

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 353**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/04 (2006.01)

A23C 9/12 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2007 PCT/IB2007/001882**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2008 WO08038075**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2007 E 07734953 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2082028**

54 Título: **Método para preparar cultivos líquidos microbianos que tienen alta estabilidad y actividad fermentativa**

30 Prioridad:

27.09.2006 IT MI20061841

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

29.06.2018

73 Titular/es:

**MOFIN S.R.L. (100.0%)
Via Pietro Custodi, 12
28100 Novara, IT**

72 Inventor/es:

**MOGNA, GIOVANNI y
BRUNO, FEDERICO**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 674 353 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 cultivos líquidos microbianos que tienen alta estabilidad y actividad fermentativa

- 5 La presente invención se refiere a un método para preparar un cultivo microbiano líquido, preferiblemente con inoculación directa, caracterizado por un mayor número de células microbianas por unidad de volumen de cultivo que el de cultivos conocidos/tradicionales similares, así como por una estabilidad y actividad fermentativa aumentadas con respecto a esto. Dicho cultivo es preferiblemente un cultivo iniciador líquido.
- 10 El término cultivo iniciador se refiere a cultivos bacterianos que comprenden microorganismos adecuados que se añaden a varios tipos de alimentos para mejorar sus propiedades (por ejemplo, propiedades nutritivas, higiénicas y organolépticas).
- 15 Los cultivos iniciadores tal como se conocen en el presente (obtenidos con métodos tradicionales, comúnmente usados en tecnologías de fermentación) están disponibles comercialmente en una variedad de formas: cultivos líquidos, cultivos secados (habitualmente mediante secado por pulverización), cultivos congelados, cultivos liofilizados).
- 20 El método para obtener la biomasa microbiana que va a usarse como iniciador incluye el desarrollo del cultivo bacteriano en un biorreactor o fermentador.
- El modo de hacer crecer microorganismos en el biorreactor que más se explota a nivel industrial es el denominado procesamiento por lotes (procesamiento de sistema cerrado); en algunos casos solo se usa un crecimiento continuo.
- 25 En el cultivo por lotes, se inoculan microorganismos en forma de cultivos madre en un volumen dado de medio de cultivo líquido (que varía según el biorreactor que se usa), luego se tratan previamente de manera térmica a 85 °C-122 °C durante aproximadamente 15-40 minutos. Dicho medio de cultivo está compuesto por diversos materiales de partida seleccionados, según el microorganismo que va a desarrollarse, entre: agua, fuentes de nitrógeno y/o carbono, sales minerales y activadores del crecimiento, aditivos.
- 30 Tras la inoculación, que se lleva a cabo a la temperatura óptima para el crecimiento de las especies que van a producirse, las células del/de los microorganismo(s) experimentan una fase de crecimiento exponencial, tras un periodo latente inicial requerido para la síntesis de nuevas enzimas y/o coenzimas. Durante dicha fase de crecimiento, se consumen los nutrientes y se acumulan progresivamente productos de crecimiento (biomasa, metabolitos). El entorno nutritivo dentro del biorreactor está, por tanto, sujeto a variaciones continuas, que conducen a su vez a cambios en el metabolismo celular.
- 35 La fase de crecimiento exponencial anterior termina tras algún tiempo y las células dejan de duplicarse, básicamente por dos motivos:
- 40 - agotamiento de uno o más nutrientes esenciales en el medio de cultivo y/o
- acumulación hasta niveles de inhibición de sustancias (metabolitos) generadas por el metabolismo de dichos microorganismos.
- 45 Dichos metabolitos están compuestos sobre todo por ácidos orgánicos, tales como ácido láctico y ácido acético, producidos por la fermentación de los azúcares. El efecto principal es predominantemente una disminución de pH progresiva del medio de cultivo. El aumento de la concentración de ion hidrógeno implica en primer lugar el caldo de crecimiento de cultivo y luego, tras pasar a través de la membrana celular, también el citoplasma bacteriano. Al inicio
- 50 la célula compensa la entrada de iones hidrógeno por medio de una bomba de ion hidrógeno diseñada para secretar iones H⁺ que están presentes en el citoplasma. Sin embargo, cuando el pH celular se vuelve demasiado bajo, la bomba de iones hidrógeno pierde su efectividad y la concentración intracelular de ion hidrógeno tiende a aumentar.
- Hay básicamente dos consecuencias de este fenómeno. Por un lado, se impide un crecimiento celular adicional y, por otro lado, la vitalidad de la biomasa en sí disminuye, reduciendo como resultado la actividad fermentativa para una aplicación futura (por ejemplo, durante la elaboración de queso). La población microbiana alcanza, por tanto, la denominada fase estacionaria, durante la cual no hay un aumento ni una disminución en el número de células.
- 55 Un cultivo obtenido con procesamiento por lotes tiene una capacidad de almacenamiento bastante limitada, según las condiciones de almacenamiento y el estado fisiológico de la biomasa al final del proceso de producción. Una refrigeración rápida al final de la incubación puede permitir almacenar el iniciador también durante 3-4 días sin pérdidas significativas de vitalidad y actividad.
- 60 La carga microbiana por unidad de volumen de cultivo (o concentración celular final del/de los microorganismo(s) del cultivo) que caracteriza a los cultivos iniciadores líquidos conocidos en el presente es de máximo 0,5-1 miles de millones de células/ml de cultivo (expresado como UFC/ml, unidades formadoras de colonias/ml, es decir 0,5x10⁹-
- 65

1×10^9 UFC/ml) pero a menudo no supera los 200 millones de células/ml de cultivo (2×10^8 UFC/ml).

La fase final en la preparación de un cultivo iniciador líquido incluye envasado en entornos adecuadamente estériles de volúmenes de cultivo adecuados (como norma 50 litros) que contienen: agua, la biomasa microbiana, los metabolitos producidos por dicha biomasa durante la fase de crecimiento, que se han acumulado gradualmente en el medio de cultivo y residuos de componentes del medio de cultivo.

Dichos cultivos iniciadores líquidos se almacenan a una temperatura de 3 °C a 10 °C, preferiblemente de 3 °C a 5 °C. Por tanto, también la distribución de cultivos iniciadores líquidos debe necesariamente usar la cadena de frío, que afecta mucho al coste del producto terminado.

En la preparación de cultivos deshidratados (secados o liofilizados) o congelados, se requieren fases adicionales, es decir:

- separar la biomasa microbiana del medio de cultivo por medio de un proceso de aislamiento adecuado (basándose habitualmente en el uso de fases de centrifugación o filtración);

- lavar dicha biomasa en un volumen adecuado de un líquido, preferiblemente medio isotónico, para eliminar los residuos del medio de cultivo;

- volver a concentrar mediante filtración o centrifugación;

- deshidratar (habitualmente mediante liofilización) o congelar tras la adición de crioprotectores adecuados.

Los cultivos deshidratados también pueden almacenarse a temperatura ambiente durante largos periodos y, como resultado, la distribución de los mismos es más fácil. En cualquier caso, todavía se prefiere almacenar y distribuir dichos cultivos en condiciones refrigeradas, puesto que esto amplía adicionalmente su vitalidad.

El uso de cultivos iniciadores líquidos tiene la enorme ventaja de proporcionar al producto final (por ejemplo, un producto lácteo) mejores propiedades organolépticas que las de aquellos que pueden obtenerse usando cultivos congelados o deshidratados. De hecho, la preparación de cultivos iniciadores líquidos que no son líquidos incluye la eliminación de la biomasa microbiana de los metabolitos que están presentes en el medio de cultivo. Sin embargo, dichos metabolitos contribuyen mucho al desarrollo del sabor y, más generalmente, de las propiedades organolépticas globales del producto terminado: por tanto, se prefiere su presencia en el iniciador.

Pueden aplicarse cultivos iniciadores líquidos conocidos mediante inoculación directa de los materiales de partida que van a transformarse, o requieren algunas fases intermedias para la amplificación de dicho cultivo para aumentar la población bacteriana del mismo (inoculación semidirecta). La mayoría de los cultivos iniciadores líquidos se sitúan en la segunda categoría y, por tanto, requieren de 1 a 4 fases de reproducción microbiana. Dicha operación implica conocimiento y equipos adecuados para evitar posibles contaminaciones con contaminantes o fagos, desequilibrios en la composición y/o pérdida de actividad biológica del cultivo en sí.

Por tanto, el uso de cultivos iniciadores líquidos con inoculación directa parece ser ventajoso en principio con respecto a cultivos con inoculación semidirecta, que requieren tiempos más largos y equipos adicionales para llevar a cabo la fase de amplificación de dicho cultivo.

En el campo de los lácteos, por ejemplo, la cantidad necesaria de cultivo iniciador líquido varía entre un producto lácteo y otro, según la inoculación prevista para cada tipo de elaboración de queso y la densidad celular del cultivo.

En general, la inoculación permite obtener en la leche una concentración de células vitales de aproximadamente 10-25 millones de células/ml (1×10^7 - $2,5 \times 10^7$ UFC/ml). Puesto que un cultivo iniciador comercial/tradicional contiene un máximo de $0,5 \times 10^9$ - 1×10^9 UFC/ml, la inoculación representa en volumen del 1 % al 5 % del volumen de leche total. Por tanto, se requerirán 10-50 litros de cultivo iniciador tradicional para inocular 1.000 litros de leche y luego llevar a cabo la actividad fermentativa necesaria, que puede medirse por medio de disminución de pH en la leche en función del tiempo.

El ejemplo anterior ha demostrado que los volúmenes implicados son bastante altos y, por tanto, difíciles de manejar, sobre todo en lo que respecta a la red de distribución.

Además, la menor capacidad de almacenamiento (máximo 4-5 días, cuando la temperatura de almacenamiento del cultivo es de 3 °C a 5 °C) de cultivos iniciadores líquidos conocidos arriesga su capacidad para soportar tiempos de envío más largos, limitando por tanto su uso a áreas que están más próximas a la planta de producción. La gestión de cultivos iniciadores líquidos conocidos, especialmente de aquellos con inoculación directa, da como resultado globalmente graves problemas logísticos debido a los altos volúmenes y baja capacidad de almacenamiento de los mismos.

Por los motivos mencionados anteriormente, los cultivos iniciadores líquidos conocidos se han reemplazado casi de manera universal por cultivos deshidratados y por cultivos congelados. Sin embargo, los productos lácteos obtenidos con dichos cultivos tienen menos propiedades organolépticas globales válidas que los productos preparados usando cultivos iniciadores líquidos.

5 Por tanto, todavía existe la necesidad de cultivos iniciadores que tengan al mismo tiempo las características favorables de los cultivos iniciadores líquidos (especialmente en cuanto a mejores propiedades organolépticas de los productos obtenidos de los mismos) junto con la gestión global mucho más fácil que caracteriza los cultivos congelados o deshidratados.

10 En el presente no se conocen cultivos iniciadores líquidos que tengan las características mencionadas anteriormente.

15 Barrette, J. *et al.* (*Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2000, vol. 25, n.º 6, páginas 288-297) se refiere a la producción de cultivos mixtos que contienen cepas de *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc cremoris* y *Lactobacillus rhamnosus* en medios iniciadores comerciales.

20 Hamdi, M. *et al.* (*Bioprocess engineering* 2000, vol. 22, páginas 23-27) describen el efecto de complemento con licor de maceración del maíz y la ampliación en la producción de iniciador de *Lactococcus*.

Champagne, C.P. *et al.* (*Milchwissenschaft* 1996, vol. 51, 561-564) proporcionan una comparación de leche con respecto a diversos medios de concentrado de proteína de suero lácteo para la producción de iniciadores usados en el proceso de fabricación de queso.

25 Parente, E. *et al.* (*Journal of Dairy Science* 1991, vol. 74, páginas 20-28) describen el crecimiento de iniciadores termófilos en medios permeados de suero lácteo.

30 Champagne C. P. *et al.* (1995, vol. 15, páginas 472-479) comparan las características de cultivos de *Lactococci* producidos en medios comerciales e indican que el efecto protector de los medios obtenidos por un método que incluye el control del pH externo (EC) en la estabilidad del cultivo estaría limitado.

35 El objetivo de la presente invención es responder adecuadamente a la necesidad a la que se hace referencia anteriormente. Este objetivo y otros, que serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los ha logrado el solicitante, que de manera inesperada encontró que un control adecuado del pH del medio de cultivo cuando se produce la biomasa permite obtener un cultivo iniciador líquido final caracterizado por un mayor número de células que los cultivos iniciadores líquidos tradicionales.

Por tanto, la presente invención se refiere al cultivo iniciador líquido anterior.

40 Un objeto de la presente invención es un método para producir dicho cultivo iniciador líquido, cuyas características se divulgan en la reivindicación independiente adjunta.

45 La presente invención se refiere además al uso del cultivo iniciador líquido anterior para preparar productos alimenticios industriales.

50 La presente invención se refiere además al uso de dicho cultivo iniciador líquido en el campo de los lácteos. En las reivindicaciones dependientes adjuntas se divulgan realizaciones preferidas de la presente invención. En el marco de la presente invención, el término capacidad de almacenamiento de un cultivo iniciador líquido se refiere al lapso de tiempo en el que la concentración de células microbianas vitales en dicho cultivo permanece aproximadamente constante.

El término concentración celular se refiere al número de células microbianas vitales (medido como unidades formadoras de colonias o UFC) por unidad de volumen de cultivo.

55 Se determina la concentración celular por medio de uno o más recuentos vitales, generalmente sobre placas. Tal método consiste en determinar el número de células presente en un medio de fermentación que pueden formar colonias sobre placas de laboratorio que contienen un volumen adecuado (generalmente 10 ml) de un medio de agar. La actividad fermentativa de un cultivo iniciador líquido se determina midiendo la disminución del pH en el tiempo de un volumen dado de un líquido adecuado, preferiblemente leche, tras la inoculación con un volumen dado de dicho cultivo.

60 La capacidad de almacenamiento de un cultivo iniciador líquido se refiere al mantenimiento en el tiempo de la actividad fermentativa de dicho cultivo y depende del estado fisiológico promedio de la población bacteriana en preparación. Un cultivo iniciador líquido puede definirse como válido/eficaz hasta que su capacidad para descender el pH de un volumen de un líquido adecuado, generalmente leche, permanece casi inalterado a lo largo del tiempo.

Las características y ventajas de la presente invención se señalan en la siguiente descripción detallada; además, se divulgan adicionalmente a modo de ejemplo también en las figuras adjuntas 1-4 y en las tablas adjuntas 1-4 en relación con dichas figuras, en las que:

5 - la figura 1 es un gráfico del desarrollo del pH a lo largo del tiempo de un cultivo iniciador líquido conocido (identificado como "no enriquecido") y de un cultivo iniciador líquido según la presente invención (identificado como "enriquecido"), tanto durante la fase de producción como durante el almacenamiento de dichos cultivos; las mediciones se han llevado a cabo hasta 6 días desde el envasado para el cultivo tradicional, y hasta 15 días desde el envasado para el cultivo enriquecido, respectivamente; el almacenamiento para ambos cultivos se produce a una temperatura promedio de 4 °C a 5 °C;

10 - la figura 2 contiene los valores de concentración celular de un cultivo iniciador líquido tradicional (no enriquecido) y de un cultivo iniciador líquido según la invención (enriquecido), respectivamente, obtenido con los métodos de producción correspondientes; dichos valores de concentración se expresan como UFC/ml (el término nE+p en la ordenada corresponde a $n \times 10^p$ UFC/ml);

15 - la figura 3 muestra un gráfico de la actividad fermentativa de un cultivo iniciador líquido no enriquecido y de un cultivo iniciador líquido enriquecido según la invención, respectivamente; dichas actividades se expresan mostrando el desarrollo en el tiempo de la disminución del pH de una leche inoculada con dichos cultivos; el cultivo iniciador líquido no enriquecido se ha inoculado hasta el 5 % en volumen (V/V), mientras que el cultivo iniciador líquido enriquecido se ha inoculado hasta el 0,5 % en volumen, es decir 10 veces menos; el gráfico señala claramente que el cultivo iniciador líquido enriquecido según la presente invención muestra la misma actividad fermentativa que el cultivo no enriquecido conocido a una dosis que es 10 veces menor (por tanto, si la dosis es la misma, se caracteriza por una actividad fermentativa que es 10 veces mayor);

20 - la figura 4 muestra la capacidad de almacenamiento (expresada en días) de un cultivo iniciador líquido no enriquecido y de un cultivo iniciador líquido enriquecido según la invención; la capacidad de almacenamiento se ha evaluado midiendo en momentos sucesivos la actividad fermentativa del cultivo;

25 - la tabla 1 muestra los valores de pH de las diversas fases de producción y almacenamiento que dieron como resultado los gráficos de la figura 1;

30 - la tabla 2 muestra los valores de concentración celular, expresados como UFC/ml, que dieron como resultado el histograma de la figura 2;

35 - la tabla 3 muestra los valores de pH que dieron como resultado la figura 3;

40 - la tabla 4 muestra datos respecto a la estabilidad del cultivo, durante almacenamiento a una temperatura de 3 °C a 5 °C, que dieron como resultado la figura 4.

45 La presente memoria descriptiva describe un cultivo iniciador líquido ("enriquecido") que comprende al menos un microorganismo que es fisiológicamente compatible con organismos humanos y/o animales, caracterizado en que la concentración celular de dicho microorganismo en dicho cultivo (también denominado "carga microbiana") es mayor que la concentración celular máxima de cultivos iniciadores líquidos conocidos.

Dicho microorganismo se elige entre cepas bacterianas que tienen una valencia probiótica.

50 La concentración celular de dicho cultivo iniciador líquido es como norma >1,5 veces la de cultivos iniciadores líquidos conocidos.

Dicho cultivo líquido tiene una concentración celular que es $\geq 2,5$ veces la concentración de cultivos iniciadores líquidos conocidos; preferiblemente, dicha concentración es ≥ 6 veces la de cultivos iniciadores líquidos conocidos.

Más preferiblemente, dicha concentración es ≥ 10 veces la de cultivos iniciadores líquidos conocidos.

55 Por tanto, el cultivo iniciador líquido se caracteriza por una concentración celular de $>10^9$ UFC/ml de cultivo; preferiblemente, $>1,5 \times 10^9$ UFC/ml de cultivo.

60 El cultivo iniciador líquido anterior se caracteriza por una concentración celular de $>2,5 \times 10^9$ UFC/ml de cultivo, preferiblemente, $>6 \times 10^9$ UFC/ml. Más preferiblemente dicha concentración es de $>10^{10}$ UFC/ml.

De manera bastante inesperada, el cultivo iniciador líquido obtenido según la presente invención ha demostrado estar caracterizado por una excelente capacidad de almacenamiento.

65 El cultivo iniciador líquido obtenido según la presente invención se caracteriza por una mayor capacidad de almacenamiento que los cultivos iniciadores líquidos conocidos.

5 El cultivo iniciador líquido anterior obtenido según el método de la invención tiene una capacidad de almacenamiento que es >1,5 veces la capacidad de almacenamiento de cultivos iniciadores líquidos conocidos; preferiblemente, dicha capacidad de almacenamiento es >2,5 veces mayor. Más preferiblemente, dicha capacidad de almacenamiento es >4 veces en comparación con la capacidad de almacenamiento de cultivos iniciadores líquidos conocidos. El cultivo iniciador líquido obtenido según la presente invención, por tanto, se caracteriza por una capacidad de almacenamiento de ≥ 6 días, a una temperatura de almacenamiento promedio de 3 °C a 5 °C.

10 En una realización preferida de la invención, dicho cultivo iniciador líquido tiene una capacidad de almacenamiento de $\geq 7,5$ días; preferiblemente, dicha capacidad de almacenamiento es de ≥ 10 días. Más preferiblemente, dicha capacidad de almacenamiento es de ≥ 13 días.

15 La capacidad de almacenamiento se evalúa siempre en referencia a una temperatura de almacenamiento promedio de 3 °C a 5 °C.

Ventajosamente, el cultivo de almacenamiento líquido obtenido según la presente invención tiene una actividad fermentativa mayor que los cultivos iniciadores líquidos conocidos.

20 Dicha actividad fermentativa ha demostrado ser en promedio al menos 2 veces mayor que la de cultivos iniciadores líquidos conocidos.

25 Dicho cultivo iniciador líquido tiene una actividad fermentativa de 4 a 35 veces mayor que la actividad fermentativa de cultivos iniciadores líquidos conocidos; preferiblemente, dicha actividad es 8 a 30 veces mayor. Más preferiblemente, dicha actividad fermentativa es 12 a 25 veces mayor que la actividad de cultivos iniciadores líquidos conocidos.

El cultivo iniciador líquido es preferiblemente un cultivo con inoculación directa.

30 El método para obtener un cultivo iniciador líquido enriquecido según la presente invención incluye al menos una etapa que consiste en controlar el pH del medio de cultivo. Dicha etapa de control del pH puede aplicarse tanto al crecimiento por lotes como al continuo de la biomasa microbiana.

35 Durante dicha etapa de control, se mantiene el pH como norma dentro de un intervalo de 4,5 a 7,0; preferiblemente dicho intervalo de pH es de 5,5 a 6,5; más preferiblemente, de 5,6 a 6,2.

En una realización preferida, el pH es de 5,7 a 6,0.

40 Con el fin de realizar control del pH tal como se describió anteriormente, el solicitante ha encontrado útil añadir al medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos al menos una base o una mezcla adecuada de bases.

45 Preferiblemente, dicha al menos una base se añade al medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos progresivamente, para permitir que el pH se mantenga dentro de los valores a los que se hace referencia anteriormente durante el tiempo requerido para obtener el grado deseado de crecimiento del/de los microorganismo(s).

50 La base se elige del grupo que comprende: ion carbonato, en formas mono y/o dibásicas, amoníaco, hidróxidos, por ejemplo, hidróxidos de amonio, sodio, potasio y otros, ion fosfato, en formas mono y/o di y/o tribásicas, ion sulfato, en formas mono y/o dibásicas, iones citrato, ion tartrato, otras bases que son fisiológicamente compatibles con microorganismos de cultivo, y/o mezclas de los mismos.

55 En una realización preferida, la base usada para mantener los valores de pH del medio de cultivo aproximadamente constantes es ion carbonato, en formas mono y/o dibásicas; dicho ion carbonato deriva de cualquier fuente adecuada del mismo: preferiblemente a partir de la disolución de carbonato de calcio.

En otra realización preferida, la base usada es amoníaco y/o hidróxido de amonio.

La base neutraliza iones hidrógeno que derivan de la disociación de ácidos orgánicos que se forman durante la fermentación de los diversos sustratos orgánicos gracias a la biomasa microbiana.

60 Dicha etapa de controlar el pH del medio de cultivo se inicia preferiblemente de manera automática cuando el medio de cultivo alcanza un umbral de pH preestablecido, tras un lapso de tiempo según el tipo de microorganismo en crecimiento y las condiciones de cultivo usadas.

65 La duración de la etapa de control del pH (es decir, el tiempo durante el cual dicha al menos una base se añade progresivamente al medio de cultivo) se extiende durante un tiempo que se corresponde generalmente con el requerido por el microorganismo para someterse a de 2 a 5 divisiones celulares o duplicaciones celulares, durante la

fase de crecimiento exponencial.

El tiempo requerido para que se produzca una duplicación celular varía según el tipo de microorganismos y las condiciones de cultivo usadas para dicho microorganismo. Dicho tiempo de duplicación se determina *a priori* para cada microorganismo individual con métodos conocidos, comúnmente usados por todos los técnicos expertos.

Una vez que dicha etapa de control del pH se termina, dicho pH se deja descender de manera espontánea y gradual durante un tiempo de 0,5 a 1 veces mayor que el tiempo requerido para que el/los microorganismo(s) experimente(n) una duplicación celular. El valor de pH final así obtenido varía de especie a especie.

El pH final del cultivo iniciador líquido así obtenido es generalmente de 4,7 a 5,6; preferiblemente, es de 5,0 a 5,2.

Ahora el cultivo final que contiene agua, la biomasa microbiana, los metabolitos producidos por dicha biomasa durante la fase de crecimiento, y los residuos de componentes del medio de cultivo, si están presentes, se enfrían hasta una temperatura de 4 °C a 8 °C para obtener el producto terminado, es decir el cultivo iniciador líquido enriquecido según la presente invención.

El cultivo iniciador líquido enriquecido así obtenido se envasa directamente y se almacena a 3-5 °C, antes de enviarse al uso biotecnológico comercial para el que se ha producido.

Con el método de control del pH del medio de cultivo tal como se describió anteriormente, ha sido posible obtener, ventajosamente y de manera repetible, un mayor desarrollo de la biomasa en el entorno del biorreactor, una mayor vitalidad, una mayor capacidad de almacenamiento, una actividad fermentativa aumentada de dicha biomasa.

Todavía ventajosamente, el cultivo iniciador obtenido con el método según la presente invención ha demostrado estar básicamente libre de azúcares residuales. De hecho, se ha encontrado que, durante la fase de crecimiento exponencial según el método de la presente invención, las fuentes de carbono y/o de energía (en particular de azúcares), que están presentes como materiales de partida que constituyen el medio de cultivo, se explotan casi completamente. Tal situación permite reducir mucho (si no eliminar completamente) la denominada fase de postacidificación, que en cultivos iniciadores conocidos tiene lugar de manera espontánea tras envasar el cultivo, simplemente por la presencia de cantidades residuales significativas de dichos azúcares. Dicha fase de postacidificación afecta negativamente a la estabilidad del producto terminado debido al uso de los azúcares residuales por la biomasa, dando como resultado, por tanto, una producción adicional de ácidos orgánicos y una disminución adicional del pH del cultivo iniciador líquido. La postacidificación, que se produce inevitablemente en cultivos iniciadores líquidos conocidos, reduce por tanto el pH del cultivo hasta valores (que varían según la especie microbiana) de 4,0 a 4,6, a veces incluso por debajo de 3,8, afectando, por tanto, negativamente a la vitalidad y capacidad de almacenamiento de dicho cultivo.

La eliminación sustancial inesperada de la fase de postacidificación ha demostrado ser uno de los posibles factores que contribuyen a la mejora de la estabilidad del producto terminado.

A modo de ejemplo para nada limitativo de una realización, lo siguiente divulga un método general para preparar un cultivo iniciador líquido enriquecido, en el que dicho método incluye preferiblemente las siguientes etapas:

- a) descontaminar el biorreactor haciendo fluir vapor; preferiblemente durante 30 minutos;
- b) tratar térmicamente el medio de cultivo en el reactor; preferiblemente a 85 °C-90 °C durante 20-30 minutos;
- c) enfriar el medio de cultivo hasta la temperatura de inoculación del microorganismo usado;
- d) inocular el medio de cultivo como en la etapa c) con una cantidad eficaz de cultivo madre de al menos un microorganismo bacteriano, o de una mezcla de microorganismos;
- e) esperar el inicio de la fermentación y el inicio de la fase de crecimiento exponencial de la biomasa bacteriana, durante un tiempo según el/los tipo(s) de microorganismo(s) usado(s);
- f) controlar el pH del medio de cultivo, manteniendo dicho valor en un intervalo de 5,7 a 6,0, por medio de adiciones progresivas de hidróxido de amonio y/o carbonato, preferiblemente durante el tiempo requerido para que se produzcan 2-5 duplicaciones celulares del/de los microorganismo(s);
- g) dejar que el pH del medio de cultivo descienda de manera espontánea hasta un valor de 5,0 a 5,2; preferiblemente en un lapso de tiempo suficiente para que se produzca una duplicación celular adicional;
- h) enfriar el cultivo como en la etapa g) hasta una temperatura de 4 °C a 8 °C;
- i) envasar dicho cultivo como en la etapa h) en condiciones estériles.

En una realización preferida, el medio de cultivo como en la etapa b) comprende (cantidades referidas a un litro de medio de cultivo): peptonas de caseína, 10 g; extracto de carne, 5 g; extracto de levadura, 10 g; MgSO₄, 200 mg; dextrosa, 20 g; Tween 80, 1 ml; agua c.s. para 1 l de medio de cultivo final.

En casos particulares, el tratamiento térmico del medio de cultivo como en la etapa b) puede llevarse a cabo a 121 °C durante 15 min.

La temperatura de inoculación como en la etapa c) puede tomar valores promedio de 18 °C a 47 °C, según el microorganismo usado, en las condiciones de crecimiento correspondientes requeridas por dicho microorganismo, y la cantidad de inóculo usado.

Por ejemplo, para microorganismos mesófilos, dicha temperatura es preferiblemente de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 32 °C; para microorganismos termófilos, dicha temperatura es preferiblemente de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 45 °C.

El porcentaje de inóculo (V/V) como en la etapa d) puede variar de desde el 0,5 % al 10 %, según el/los microorganismo(s) que van a hacerse crecer, las características del medio de cultivo, las características de desarrollo de la biomasa microbiana.

Dicho inóculo se obtiene preparando en un biorreactor adecuado con métodos conocidos un cultivo madre del/de los microorganismo(s) deseado(s).

Dicho cultivo madre se prepara a su vez empezando a partir de una muestra, que deriva de una colección celular, mediante amplificaciones o subcultivos sucesivos, en volúmenes progresivamente crecientes de medio.

Dicho cultivo madre puede usarse también en forma deshidratada, si se usan volúmenes de medio de fermentación en promedio por debajo de aproximadamente 10.000 litros. En este caso el inóculo es preferiblemente tal como para proporcionar en promedio 10-25x10⁶ UFC/ml al medio de cultivo inoculado.

Entonces se inocula el cultivo madre así obtenido y se deja desarrollar en el medio de cultivo descrito anteriormente. Preferiblemente, se toman medidas aptas para evitar al máximo posible riesgos de contaminación para el biorreactor: el aire que pasa al interior del compartimento de fermentación se filtra por medio de filtros estériles; el compartimento en sí se esteriliza con vapor a alta temperatura entre un ciclo de producción y el siguiente; también se esterilizan electrodos usados para control del pH y sensores de temperatura; la producción de biomasa tiene lugar en condiciones de sobrepresión de nitrógeno o aire estéril.

En una realización particularmente preferida, el primer envasado del cultivo iniciador líquido enriquecido tal como se describió anteriormente también pretende reducir casi completamente los riesgos de contaminación para el producto, y se produce en entornos específicos con un flujo laminar de aire estéril.

Preferiblemente, se lleva a cabo envasado en bolsas de polietileno/aluminio de 3 a 5 litros, que se llenan con una bomba peristáltica y tubos de silicona esterilizables en autoclave, luego se esterilizan y se conectan directamente al biorreactor. Las bolsas también se sueldan en condiciones estériles. Para el almacenamiento del cultivo iniciador líquido según la presente invención tras el envasado, el último se mantiene preferiblemente a una temperatura de 0-100 °C; más preferiblemente de 3-5 °C.

El cultivo iniciador líquido obtenido mediante el método según la invención comprende al menos una cepa microbiana (o una mezcla de más cepas microbianas) elegida de los grupos que comprenden los géneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*.

Preferiblemente, se han usado las siguientes especies del género *Lactobacillus*: *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei ssp. paracasei*, *L. casei ssp. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. gasserii*.

Preferiblemente, se han usado las siguientes especies del género *Bifidobacterium*: *B. longum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum*, *B. catenulatum*.

Preferiblemente, se han usado las siguientes especies del género *Lactococcus*: *L. lactis* y *L. lactis ssp. lactis*. Preferiblemente, se ha usado la especie *S. thermophilus* del género *Streptococcus*.

-Entre las especies mencionadas anteriormente, las cepas bacterianas enumeradas en la siguiente tabla 5 han demostrado ser particularmente preferidas.

Tabla 5 (*Staphylococcus xylosus* no es parte de la invención reivindicada)

TABLA 5

| N.º | Nombre | Número de depósito | Fecha de depósito | Depositante |
|-----|--|--------------------|-------------------|--|
| 1 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | LMG P-18383 | 5/05/1998 | ANIDRAL S.R.L. |
| 2 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | LMG P-18384 | 5/05/1998 | ANIDRAL S.R.L. |
| 3 | <i>Lactobacillus pentosus</i> | LMG P-21019 | 16/10/2001 | Laboratorio Microbiologico Grana Provolone SRL |
| 4 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | LMG P-21020 | 16/10/2001 | Laboratorio Microbiologico Grana Provolone SRL |
| 5 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | LMG P-21021 | 16/10/2001 | Laboratorio Microbiologico Grana Provolone SRL |
| 6 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | LMG P-21022 | 16/10/2001 | Laboratorio Microbiologico Grana Provolone SRL |
| 7 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | LMG P-21023 | 16/10/2001 | Laboratorio Microbiologico Grana Provolone SRL |
| 8 | <i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>Paracasei</i> | LMG P-21380 | 31/01/2002 | ANIDRAL S.R.L. |
| 9 | <i>Lactobacillus</i> que pertenece al grupo <i>acidophilus</i> | LMG P-21381 | 31/01/2002 | ANIDRAL S.R.L. |
| 10 | <i>Bifidobacterium longum</i> | LMG P-21382 | 31/01/2002 | ANIDRAL S.R.L. |
| 11 | <i>Bifidobacterium breve</i> | LMG P-21383 | 31/01/2002 | ANIDRAL S.R.L. |
| 12 | <i>Bifidobacterium lactis</i> | LMG P-21384 | 31/01/2002 | ANIDRAL S.R.L. |
| 13 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | LMG P-21385 | 31/01/2002 | MOFIN S.R.L. |
| 14 | <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> | LMG P-21387 | 15/03/2002 | MOFIN S.R.L. |
| 15 | <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> | LMG P-21388 | 31/01/2002 | MOFIN S.R.L. |
| 16 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | LMG P-21389 | 15/03/2002 | MOFIN S.R.L. |
| 17 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 16506 | 18/06/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 18 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 16507 | 18/06/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 19 | <i>Bifidobacterium longum</i> | DSM 16603 | 20/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 20 | <i>Bifidobacterium breve</i> | DSM 16604 | 20/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 21 | <i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i> | DSM 16605 | 20/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 22 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> | DSM 16606 | 20/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 23 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> | DSM 16607 | 20/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 24 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 16590 | 20/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 25 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 16591 | 20/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 26 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 16592 | 20/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 27 | <i>Streptococcus</i> | DSM 16593 | 20/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |

ES 2 674 353 T3

| | | | | |
|----|--|-----------|------------|----------------|
| | <i>thermophilus</i> | | | |
| 28 | <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | DSM 16594 | 21/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 29 | <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | DSM 16595 | 21/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 30 | <i>Bifidobacterium breve</i> | DSM 16596 | 21/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 31 | <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> | DSM 16597 | 21/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 32 | <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> | DSM 16598 | 21/07/2004 | ANIDRAL S.R.L. |
| 33 | <i>Staphylococcus xylosus</i> | DSM 17102 | 01/02/2005 | ANIDRAL S.R.L. |
| 34 | <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | DSM 17103 | 01/02/2005 | ANIDRAL S.R.L. |
| 35 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | DSM 17104 | 01/02/2005 | ANIDRAL S.R.L. |
| 36 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 17843 | 21/12/2005 | ANIDRAL S.R.L. |
| 37 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 17844 | 21/12/2005 | ANIDRAL S.R.L. |
| 38 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 17845 | 21/12/2005 | ANIDRAL S.R.L. |
| 39 | <i>Lactobacillus fermentum</i> | DSM 18295 | 24/05/2006 | ANIDRAL S.R.L. |
| 40 | <i>Lactobacillus fermentum</i> | DSM 18296 | 24/05/2006 | ANIDRAL S.R.L. |
| 41 | <i>Lactobacillus fermentum</i> | DSM 18297 | 24/05/2006 | ANIDRAL S.R.L. |
| 42 | <i>Lactobacillus fermentum</i> | DSM 18298 | 24/05/2006 | ANIDRAL S.R.L. |
| 43 | <i>Lactobacillus gasseri</i> | DSM 18299 | 24/05/2006 | ANIDRAL S.R.L. |
| 44 | <i>Lactobacillus gasseri</i> | DSM 18300 | 24/05/2006 | ANIDRAL S.R.L. |
| 45 | <i>Lactobacillus gasseri</i> | DSM 18301 | 24/05/2006 | ANIDRAL S.R.L. |
| 46 | <i>Lactobacillus gasseri</i> | DSM 18302 | 24/05/2006 | ANIDRAL S.R.L. |
| 47 | <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | DSM 18350 | 15/06/2006 | ANIDRAL S.R.L. |
| 48 | <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | DSM 18351 | 15/06/2006 | ANIDRAL S.R.L. |
| 49 | <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | DSM 18352 | 15/06/2006 | ANIDRAL S.R.L. |
| 50 | <i>Bifidobacterium catenulatum</i> | DSM 18353 | 15/06/2006 | ANIDRAL S.R.L. |
| 51 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 18613 | 13/09/2006 | MOFIN S.R.L. |
| 52 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 18614 | 13/09/2006 | MOFIN S.R.L. |
| 53 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 18615 | 13/09/2006 | MOFIN S.R.L. |
| 54 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 18616 | 13/09/2006 | MOFIN S.R.L. |
| 55 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 18617 | 13/09/2006 | MOFIN S.R.L. |
| 56 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 18618 | 13/09/2006 | MOFIN S.R.L. |
| 57 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 18619 | 13/09/2006 | MOFIN S.R.L. |
| 58 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 18620 | 13/09/2006 | MOFIN S.R.L. |
| 59 | <i>Streptococcus</i> | DSM 18621 | 13/09/2006 | MOFIN S.R.L. |

| | | | | |
|----|-----------------------------------|-----------|------------|--------------|
| | <i>thermophilus</i> | | | |
| 60 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 18622 | 13/09/2006 | MOFIN S.R.L. |
| 61 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 18623 | 13/09/2006 | MOFIN S.R.L. |
| 62 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 18624 | 13/09/2006 | MOFIN S.R.L. |
| 63 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | DSM 18625 | 13/09/2006 | MOFIN S.R.L. |

Entre las cepas bacterianas enumeradas en la tabla 5, aquellas desde el número 51 hasta el número 63, que pertenecen al género *Streptococcus*, especie *thermophilus*, son nuevas y se han depositado ante DSMZ ("*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*": Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 13/09/2006 por Mofin S.r.l., Via Pietro Custodi 12 - 28100 NOVARA, con los números de registro: DSM 18613; DSM 18614; DSM 18615; DSM 18616; DSM 18617; DSM 18618; DSM 18619; DSM 18620; DSM 18621; DSM 18622; DSM 18623; DSM 18624; DSM 18625, respectivamente.

Caracterización de las cepas nuevas.

Las cepas nuevas en la tabla 5 (aquellas entre el número 51 y el número 63) se han aislado a partir de diversas muestras de leche de vaca y de iniciadores naturales, tras un tratamiento adecuado tal como contempla comúnmente la técnica conocida específica.

Método de crecimiento:

caldo de medio M17 según Terzaghi (ref. Merck 1.15029);

esterilización: 15 min a 121 °C;

pH antes de la esterilización = 7,35 ± 0,5;

pH tras la esterilización = 7,01 ± 0,5;

incubación: 4 h a 44 °C;

almacenamiento: -25 °C;

prueba de vitalidad: curva de acidificación en la leche a 44 °C.

Descripción:

tienen el aspecto de células esféricas en cadenas cortas; anaerobios opcionales; grampositivas; negativas a la catálisis; no crecen a 10 °C con bilis al 40 % y NaCl al 6,5 %; crecimiento a 45 °C; no dan lugar a β-hemólisis; hidrolizan arginina y esculina; producen ácido L-láctico; pH final tras crecimiento en un medio que contiene glucosa como fuente de energía = 4,0-4,5; pH final tras crecimiento en leche = 4,3-4,5.

En lo que a cepas conocidas enumeradas en la tabla 5 se refiere, se han aislado preferiblemente (según el tipo de cepa) a partir de muestras de leche animal según técnicas conocidas en el campo; o (especialmente en lo que a cepas probióticas se refiere) se han aislado preferiblemente a partir de material fecal humano según técnicas conocidas en el campo (si es necesario, usando también técnicas de cepillado intestinal). Por ejemplo, las cepas que pertenecen al género *Streptococcus*, especie *thermophilus*, a las que se hace referencia con los números 1, 2, 17, 18, 24-27, 36-38 en la tabla 5, tienen las mismas características que las mencionadas anteriormente.

Las cepas que pertenecen al género *Bifidobacterium* (a las que se hace referencia con los números 10-12, 19, 20, 28-32, 34, 47-50 en la tabla 5) se caracterizan por:

crecimiento en medio de extracto de tripticasa-fitona-levadura (TPY) a 37 °C;

tienen el aspecto de bacilos de diversas formas; grampositivas; no rápidas en producción de ácido; no forman esporas; no móviles; anaerobias; degradan la glucosa solo por medio de derivación de fructosa-6-fosfato.

En particular, las cepas a las que se hace referencia con los números 28-32 en la tabla 5 se caracterizan porque producen ácido fólico.

La cepa que pertenece al género *Lactobacillus*, especie *casei* ssp. *rharnosus* (a la que se hace referencia con el

número 21 en la tabla 5) se caracteriza por:

crecimiento en caldo de cultivo MRS (DIFCO, ref. 288130) a 37 °C;

5 tiene el aspecto de bacilos, a menudo con extremos cuadrados y tiende a formar cadenas; opcionalmente realiza heterofermentación; produce ácido L-láctico; puede crecer a temperaturas de 15 °C a 45 °C; tiene una resistencia natural a la vancomicina.

10 Las cepas que pertenecen al género *Lactobacillus*, especie *delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (a las que se hace referencia con los números 22, 23 en la tabla 5) se caracterizan por:

crecimiento en caldo de cultivo MRS (DIFCO, ref. 288130) a 37 °C;

15 tienen el aspecto de bacilos con extremos redondeados, tanto individuales como en cadenas cortas; crecen bien a 45 °C; no generan esporas; grampositivas; realizan obligatoriamente homofermentación; producen ácido D-láctico; fermentan fructosa, glucosa y lactosa únicamente.

20 Las cepas que pertenecen al género *Lactobacillus*, especie *plantarum* (a las que se hace referencia con los números 4-7, 13, 16, 35 en la tabla 5) se caracterizan por:

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

25 tienen el aspecto de bacilos cortos, tanto individuales como en cadenas cortas; crecen bien a 30 °C; no generan esporas; grampositivas; realizan opcionalmente heterofermentación.

Las cepas que pertenecen al género *Lactobacillus*, especie *fermentum* (a las que se hace referencia con los números 39-42 en la tabla 5) se caracterizan por:

origen: a partir de cepillado intestinal;

30 crecimiento en caldo de cultivo MRS (DIFCO, ref. 288130) a 37 °C;

35 tienen el aspecto de bacilos cortos; crecen bien a de 37 °C a 45 °C; realizan obligatoriamente heterofermentación; producen ácido DL-láctico.

Las cepas que pertenecen al género *Lactobacillus*, especie *gasseri* (a las que se hace referencia con los números 43-46 en la tabla 5) se caracterizan por:

origen: a partir de cepillado intestinal;

40 crecimiento en caldo de cultivo MRS (DIFCO, ref. 288130) a 37 °C;

45 tienen el aspecto de bacilos con extremos redondeados, tanto individuales como en cadenas; crecen bien a de 37 °C a 45 °C; realizan obligatoriamente homofermentación; producen ácido DL-láctico.

La cepa que pertenece al género *Staphylococcus*, especie *xylosus* (a la que se hace referencia con el número 33 en la tabla 5, no parte de la presente invención) se caracteriza por:

crecimiento en caldo de cultivo M17 según Terzaghi (ref. Merck 15029) a 37 °C;

50 tiene el aspecto de esferas con un diámetro $\phi = 0,8-1,2 \mu\text{m}$; como células individuales o dobles o como tétradas; anaerobia opcional; crecimiento óptimo en condiciones aerobias a 25-35 °C; buen crecimiento a concentraciones de NaCl de hasta el 10 %; productora de catalasa; reduce nitratos y tiene actividad como fosfatasa alcalina.

55 Las otras cepas de la tabla 5 han demostrado tener características similares con respecto a aquellas cepas que pertenecen al mismo género.

60 El cultivo líquido obtenido según la presente invención se usa ventajosamente como iniciador para preparar productos alimenticios industriales (por ejemplo, productos lácteos tales como queso, yogures, leches fermentadas; pan, productos horneados, salamis y salchichas en general, bebidas alcohólicas).

65 En una realización preferida, dicho cultivo iniciador líquido se usa para preparar productos lácteos; los productos lácteos así obtenidos tienen al menos todas las propiedades organolépticas que pueden obtenerse con cultivos iniciadores líquidos conocidos.

La inoculación de leche en un hervidor con un cultivo iniciador líquido enriquecido está en promedio por debajo del

1 % en volumen (V/V) con respecto al volumen total de leche que va a tratarse; preferiblemente, dicho inóculo es del 0,2 % al 0,8 % (V/V) con respecto a la leche; más preferiblemente, es del 0,3 % al 0,6 % (V/V); ventajosamente, es del $\leq 0,5$ % (V/V).

5 Por tanto, siendo igual el volumen de leche que va a inocularse, un volumen más pequeño de cultivo iniciador líquido enriquecido es suficiente. Para la inoculación de 1.000 litros de leche, por ejemplo, de 3 a 6 litros de cultivo iniciador son ventajosamente suficientes, en lugar de los 10-50 litros requeridos para la inoculación de la misma cantidad de leche con un cultivo iniciador líquido conocido. Tal volumen de cultivo iniciador líquido enriquecido se corresponde, en cuanto a rendimiento fermentativo, que puede medirse por medio de la disminución de los valores de pH en la
10 leche en función del tiempo, con 10-50 litros de un cultivo iniciador líquido comercial conocido.

La mayor capacidad de almacenamiento del cultivo iniciador líquido enriquecido permite reducir la frecuencia con la que dicho cultivo se distribuye a lecherías, así como cubrir en general distancias y tiempos de envío más largos sin pérdida de la actividad fermentativa, en términos tanto cualitativos como cuantitativos, lo que es necesario para
15 garantizar las características de aspecto, sabor y aroma del producto lácteo final.

A modo de ejemplo para nada limitativo, lo siguiente divulga la preparación de algunos cultivos iniciadores líquidos particularmente preferidos según la invención.

20 Ejemplo 1 - Cultivo iniciador líquido que comprende la cepa bacteriana *Streptococcus thermophilus* DSM 18613.

Siguiendo el procedimiento del método general de preparación descrito anteriormente, usando como base una disolución de hidróxido de amonio al 25 %, se han obtenido 10.000 l de cultivo iniciador líquido para uso lácteo con procesamiento por lotes, que tienen una concentración final de *Streptococcus thermophilus* DSM 18613 correspondiente a $7,2 \times 10^9$ UFC/ml de cultivo.
25

Dicho cultivo, almacenado a una temperatura de 3 °C a 5 °C, ha demostrado ser estable durante más de 12 días.

Siguiendo el mismo método de preparación, también se han preparado cultivos iniciadores líquidos que comprendían una cepa bacteriana seleccionada entre:
30

a) *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 16606;

35 b) *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* DSM 16605;

c) *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020;

d) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LMG P-21388;

40 f) *Bifidobacterium longum* LMG P-21382.

Dichos cultivos, almacenados a una temperatura de 2 °C a 4 °C, han demostrado ser estables durante más de 12 días. La concentración celular de los cultivos es de 3×10^9 a 10×10^9 UFC/ml de medio de cultivo.

45 Ejemplo 2 - Cultivo iniciador líquido que comprende una mezcla de las siguientes cepas bacterianas: *Streptococcus thermophilus* DSM 16506; *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 16606.

Siguiendo el procedimiento del método general de preparación descrito anteriormente, un medio de cultivo constituido por (cantidades referidas a un litro de medio de cultivo): peptona de arroz, 10 g; extracto de levadura, 10 g; hidrolizado de levadura, 10 g; dextrosa, 20 g; MgSO₄, 200 mg; K₂HPO₄, 7,975 g; NaH₂PO₄, 1,437 g; MgSO₄•7H₂O, 50 mg; Tween 80, 1 ml, se ha inoculado con cultivos madre de *Streptococcus thermophilus* DSM 16506 y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 16606 en una razón de concentración celular mutua de 1:1.
50

Durante el crecimiento de la biomasa, se controla el pH tal como se describió anteriormente mediante la adición de carbonato de calcio.
55

Se han obtenido 8.000 litros de cultivo iniciador líquido para uso lácteo, que tienen una concentración celular final de *Streptococcus thermophilus* DSM 16506 correspondiente a $5,6 \times 10^9$ UFC/ml de cultivo, y de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 16606 correspondiente a $1,5 \times 10^9$ UFC/ml de cultivo.
60

Dicho cultivo, almacenado a una temperatura de 3 °C a 5 °C, ha demostrado ser estable durante más de 12 días.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar un cultivo iniciador líquido que comprende al menos un microorganismo fisiológicamente compatible, caracterizado porque la concentración celular de dicho microorganismo en dicho cultivo iniciador líquido es de $>10^9$ UFC/ml de medio de cultivo, dicho cultivo iniciador líquido tiene una capacidad de almacenamiento de 6 días o más, a una temperatura promedio de 3 °C a 5 °C y está básicamente sin azúcares residuales, en el que dicho método incluye
- i) inocular un medio de cultivo con una cantidad eficaz de cultivo madre de al menos una cepa bacteriana, o de una mezcla de cepas;
- ii) esperar el inicio de la fermentación y el inicio de la fase de crecimiento exponencial de la biomasa bacteriana;
- iii) controlar el pH del medio de cultivo, manteniendo dicho valor en un intervalo de 4,5 a 7,0, por medio de adiciones progresivas de al menos una base o una mezcla de más bases, durante el tiempo requerido para que se produzcan de 2 a 5 duplicaciones celulares de la(s) cepa(s);
- iv) dejar que el pH del medio de cultivo descienda de manera espontánea hasta un valor de 4,7 a 5,6, durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca una duplicación celular adicional;
- v) enfriar el cultivo obtenido en la etapa iv) hasta una temperatura de 4 °C a 8 °C;
- en el que dicho al menos un microorganismo se elige del grupo de cepas microbianas de uno de los géneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*.
2. Método según la reivindicación 1, en el que en la etapa iii) durante dicha etapa de control el valor de pH se mantiene dentro de un intervalo de 5,6 a 6,2.
3. Método según la reivindicación 2, en el que en la etapa iii) el valor de pH se mantiene dentro de un intervalo de 5,7 a 6,0.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha al menos una base se elige del grupo que comprende: ion carbonato, en formas mono y/o dibásicas, amoniac, hidróxidos, por ejemplo hidróxidos de amonio, sodio, potasio, ion fosfato, en formas mono y/o di y/o tribásicas, ion sulfato, en formas mono y/o dibásicas, iones citrato, ion tartrato, y/o bases que son fisiológicamente compatibles con microorganismos del cultivo, y/o mezclas de los mismos.
5. Método según la reivindicación 4, en el que dicha etapa de control del pH se lleva a cabo añadiendo al medio de cultivo para el crecimiento de la(s) cepa(s) bacteriana(s) amoniac y/o hidróxido de amonio, o ion carbonato, en formas mono y/o dibásicas.
6. Método según la reivindicación 1, en el que el pH final del cultivo es de 5,0 a 5,2.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- dichas cepas del género *Lactobacillus* se eligen de las siguientes especies: *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei* ssp. *paracasei*, *L. casei* ssp. *ramnosus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*;
 - dichas cepas del género *Bifidobacterium* se eligen de las siguientes especies: *B. longum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum*, *B. catenulatum*;
 - dichas cepas del género *Lactococcus* se eligen de las siguientes especies: *L. lactis* y *L. lactis* ssp. *Lactis*;
 - dichas cepas del género *Streptococcus* se eligen de la especie *S. thermophilus*.

TABLA 1

| | fases de producción | | | | | | fase de almacenamiento | | | | |
|--------------------------------|-----------------------|------|------|------|--------------|----------|------------------------|------|------|------|------|
| fases | 1 | 2 | 3 | 4 | 4 - 5 | 5 - 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| pH del medio de cultivo | Desarrollo de biomasa | | | | Enfriamiento | Envasado | Almacenamiento | | | | |
| cultivo líquido no enriquecido | 6.50 | 5.80 | 5.15 | 4.97 | 4.85 | 4.81 | 4.62 | 4.48 | - | - | - |
| cultivo líquido enriquecido | 6.50 | 5.80 | 5.80 | 5.20 | 5.10 | 5.09 | 5.05 | 5.02 | 4.99 | 4.96 | 4.94 |

TABLA 2

| Muestras | concentración celular (UFC*/ml) |
|--------------------------------|--|
| cultivo líquido no enriquecido | 8.0E+08 |
| cultivo líquido enriquecido | 7.2E+09 |

* UFC = unidades formadoras de colonias

TABLA 3

| pH de la leche | Valores de pH de medio de cultivo tras n minutos desde la inoculación | | | | | | | pH del medio de cultivo en inoculación | % en volumen de inóculo de leche | Volúmenes de cultivo para 1.000 litros de leche |
|--------------------------------|---|------|------|------|------|------|------|--|----------------------------------|---|
| | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 | 210 | | | |
| cultivo líquido no enriquecido | 6.42 | 6.35 | 6.26 | 6.07 | 5.73 | 5.49 | 5.34 | 4.73 | 5 | 50 |
| cultivo líquido enriquecido | 6.50 | 6.35 | 6.22 | 6.01 | 5.64 | 5.44 | 5.28 | 5.05 | 0.5 | 5 |

TABLA 4

| Muestra | capacidad de almacenamiento (días) |
|--------------------------------|---|
| cultivo líquido no enriquecido | 4 |
| cultivo líquido enriquecido | 12 |

FIG. 1

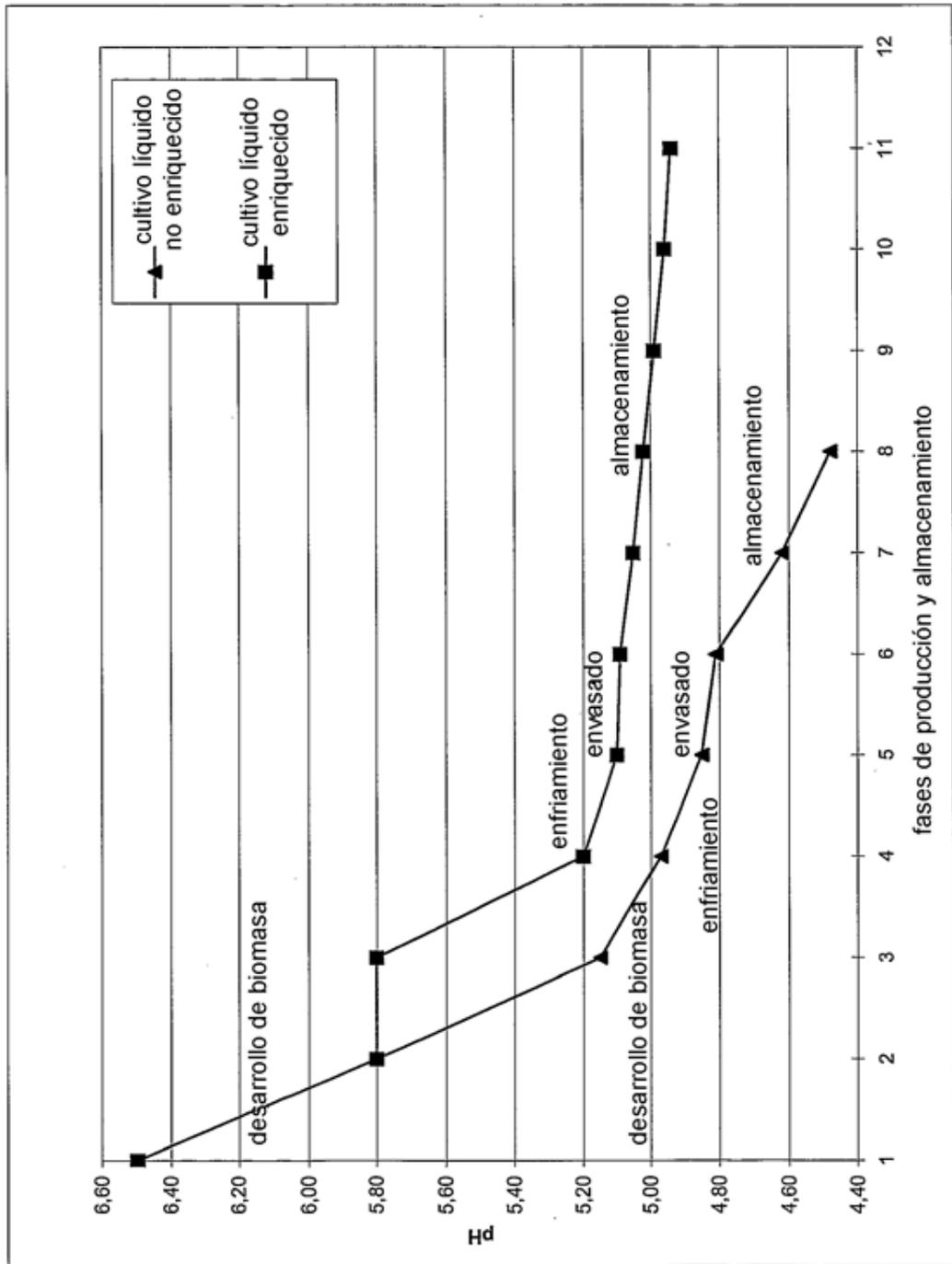


FIG. 2

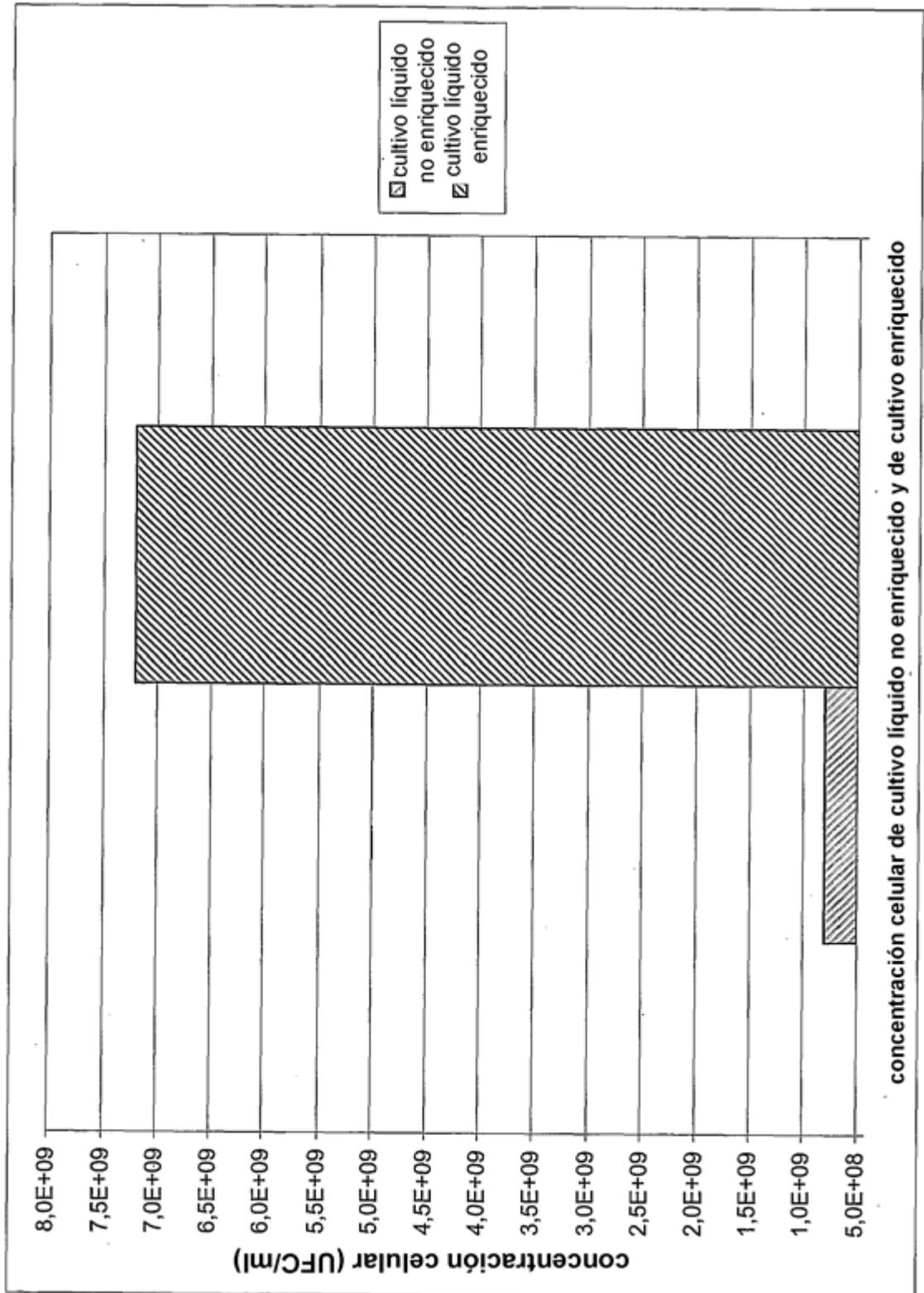


FIG. 3

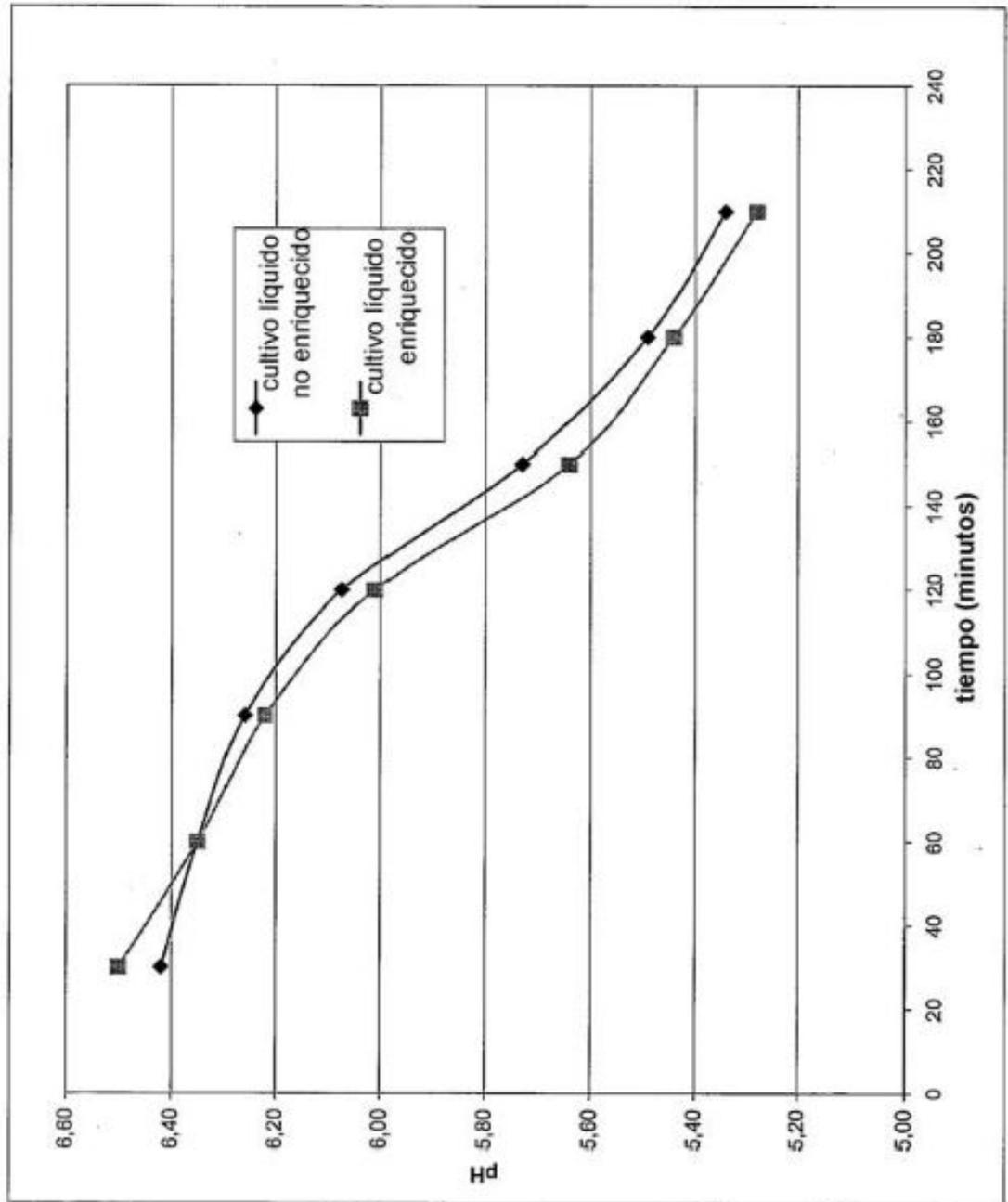


FIG. 4

