de ST CHCC17861 : lac-, suc+ , gal+, glc+

Fenotipo de ST CHCC17862: lac-, suc+ , gal+, glc+

Se secuenció el operón lactosa completo para los tres mutantes y se comparó con la cepa silvestre respectiva para revelar el tipo de mutación.

20 La comparación con la cepa madre CHCC15914 reveló que CHCC17861 tenía un nucleótido "T" extra al comienzo del gen *lacZ* (que codifica para la β -galactosidasa) lo que conduce a un codón de terminación en la secuencia codificante unos cuantos nucleótidos de manera posterior a la mutación. CHCC17862 mostró una delección de un nucleótido, también interrumpiendo la secuencia codificante del gen *lacZ*.

25 Para CHCC18994, se identificó una mutación dentro del gen *lacZ*. Esto dio como resultado un intercambio de 8 nucleótidos (de 5'-CTT CCA AGC-3' a 5'-CGC TAC TAT-3') y, por consiguiente, un cambio de 3 aminoácidos (de Leu-Pro-Ser a Arg-Tyr-Tyr) dentro de *lacZ*, que explica el fenotipo deficiente en lactosa.

30 Todos los mutantes cuando se usan como cepas individuales o en combinación (ST + LB), acidifican la leche dependiendo de la adición de un hidrato de carbono fermentable diferente de lactosa. Se determinó la actividad de acidificación de los cultivos deficientes en lactosa, por ejemplo usando cultivos durante la noche en MRS (LB silvestre y mutante lac de LB); M17 con lactosa al 1% (ST silvestre); o M17 con diferentes concentraciones de sacarosa (al 1% y al 0,5%; fermentación con el mutante lac ST). Se inoculó la leche y se monitorizó la fermentación por el desarrollo de pH a 37°C.

35 El desarrollo de pH a la temperatura de fermentación a lo largo de 20 y 40 horas se ilustra en las figuras 2 y 3, respectivamente y muestra que se metaboliza sacarosa por las cepas deficientes en lactosa produciendo un proceso de fermentación que es casi tan rápido como el proceso provocado por las LAB parentales que tienen la capacidad de metabolizar lactosa. El proceso de fermentación impulsado por sacarosa se termina inmediatamente y entra en una línea plana cuando se agota la sacarosa. Después de la terminación de la fermentación provocada por el agotamiento de los hidratos de carbono, el pH permaneció estable a aproximadamente pH 4,5. Se halló un pH final muy estable cuando se usaron CHCC17861, CHCC17862 o CHCC18994 como cepas individuales, o como mezcla de uno de los mutantes ST junto con el mutante LB (se muestra la mezcla en la figura 3). Esto se asemeja al cultivo iniciador que va a usarse en un método de fermentación para producir un yogur típico.

40 No pudieron observarse diferencias significativas entre las cepas CHCC17861 y CHCC17862. Por tanto, la adición de sacarosa proporciona un control muy preciso de la actividad de acidificación.

45 En algunas fermentaciones, se observó la formación de un "hombro" dentro de las curvas de pH de los cultivos mezclados, indicando que el metabolismo cambió antes de que se detuviera por completo la producción de ácido (figura 3). Para investigar esto adicionalmente se cambió la razón de ST: LB y esto condujo a un cambio en la formación del hombro. La disminución de la concentración de la cepa lac-ST y el aumento de la lac-LB dieron como resultado una reducción del hombro de pH y una "curva" de pH incluso más horizontal.

50 De manera interesante, por otra parte, el uso de ST CHCC17861 al 100% conduce a una producción de ácido completamente interrumpida cuando se agota la sacarosa y elimina el hombro de pH, pero la reducción del pH se detiene a un valor de pH 0,3 puntos mayor (figura 3).

En todos los casos, el pH permaneció estable a 4,75 hasta el final del periodo de fermentación (48 horas).

En la fermentación conjunta de ST/LB, la parte de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es responsable de la reducción de pH final y también de una parte importante de la acidificación posterior. Por este motivo, la concentración de LB es menor que la concentración de ST en la mayoría de procedimientos de fermentación de yogur.

5

Esto muestra que el valor de pH puede controlarse por completo mediante la concentración de la sacarosa u otro hidrato de carbono fermentable añadido, ya que puede aumentar fácilmente *Lb. Bulgaricus*.

El cultivo de lac no sólo dará como resultado un mayor pH final después de por ejemplo 6 horas, sino que también tendrá una acidificación posterior significativamente menor y, por tanto, una vida útil ampliada.

10 En algunos experimentos, se observó que el pH era muy estable durante aproximadamente 5 horas después de la terminación de la fermentación y luego disminuía ligeramente a lo largo de las 10 horas siguientes (datos no mostrados). Esto se debe aparentemente a reversiones espontáneos, es decir LAB que adquieren la capacidad para utilizar lactosa mediante mutación espontánea.

Depósito y solución para expertos

15 El solicitante pide que una muestra de microorganismos depositada para la presente solicitud tal como se describe a continuación sólo pueda ponerse a disposición de un experto, hasta la fecha en que se conceda la patente.

Se depositó *Streptococcus thermophilus* CHCC15914 ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28909.

20 Se depositó *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CHCC18994 ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28910.

Se depositó *Streptococcus thermophilus* CHCC17861 ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28952.

25 Se depositó *Streptococcus thermophilus* CHCC17862 ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28953.

Se realizó el depósito según el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes.

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de un producto de leche fermentada, que comprende una etapa en la que se fermenta leche, en el que:
 - 5 (a) se inicia la fermentación por un cultivo iniciador, cultivo iniciador que comprende bacterias del ácido láctico que pueden metabolizar uno o varios hidratos de carbono añadidos a la leche,
 - (b) se termina la fermentación mediante una disminución de la concentración del uno o varios hidratos de carbono durante la fermentación, en el que la terminación de la fermentación se controla mediante la concentración de hidratos de carbono en la leche que va a fermentarse, y en el que a la terminación de la fermentación, la concentración del hidrato de carbono metabolizado por las bacterias del ácido láctico está
 - 10 en el intervalo de entre 5 mg/g y 0,01 mg/g,
 - (c) la disminución también está provocada al menos por la actividad metabólica de las bacterias del ácido láctico, y
 - (d) se lleva a cabo la fermentación mediante un método que usa un cultivo iniciador que comprende al menos un *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa y al menos un *Lactobacillus delbrueckii* subsp.
 - 15 *bulgaricus* deficiente en lactosa,

en el que el hidrato de carbono es un hidrato de carbono fermentable diferente de lactosa.
2. Método de producción de un producto de leche fermentada según la reivindicación 1, en el que las bacterias del ácido láctico no pueden metabolizar lactosa y en el que antes de la adición del cultivo iniciador, la concentración total de hidratos de carbono que pueden metabolizarse por las bacterias del
 - 20 ácido láctico en la leche es inferior a 45 mg/g.
3. Método de producción de un producto de leche fermentada según una de las reivindicaciones 1 a 2, en el que se lleva a cabo la fermentación a una temperatura de entre 30 y 45°C.
4. Método de producción de un producto de leche fermentada según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que después de la terminación de la fermentación, se envasa el producto fermentado a una temperatura de
 - 25 entre 15 y 45°C.
5. Cepa de LAB aislada, caracterizada como:
 - (a) una cepa de *Streptococcus thermophilus*, cepa que es:
 - (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28952; o
 - 30 (b) una cepa de *Streptococcus thermophilus*, cepa que es:
 - (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28953.
6. Producto alimenticio fermentado, que comprende una o varias de las siguientes cepas:
 - (a) una cepa de *Streptococcus thermophilus*, cepa que es:
 - (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28952; o
 - 35 (b) una cepa de *Streptococcus thermophilus*, cepa que es:
 - (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28953; y
 - 40 opcionalmente
 - (c) una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, cepa que es:
 - (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28910.
7. Composición que comprende
 - 45 (a) una cepa de *Streptococcus thermophilus*, cepa que es:
 - (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

ES 2 672 978 T3

GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28952, o

(b) una cepa de *Streptococcus thermophilus*, cepa que es:

- (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28953;

5

y

(c) una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, cepa que es:

- (i) la cepa depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el n.º de registro DSM 28910.

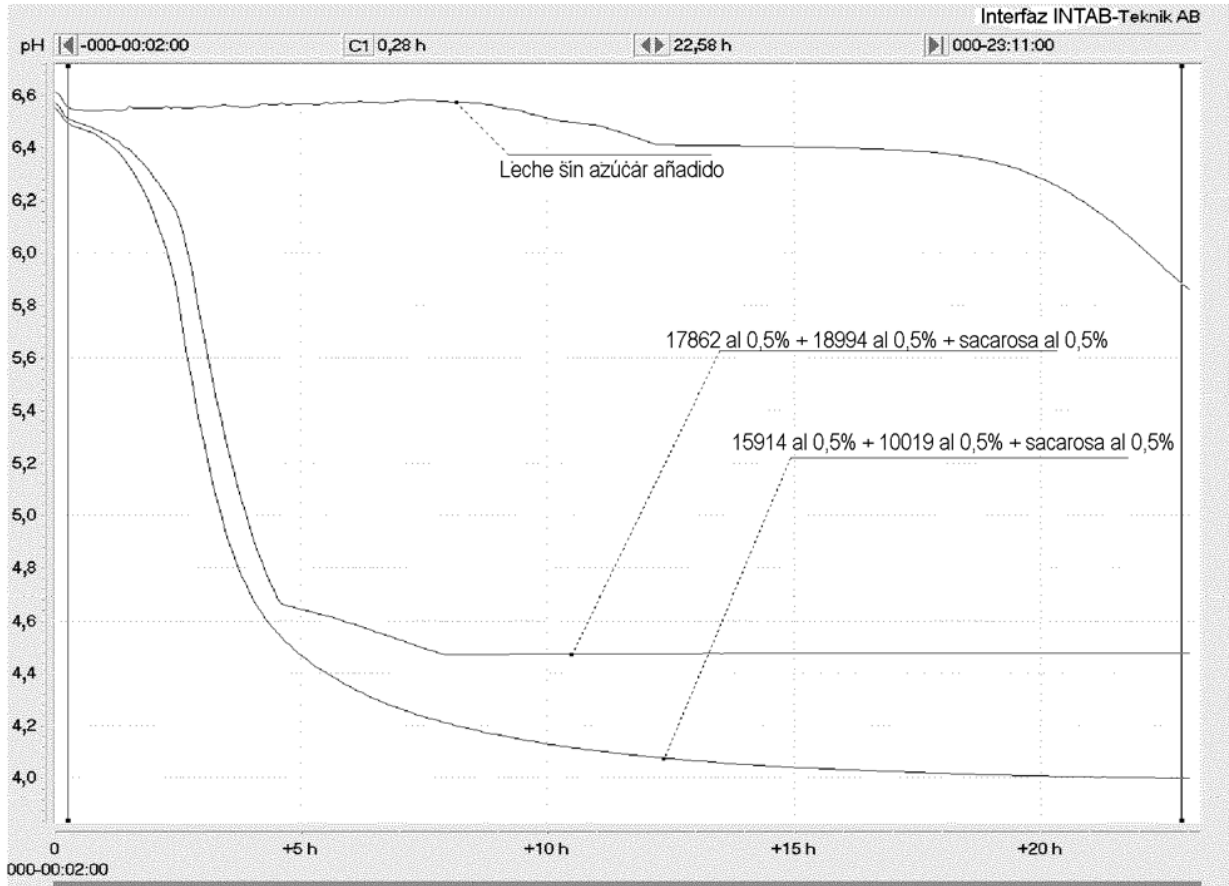


Figura 1

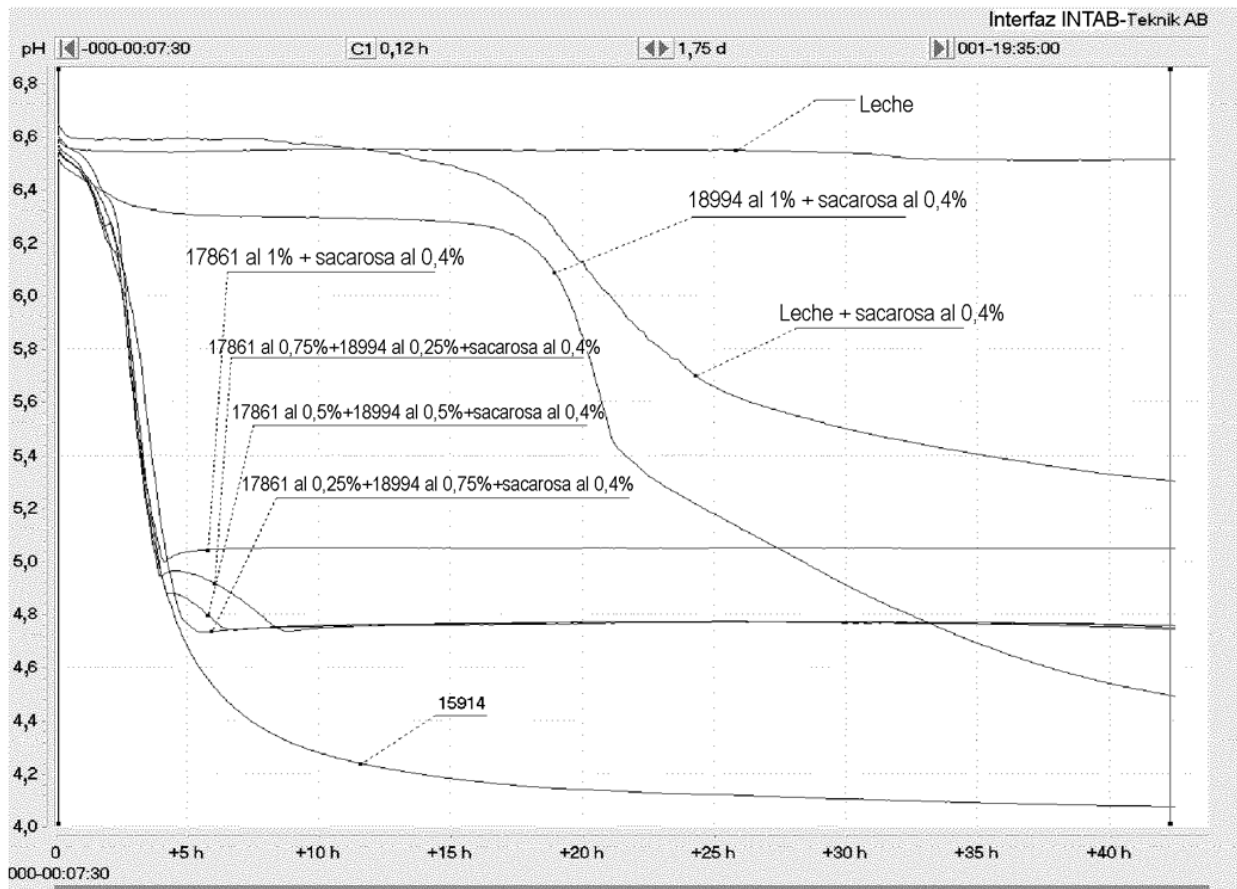


Figura 2