

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 084**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2007 PCT/IB2007/001911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2008 WO08038076**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2007 E 07734970 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2069475**

54 Título: **Formulaciones de medios de cultivo para aplicación industrial**

30 Prioridad:

27.09.2006 IT MI20061843

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

16.07.2018

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:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 676 084 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

Formulaciones de medios de cultivo para aplicación industrial

- 5 La presente invención se refiere a formulaciones de medios de cultivo para el desarrollo industrial de cultivos iniciadores líquidos caracterizados por un número mayor de células microbianas por unidad de volumen de medio de fermentación que el de cultivos iniciadores líquidos tradicionales, número que puede definirse de manera previa dependiendo de la formulación de dicho medio.
- 10 Los cultivos de microorganismos añadidos a varios tipos de alimentos se denominan "cultivos iniciadores". Dichos cultivos iniciadores son injertos seleccionados, compuestos por cepas microbianas con propiedades bioquímicas bien definidas, que por tanto permiten obtener resultados repetibles y constantes en el tiempo.
- 15 En todas las aplicaciones biotecnológicas, la función de cultivos iniciadores es iniciar y dirigir correctamente procedimientos fermentativos, contribuyendo por tanto de manera significativa a lograr no solo peculiaridades sensoriales sino con frecuencia también estructurales de productos acabados.
- 20 Ahora, dichos cultivos iniciadores microbianos se usan universalmente en la preparación de los productos alimenticios más diversos y la calidad de los mismos está relacionada no solo con una correcta práctica tecnológica sino también con la especificidad funcional del cultivo usado y con el número y el estado fisiológico de los microorganismos que constituyen dicho cultivo.
- 25 Los cultivos iniciadores pueden clasificarse basándose en diversos criterios, dependiendo de la complejidad de la composición (cultivos compuestos solo por una cepa microbiana o por más cepas pertenecientes a una o más especies y/o géneros), del campo de aplicación (por ejemplo, campo lácteo u otros) y del estado físico del cultivo (líquido, congelado o deshidratado, por ejemplo mediante liofilización o secado por pulverización).
- 30 Haciendo referencia a la forma física, los cultivos líquidos, si se preparan correctamente y se usan dentro de un breve transcurso de tiempo, son los que proporcionan los mejores resultados, ya que se caracterizan por una población microbiana con un estado fisiológico perfecto, y por tanto puede replicarse y manifestar su función directamente tras la inoculación en el alimento o los materiales de partida que van a transformarse.
- 35 Los aspectos negativos de los cultivos líquidos, que constituyen en la actualidad un factor limitante para su difusión, consisten en la breve vida útil de almacenamiento, que puede alcanzar un máximo de 4-5 días (a una temperatura de almacenamiento de 3 °C-5 °C) y en la concentración celular máxima limitada que puede obtenerse (lo que obliga a usar grandes volúmenes de dichos cultivos, siendo la cantidad de material de partida que va a transformarse la misma).
- 40 A la inversa, los cultivos liofilizados y congelados se caracterizan por vidas útiles de almacenamiento mucho más prolongadas y volúmenes menores.
- 45 Sin embargo, los cultivos liofilizados y congelados tienen el grave inconveniente que consiste en que las células se encuentran en un estado fisiológico que no puede adaptarse en tiempos breves a las condiciones de cultivo del sustrato alimenticio que va a fermentarse. Dicho de otro modo, se caracterizan por una fase de latencia más o menos prolongada, denominada fase LAG, que es esencial para recuperar funciones vitales.
- 50 Además, los productos (por ejemplo productos lácteos) obtenidos con dichos cultivos tienen características sensoriales, de aroma y de sabor que son en conjunto inferiores con respecto a los productos preparados mediante la aplicación de cultivos iniciadores líquidos.
- 55 Por tanto, todavía existe la necesidad de cultivos líquidos que tengan una concentración celular superior, que por tanto sean suficientes para transformar mayores cantidades de materiales de partida y con menores costes, garantizando la producción industrial de productos con propiedades organolépticas superiores.
- 60 Desafortunadamente, los medios de cultivo (denominados convencionales) que se usan comúnmente para la producción industrial de cultivos iniciadores conocidos (denominados tradicionales) no pueden dar una respuesta adecuada a la necesidad divulgada anteriormente.
- 65 Dichos medios comerciales convencionales están comúnmente constituidos por proteínas, proteidos y/o peptonas, por glúcidos simples o complejos, por vitaminas, sales minerales y factores de crecimiento específicos para cada género y especie microbianos.
- Las fuentes de nitrógeno aportan el material requerido para la construcción de estructuras celulares, mientras que las fuentes de carbono suministran la energía requerida para las diversas transformaciones metabólicas.
- El documento WO 00/39281 se refiere a un método para retener la actividad metabólica inicial de un cultivo iniciador

líquido mediante adición de compuestos estabilizantes, incluyendo ácido fórmico, formiato y compuestos que participan en la biosíntesis de ácidos nucleicos.

5 El documento WO 2006/067136 se refiere a un método para la preparación de un cultivo iniciador para la producción de productos lácteos fermentados en presencia de un estimulante tal como extractos de levadura, proteínas o nucleótidos en un medio previamente pasteurizado. La preparación de cultivos iniciadores de cepas de *Streptococcus thermophilus* se describe en el ejemplo 4 en presencia de un control de pH externo (inyección de amoníaco) para mantener el pH por encima de 5,8.

10 En la actualidad, el factor limitante para la obtención industrial de cultivos líquidos con alta concentración bacteriana consiste en la disminución de pH del medio de cultivo durante la producción de la biomasa microbiana; dicho fenómeno se debe a la producción de ácidos orgánicos mediante fermentación de las fuentes de carbono durante la reproducción bacteriana.

15 Los ácidos orgánicos, en particular el ácido láctico y acético, cuando están en forma disociada, son tóxicos para las células bacterianas, y si la concentración de los mismos está por encima de un umbral dado, que varía de una especie a otra, toleran y después bloquean las actividades metabólicas. Si la fase de incubación del cultivo en el medio de cultivo dura un tiempo excesivamente largo, el resultado es una alta mortalidad en la población bacteriana, que pone en peligro la función de la misma.

20 Hay básicamente dos consecuencias de este fenómeno: por un lado está la pérdida, más o menos evidente, de vitalidad de la biomasa, por el otro lado está un fenómeno de inhibición del desarrollo adicional de dicha biomasa, que evidentemente afecta de manera negativa a la concentración celular y a la actividad fermentativa global del cultivo iniciador final.

25 La carga microbiana (o concentración de células microbianas por unidad de volumen de cultivo iniciador final, expresada como UFC, unidades formadoras de colonia, por ml de cultivo iniciador final) que puede obtenerse con medios de cultivo conocidos en la actualidad y usados a nivel industrial (medios convencionales) es como máximo de $0,5 \cdot 10^9$ UFC/ml, pero con frecuencia no está por encima de 200 millones ($2 \cdot 10^8$) de UFC/ml.

30 En el campo lácteo, la cantidad necesaria de cultivo iniciador líquido varía de un producto a otro, dependiendo de la inoculación prevista para cada tipo de procedimiento de elaboración de queso y de la densidad celular del cultivo.

35 En general, la inoculación permite obtener en la leche una concentración de células vivas de al menos 10-25 millones de células/ml. Dado que un cultivo iniciador tradicional contiene como máximo $0,5 \cdot 10^9$ - $1 \cdot 10^9$ 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 1000 litros de leche y después lograr la actividad fermentativa necesaria, lo cual puede medirse mediante disminución del pH en leche en función del tiempo.

40 El ejemplo anterior ha confirmado que los volúmenes implicados son bastante altos y, por tanto, un volumen alto de cultivo iniciador líquido es suficiente para transformar un volumen limitado de material de partida: por tanto para la industria se necesita producir con frecuencia cultivo iniciador adicional, lo que da como resultado una productividad de planta inferior y costes que algunas veces no pueden soportarse.

45 A la luz de los problemas y de la necesidad divulgados anteriormente, sería por tanto particularmente útil tener un medio de cultivo que permita producir cultivos iniciadores líquidos caracterizados por una alta concentración celular (por tanto, por volúmenes limitados) y por una alta actividad fermentativa, y mantener al mismo tiempo las propiedades favorables de cultivos iniciadores líquidos conocidos (especialmente desde el punto de vista de mejores propiedades organolépticas de los productos obtenidos a partir de su uso), así como al gestión global más fácil que caracteriza a cultivos congelados o deshidratados.

50 En la actualidad no se conocen medios de cultivo para el desarrollo industrial del/de los microorganismo(s) de un cultivo iniciador líquido que tengan las propiedades mencionadas anteriormente.

55 Por tanto, todavía existe la necesidad de medios de cultivo que permitan producir cultivos iniciadores líquidos que tengan las propiedades ventajosas divulgadas anteriormente.

El objetivo de la presente invención es responder de manera adecuada a la necesidad mencionada anteriormente.

60 Este y otros objetivos, que resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los ha logrado el solicitante, quien ha encontrado de manera inesperada que la adición de una cantidad adecuada de al menos un agente neutralizante básico directamente en el medio de cultivo de inicio usado para hacer crecer la biomasa microbiana permite obtener un cultivo iniciador líquido caracterizado por un aumento considerable del número de células microbianas con respecto a cultivos iniciadores líquidos conocidos en la actualidad (cultivos tradicionales).

65 Por tanto, un objeto de la presente invención es un método para preparar un cultivo iniciador líquido que incluye la

adición del medio de cultivo anterior, tal como se divulga en la reivindicación independiente adjunta.

Otro objeto de la presente invención es el uso de dicho medio para la producción industrial de cultivos iniciadores líquidos, especialmente para el campo de la elaboración de queso, tal como se divulga en la reivindicación independiente adjunta. En otro aspecto la presente invención proporciona un cultivo iniciador líquido con alta concentración celular y alta actividad fermentativa, tal como puede obtenerse con dicho medio de cultivo, cuyas características se divulgan en la reivindicación independiente adjunta.

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

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

La concentración celular se determina mediante uno o más recuentos de células vivas, generalmente en placas. Tal método consiste en determinar el número de células presentes en un medio de fermentación que son capaces de formar colonias en 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 de pH en el tiempo de un volumen dado de un líquido adecuado, preferiblemente leche, tras la inoculación con un volumen dado de dicho cultivo.

Las características y ventajas de la presente invención se indican en la siguiente descripción detallada; además, también se divulgan adicionalmente a modo de ejemplo en las figuras 1-3 adjuntas y en las tablas 1-3 adjuntas relacionadas con dichas figuras, en las que:

- la figura 1 es un gráfico del desarrollo en el tiempo de: el pH de un medio de cultivo convencional durante la producción industrial de un cultivo iniciador líquido tradicional, el pH de un medio de cultivo que contiene carbonato de calcio como agente neutralizante interno durante la producción industrial de un cultivo iniciador líquido según la presente invención; el pH de un medio de cultivo que contiene carbonato de calcio y monohidrogenofosfato de potasio como mezcla de agentes neutralizantes internos, durante la producción industrial de un cultivo iniciador líquido según la presente invención; se llevaron a cabo las mediciones hasta el final de la fase de enfriamiento de dichos cultivos;

- la figura 2 contiene los valores de concentraciones celulares, respectivamente, de: un cultivo líquido tradicional desarrollado con un medio de cultivo convencional; un cultivo iniciador líquido según la invención, desarrollado usando un medio de cultivo que contiene CaCO_3 como agente neutralizante interno; un cultivo iniciador líquido según la invención, desarrollado usando un medio de cultivo que contiene CaCO_3 y monohidrogenofosfato de potasio como mezcla de agentes neutralizantes internos; dichos valores de concentración se expresan como UFC/ml (el término $nE+p$ en las ordenadas corresponde a $n \cdot 10^p$ UFC/ml);

- la figura 3 es un gráfico de la actividad fermentativa mostrada, durante el uso biotecnológico, por: un cultivo iniciador líquido tradicional, desarrollado con un medio de cultivo convencional; un cultivo iniciador líquido con alta actividad fermentativa según la invención, desarrollado usando un medio de cultivo que contiene CaCO_3 y monohidrogenofosfato de potasio como agentes neutralizantes internos; dichas actividades se expresan mostrando el desarrollo en el tiempo de la disminución de pH de una leche inoculada con dichos cultivos; el cultivo iniciador líquido tradicional se ha inoculado hasta el 5 % del volumen de leche total (V/V), mientras que el cultivo iniciador líquido con alta actividad fermentativa según la invención se ha inoculado hasta el 0,5 % en volumen, es decir 10 veces menos; el gráfico indica claramente que el cultivo iniciador líquido según la invención muestra el mismo rendimiento industrial que un cultivo convencional, usando volúmenes que son 10 veces menores (por tanto, si la dosis es la misma, se caracteriza por una actividad fermentativa que es 10 veces mayor);

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

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

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

La presente invención se refiere a un medio de cultivo, caracterizado porque comprende una cantidad eficaz de al menos un agente neutralizante básico.

Preferiblemente, dicho medio de cultivo se usa para la producción industrial de un cultivo iniciador líquido con alta actividad fermentativa, que comprende al menos un microorganismo fisiológicamente compatible, en el que dicho cultivo iniciador líquido se caracteriza porque tiene una concentración de células bacterianas mayor de dicho al menos un microorganismo que la concentración celular máxima de cultivos iniciadores líquidos tradicionales (es decir $>10^9$ UFC/ml de cultivo).

Preferiblemente, dicho cultivo iniciador líquido anterior es un cultivo con inoculación directa.

5 Generalmente, un agente neutralizante básico puede elegirse del grupo que comprende: ion carbonato, en formas mono y dibásicas, ion fosfato, en formas mono, di y tribásicas, ion sulfato, en formas mono y dibásicas, ion hidróxido, ion citrato, en formas mono, di y tribásicas, ion tartrato, en formas mono y dibásicas, otras bases que son fisiológicamente compatibles con los microorganismos del cultivo microbiano que va a desarrollarse en dicho medio, y/o mezclas de los mismos. Dichas bases derivan de sales adecuadas en las que el resto catiónico está preferiblemente representado por ion calcio, sodio, potasio, magnesio, manganeso y/o amonio.

10 En la presente invención, dicha base es carbonato de calcio y monohidrogenofosfato de potasio.

Ventajosamente, en dicha mezcla el carbonato de calcio y el monohidrogenofosfato de potasio están en una razón mutua (peso/peso) de 1:9 a 9:1, preferiblemente de 1:4 a 4:1; lo más preferiblemente de 1:2 a 2:1.

15 Dicho al menos un agente neutralizante se usa ventajosamente en porcentajes adecuados (peso/peso), dependiendo básicamente de las características de la(s) cepa(s) microbiana(s) que va(n) a desarrollarse y de la concentración celular final que va a lograrse.

20 De hecho, el solicitante ha encontrado de manera inesperada que la concentración celular que puede lograrse al final del procedimiento de preparación industrial del cultivo iniciador es directamente proporcional, dentro de intervalos precisos y bien definidos, a la cantidad de agente neutralizante presente en dicho medio.

25 Por tanto, la formulación del medio puede definirse en función de los resultados industriales previstos, obteniendo con la misma composición resultados reproducibles y constantes que pueden establecerse de manera previa.

30 El solicitante ha encontrado que el uso de unos agentes neutralizantes internos, o de una mezcla de los mismos, permite mantener el pH del medio de cultivo dentro de un intervalo preciso dependiendo del/de los valor(es) de pK_b específico(s) de la(s) base(s) liberada(s) con la disolución de dicho(s) agente(s).

Este mantenimiento comienza de manera espontánea cuando el pH del medio para hacer crecer la biomasa alcanza valores específicos, en función del valor de pK_b del agente neutralizante o de la mezcla de agentes presentes en el mismo, y por tanto depende del/de los microorganismo(s) en crecimiento y de las condiciones de cultivo.

35 La duración de dicho mantenimiento ha demostrado depender tanto de la concentración del agente neutralizante o la mezcla de agentes como de la capacidad de acidificación de la(s) cepa(s) presente(s) en el biorreactor.

40 La cantidad total del agente neutralizante es tal como para permitir durante la fase de mantenimiento del pH, durante la fase de crecimiento exponencial de la biomasa microbiana en el medio de cultivo, que se produzcan de 2 a 5 divisiones (duplicaciones) celulares de la biomasa microbiana. La cantidad total de agente neutralizante (o mezcla de agentes neutralizantes) es como norma de 2 g/l de medio de cultivo. Preferiblemente, dicha cantidad es de 2 g/l a 40 g/l; más preferiblemente, es de 8 g/l a 25 g/l.

45 El intervalo dentro del cual se mantiene el pH del medio de cultivo durante la fase de crecimiento exponencial de la biomasa microbiana en dicho medio es de entre 5,0 y 5,7.

50 En una realización preferida, que usa CaCO_3 y K_2HPO_4 como mezcla de agentes neutralizantes internos, el desarrollo del pH durante la fase de mantenimiento es casi constante dentro de los intervalos de 6,1-6,2 y 5,1-5,2, hasta agotarse dicha mezcla.

55 A modo de ejemplo, en una primera realización particularmente preferida de la invención, la cantidad de agente neutralizante, o mezcla de agentes, que va a introducirse en la formulación del medio de cultivo se calcula de modo que, una vez agotado completamente dicho agente neutralizante o mezcla, puede haber una cantidad residual de fuentes de energía tal como para permitir 0,5-1 duplicaciones celulares adicionales de la biomasa. En tales condiciones, el pH del medio de cultivo disminuye hasta un valor específico que varía en función del microorganismo que se hace crecer, sin embargo, dicho valor no es nunca tal como para provocar que la biomasa microbiana sufra.

60 En estas circunstancias, la actividad fermentativa del cultivo está directamente relacionada y es proporcional a la concentración celular, con frecuencia también ligeramente superior dado que la biomasa microbiana se encuentra en un perfecto estado de vitalidad e integridad.

65 En una segunda realización particularmente preferida de la invención, la cantidad de agente(s) neutralizante(s) se calcula de modo que, tras haberse agotado completamente dicho(s) agente(s), hay una cantidad residual de fuentes de energía tal como para permitir de 1 a 3 duplicaciones celulares adicionales de la biomasa bacteriana. En tales circunstancias, dicha biomasa tiene una concentración celular hasta 4 veces mayor que la que puede lograrse en la realización anterior, pero la actividad fermentativa manifestada por dicha biomasa puede no ser directamente

proporcional a tal factor, dado que estas células no están en un perfecto estado fisiológico debido a la toxicidad provocada por la concentración excesiva de ion hidrógeno en las fases finales de producción industrial del cultivo iniciador.

5 El método para preparar un medio de cultivo según la presente invención incluye la adición de una cantidad adecuada de al menos un agente neutralizante básico, según la descripción anterior, preferiblemente a cualquier medio de cultivo tradicional (por ejemplo, comercialmente disponible), dependiendo del/de los microorganismo(s) que va(n) a desarrollarse.

10 Preferiblemente, dicha adición se lleva a cabo mediante mezclado tradicional de los componentes en un aparato de mezclado adecuado.

Dicha adición/mezclado puede llevarse a cabo en condiciones secas (mezcla de polvos de los componentes) o en fase líquida (por ejemplo, con agitación), tras diluir componentes del medio y agente(s) neutralizante(s) en una cantidad adecuada de un líquido, preferiblemente medio acuoso.

15 El valor de pH del cultivo iniciador líquido concentrado con alta actividad fermentativa, obtenido a partir del medio según la invención, es generalmente de entre 4,7 y 5,6, preferiblemente entre 4,9 y 5,2.

20 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 inicial, se enfría hasta una temperatura de 4 °C a 10 °C y se almacena en condiciones refrigeradas (preferiblemente a de 3 °C a 6 °C) hasta la aplicación biotecnológica de dicho cultivo. Por tanto, un objeto de la presente invención también es el cultivo iniciador líquido obtenido usando el medio de cultivo de la invención tal como se describió anteriormente.

25 En una realización de la invención, el microorganismo o la mezcla de microorganismos del cultivo iniciador se elige de cepas microbianas adecuadas, fisiológicamente compatibles.

30 En otra realización de la invención, dicho(s) microorganismo(s) se elige(n) de cepas microbianas que tienen un valor probiótico.

La concentración celular de dicho cultivo iniciador líquido, obtenido usando el medio de cultivo según la presente invención, es como norma >1,5 veces mayor que la de cultivos iniciadores líquidos tradicionales.

35 Preferiblemente, dicho cultivo líquido tiene una concentración celular que es $\geq 2,5$ veces mayor que la concentración de cultivos iniciadores líquidos tradicionales; más preferiblemente, dicha concentración es ≥ 5 veces mayor que la de cultivos iniciadores líquidos tradicionales.

40 Por ejemplo, la concentración celular del cultivo iniciador líquido, obtenida según el procedimiento descrito en la primera realización particularmente preferida anterior de la invención, es como norma $\geq 1,5$ veces mayor que la de cultivos iniciadores líquidos tradicionales.

45 Dicho cultivo líquido tiene una concentración celular que es preferiblemente de 2,5 a 15 veces mayor que la concentración de cultivos iniciadores líquidos tradicionales; más preferiblemente, dicha concentración es de 4 a 12 veces mayor que la de cultivos iniciadores líquidos tradicionales.

Todavía más preferiblemente, dicha concentración es ≥ 5 veces mayor que la de cultivos iniciadores líquidos tradicionales.

50 A su vez, la concentración celular del cultivo iniciador líquido, obtenida según el procedimiento descrito en la segunda realización particularmente preferida anterior de la invención, es como norma de 2,5 a 60 veces mayor que la concentración de cultivos iniciadores líquidos conocidos; preferiblemente, dicha concentración es de 8 a 32 veces mayor que la concentración de cultivos iniciadores líquidos conocidos.

55 Más preferiblemente, dicha concentración es ≥ 16 veces mayor que la de cultivos iniciadores líquidos conocidos.

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

60 En una realización preferida de la invención, el cultivo iniciador líquido anterior se caracteriza por una concentración celular de $\geq 2,5 \cdot 10^9$ UFC/ml de cultivo, preferiblemente, $\geq 5 \cdot 10^9$ UFC/ml.

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

65 Dicha actividad fermentativa ha demostrado ser en promedio al menos 2 veces, preferiblemente al menos 2,5 veces

mayor que la de cultivos iniciadores líquidos conocidos.

5 Por ejemplo, en la primera realización particularmente preferida anterior de la invención, dicho cultivo iniciador líquido tiene una actividad fermentativa de 2,5 a 18 veces mayor que la actividad fermentativa de cultivos iniciadores líquidos tradicionales; preferiblemente, dicha actividad es de 4 a 15 veces mayor. Más preferiblemente, dicha actividad fermentativa es ≥ 6 veces mayor que la actividad de cultivos iniciadores líquidos tradicionales.

10 A su vez, en la segunda realización particularmente preferida anterior de la invención, dicho cultivo iniciador líquido tiene una actividad fermentativa de 2,5 a 30 veces mayor que la actividad fermentativa de cultivos iniciadores líquidos tradicionales; preferiblemente, dicha actividad es de 8 a 24 veces mayor que la actividad fermentativa de cultivos iniciadores líquidos tradicionales.

15 Más preferiblemente, dicha actividad fermentativa es ≥ 16 veces mayor que la actividad de cultivos iniciadores líquidos tradicionales.

El cultivo iniciador líquido con alta concentración y alta actividad fermentativa, obtenido con el medio de cultivo según la presente invención, es un cultivo listo para usar para cualquier aplicación industrial.

20 De manera bastante inesperada, dicho cultivo iniciador líquido también ha demostrado ser más estable que los cultivos iniciadores líquidos tradicionales. Como norma, el cultivo iniciador líquido anterior ha demostrado tener una capacidad de almacenamiento que es $\geq 1,5$ veces mayor que la capacidad de almacenamiento de cultivos iniciadores líquidos tradicionales.

25 Preferiblemente, dicha capacidad de almacenamiento es $\geq 2,5$ veces mayor. Más preferiblemente, dicha capacidad de almacenamiento es ≥ 4 veces mayor. Por tanto, el cultivo iniciador líquido según la presente invención se caracteriza por una capacidad de almacenamiento de ≥ 6 días, a una temperatura de almacenamiento promedio de $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Preferiblemente, dicha capacidad de almacenamiento es de $\geq 7,5$ días; más preferiblemente de ≥ 10 días, todavía más preferiblemente es de ≥ 13 días.

30 De manera convencional, en la presente invención la capacidad de almacenamiento se evalúa siempre haciendo referencia a una temperatura de almacenamiento promedio de $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

35 Gracias a la adición de al menos un agente neutralizante interno básico, preferiblemente carbonato de calcio y/o una mezcla de dicho carbonato con al menos otra sal adecuada tal como se definió anteriormente, ha demostrado ser posible obtener en el medio de cultivo de partida, de una manera reproducible y definible de manera previa, un desarrollo superior de la biomasa, una vitalidad superior y una actividad fermentativa aumentada del cultivo resultante, así como una estabilidad aumentada inesperada de dicho cultivo.

40 El método para preparar un cultivo iniciador líquido según la presente invención incluye al menos una fase en la que se añade/mezcla un medio de cultivo, preferiblemente de tipo convencional, con una cantidad adecuada de al menos un agente neutralizante básico según la descripción anterior.

45 Como ejemplo de realización absolutamente no limitativo, a continuación se divulga un método general para preparar un cultivo iniciador líquido con alta concentración y alta actividad fermentativa, en el que dicho cultivo se obtiene usando un medio de cultivo según la presente invención tal como se describió anteriormente. Dicho método incluye básicamente las siguientes etapas:

- a) añadir a un medio de cultivo una cantidad adecuada de al menos un agente neutralizante básico;
- 50 b) disolver el medio de a) en un volumen adecuado de un medio líquido, habitualmente agua;
- c) descontaminar el biorreactor haciendo fluir vapor; preferiblemente durante 30 minutos;
- d) someter a tratamiento térmico el medio de cultivo diluido de b) en el biorreactor; preferiblemente a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20-30 minutos;
- 55 e) enfriar el medio de cultivo de d) hasta la temperatura de inoculación deseada;
- f) inocular el medio de cultivo de e) con una cantidad eficaz de cultivo madre (líquido, liofilizado o congelado) de al menos un microorganismo bacteriano microbiano, o de una mezcla de microorganismos;
- 60 g) dejar que la biomasa se desarrolle durante un tiempo suficiente para que se produzca un total de 8 a 10 duplicaciones celulares del/de los microorganismo(s) que va(n) a hacerse crecer, hasta que (una vez terminado el efecto tamponante del agente o los agentes neutralizantes) el pH del medio de cultivo disminuya de manera espontánea hasta un valor de 4,9 a 5,2; ventajosamente, durante todo el periodo de desarrollo de la biomasa, el medio de fermentación se mantiene con agitación ligera y constante;
- 65

h) enfriar el cultivo de g) hasta una temperatura de 4 °C a 8 °C.

5 En un ejemplo de realización preferido de la invención, absolutamente no limitativo, el medio de cultivo de b), que contiene carbonato de calcio como agente neutralizante interno, comprende (las cantidades hacen referencia a un litro de medio de cultivo): suero, 5 g; peptona-caseína 10 g; extracto de levadura, 5 g; glucosa, 10 g; MnSO₄, 200 mg; CaCO₃, 12 g; agua, c.s. para 1 l de medio de cultivo final.

10 La cantidad de carbonato de calcio presente en dicho medio de cultivo es generalmente de 2 g/l de medio de cultivo. Preferiblemente, dicha concentración es de 2 a 20 g/l, más preferiblemente es de 5 a 15 g/l; todavía más preferiblemente de 8 a 12 g/l.

15 En otra realización preferida, absolutamente no limitativa, el medio de cultivo de b), que contiene carbonato de calcio y monohidrogenofosfato de potasio como mezcla de agentes neutralizantes internos, comprende (las cantidades hacen referencia a un litro de medio de cultivo): suero, 5 g; peptona-caseína 10 g; extracto de levadura, 5 g; glucosa, 10 g; MnSO₄, 200 mg; CaCO₃, 4,8 g; K₂HPO₄, 12,1 g; agua, c.s. para 1 l de final medio de cultivo.

La cantidad total de carbonato de calcio y de monohidrogenofosfato de potasio es de 8 a 20 g/l.

20 Ventajosamente, la presencia de carbonato de calcio, o bien solo o bien mezclado con al menos otra sal, da como resultado el desarrollo de dióxido de carbono en el medio de fermentación, cuando el pH de dicho medio disminuye por debajo de umbrales bien definidos dependiendo de los valores de pK_b del ion carbonato.

25 El solicitante ha encontrado de manera inesperada que el desarrollo de CO₂ por ion carbonato funciona como bioactivador hacia el crecimiento de microorganismos y también contribuye a la anaerobiosis del medio para el desarrollo de la biomasa, dando como resultado enormes ventajas cuando dicha biomasa está compuesta por microorganismos estrictamente anaerobios o microorganismos microaerófilos.

30 La temperatura de inoculación del medio de cultivo de e) es en promedio de 18 °C a 47 °C, dependiendo de las características del/de los microorganismo(s) usado(s), de las condiciones de crecimiento correspondientes requeridas por dicho(s) microorganismo(s), y del porcentaje de inoculación del/de los microorganismo(s). Por ejemplo, para microorganismos mesófilos dicha temperatura es preferiblemente de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 32 °C, mientras que para microorganismos termófilos dicha temperatura es preferiblemente de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 45 °C.

35 La cantidad de cultivo madre como en la etapa f), añadido al medio de cultivo de b), si es líquido o está congelado, puede variar en promedio entre el 0,5 % y el 10 % (V/V), dependiendo del/de los microorganismo(s) que va(n) a hacerse crecer, de las características del medio de cultivo y de las condiciones de desarrollo de la biomasa microbiana.

40 En el caso de cultivos madre deshidratados, la cantidad es función de la concentración bacteriana y en cualquier caso es tal como para proporcionar en promedio 10-25 millones de UFC/ml de medio de cultivo.

45 Preferiblemente, se toman medidas adecuadas para prevenir lo más posible los riesgos de contaminación para el biorreactor: el aire que entra en el compartimento de fermentación se filtra a través de filtros estériles; el propio compartimento se esteriliza con vapor a alta temperatura entre un ciclo de producción y el siguiente; también se usan electrodos para el control del pH y se esterilizan sensores de temperatura; la producción de biomasa tiene lugar en condiciones de sobrepresión de nitrógeno o aire estéril.

50 El cultivo iniciador líquido que puede obtenerse usando el medio de cultivo según la presente invención, tal como se describió anteriormente, puede comprender cualquier cepa bacteriana microbiana que sea fisiológicamente compatible y/o sea interesante desde el punto de vista de la aplicación industrial. Preferiblemente, dicho cultivo comprende una mezcla de más cepas microbianas elegidas del grupo que comprende los géneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*.

55 Por ejemplo, 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. gasseri*.

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

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

Por ejemplo, se ha usado la especie *S. xylosus* del género *Staphylococcus*.

Con las realizaciones de la presente invención, tanto la concentración celular como la actividad fermentativa de la población bacteriana del cultivo iniciador así obtenido pueden definirse de manera previa, en función de la cantidad de agente neutralizante o mezcla de los mismos presente en el medio.

Tal posibilidad es incluso más ventajosa si tiene que preverse la maduración de alimentos.

De hecho, el solicitante ha encontrado de manera inesperada que una actividad fermentativa inferior adecuada de la biomasa bacteriana, siendo igual la concentración celular que puede obtenerse con un medio de cultivo según la segunda realización preferida de la invención, permite introducir en el material de partida que va a transformarse (si resulta ventajoso desde el punto de vista tecnológico e industrial) una cantidad superior de enzimas intracelulares (que median en la actividad proteolítica/lipolítica de los materiales de partida, y por tanto en el posterior desarrollo de aroma) que la que se introduciría mediante un cultivo caracterizado por una actividad fermentativa superior.

Los cultivos iniciadores líquidos según realizaciones de la invención se usan como injertos 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).

Preferiblemente, dichos cultivos iniciadores líquidos se usan para preparar productos lácteos industriales.

El procedimiento de elaboración de queso que va a seguirse con cultivos iniciadores que tienen una alta actividad fermentativa según la invención es el mismo que con cultivos iniciadores líquidos tradicionales; los productos lácteos así obtenidos tienen al menos todas las propiedades organolépticas deseables que pueden obtenerse con dichos cultivos iniciadores líquidos tradicionales.

La inoculación de leche en un fermentador con un cultivo iniciador líquido que tiene una alta actividad fermentativa es en promedio inferior al 1 % en volumen (V/V) con respecto al volumen total de leche que va a tratarse; preferiblemente, dicha inoculación es del 0,2 % al 0,8 % (V/V) con respecto a leche; más preferiblemente es del 0,3 % al 0,6 % (V/V); ventajosamente es de $\leq 0,5$ % (V/V).

Por tanto, siendo el volumen de leche que va a inocularse el mismo, el uso de un volumen menor de cultivo iniciador líquido con alta actividad fermentativa es suficiente. Para la inoculación de 1000 litros de leche, por ejemplo, de 3 a 6 litros de cultivo iniciador según la presente invención son suficientes, en vez de los 10-50 litros requeridos para las inoculaciones de la misma cantidad de leche con un cultivo iniciador líquido conocido. Tal volumen de cultivo iniciador líquido con alta actividad fermentativa corresponde (desde el punto de vista del rendimiento industrial, que puede medirse mediante la disminución de valores de pH en la leche en función del tiempo) a 10-50 litros de un cultivo iniciador líquido comercial conocido.

Como ejemplo absolutamente no limitativo, a continuación se divulga la composición del medio de cultivo según la presente invención, con la que se han desarrollado dos cultivos iniciadores líquidos con alta actividad fermentativa.

Ejemplo 1 - Medio de cultivo para la producción de un cultivo iniciador líquido que comprende la cepa bacteriana *Streptococcus thermophilus* DSM 16506 (depositada por ANIDRAL S.r.l. en DSMZ el 18/06/2004).

Dicho medio tiene la siguiente composición (las cantidades hacen referencia a un litro de medio de cultivo): permeado de suero, 8 g; peptona-caseína, 12 g; extracto de levadura, 5 g; CaCO₃, 9 g; agua, c.s. para 1 l de medio de cultivo.

Siguiendo el procedimiento del método general de preparación descrito anteriormente, mediante el medio anterior se obtuvo un cultivo iniciador líquido para uso lácteo, que tenía una concentración celular final de *Streptococcus thermophilus* DSM 16506 correspondiente a $3,8 \cdot 10^9$ UFC/ml de cultivo iniciador.

Ejemplo 2 - Medio de cultivo para la producción de un cultivo iniciador líquido que comprende la cepa bacteriana *Streptococcus thermophilus* DSM 16506.

Dicho medio tiene la siguiente composición (las cantidades hacen referencia a un litro de medio de cultivo): permeado de suero, 8 g; peptona-caseína, 12 g; extracto de levadura, 5 g; CaCO₃, 3,6 g; K₂HPO₄, 9,1 g; agua, c.s. para 1 l de final medio de cultivo.

Siguiendo el procedimiento del método general de preparación descrito anteriormente, mediante el medio anterior se obtuvo un cultivo iniciador líquido para uso lácteo, que tenía una concentración celular final de *Streptococcus thermophilus* DSM 16506 correspondiente a $7,1 \cdot 10^9$ UFC/ml de cultivo.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar un cultivo iniciador líquido que comprende al menos un microorganismo seleccionado del grupo de cepas microbianas de la especie *Streptococcus thermophilus* que tiene una concentración de células microbianas de dicho al menos un microorganismo de más de 1×10^9 UFC/ml,
- 5
- en el que dicho método incluye al menos una etapa en la que se añade un medio de cultivo con una cantidad eficaz de al menos un agente neutralizante básico que contiene una mezcla de carbonato de calcio y monohidrogenofosfato de potasio,
- 10
- en el que dicho agente neutralizante está presente en una cantidad tal como para permitir mantener el valor de pH de dicho medio dentro de un intervalo dado, durante la fase de crecimiento exponencial de la biomasa microbiana en dicho medio,
- 15
- en el que dicho intervalo de pH dado es de 5,0 a 5,7, y
- en el que la concentración de la cantidad total de carbonato de calcio y de monohidrogenofosfato de potasio en el cultivo es de 8 g/l a 20 g/l.
- 20
2. Método según la reivindicación 1, que incluye las siguientes etapas:
- a) añadir a un medio de cultivo una cantidad de al menos un agente neutralizante básico;
- 25
- b) disolver el medio de a) en un medio líquido, preferiblemente agua;
- 25
- c) descontaminar el biorreactor haciendo fluir vapor; preferiblemente durante 30 minutos;
- d) someter a tratamiento térmico el medio de cultivo diluido de b) en el biorreactor; preferiblemente a 85 °C-90 °C durante 20-30 minutos;
- 30
- e) enfriar el medio de cultivo de d) hasta la temperatura de inoculación;
- f) inocular el medio de cultivo de e) con una cantidad eficaz de cultivo madre de al menos un microorganismo bacteriano microbiano, o de una mezcla de microorganismos;
- 35
- g) dejar que la biomasa se desarrolle durante un tiempo suficiente para que se produzca un total de 8 a 10 duplicaciones celulares del/de los microorganismo(s), hasta que el pH del medio de cultivo disminuya de manera espontánea hasta un valor de 4,9 a 5,2;
- 40
- h) enfriar el cultivo de g) hasta una temperatura de 4 °C a 8 °C.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la cepa bacteriana es *Streptococcus thermophilus* DSM 16506.
- 45
4. Uso de un cultivo iniciador líquido preparado según el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como iniciador para preparar productos alimenticios industriales.
5. Uso según la reivindicación 4, en el que dichos productos alimenticios industriales se eligen del grupo que comprende: productos lácteos, queso, yogur, leches fermentadas, pan, productos horneados, salamis, salchichas fermentadas, bebidas alcohólicas.
- 50
6. Uso según la reivindicación 5, en el que dichos productos se eligen de productos lácteos.
7. Uso de un cultivo iniciador líquido preparado según el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la inoculación directa de leche.
- 55

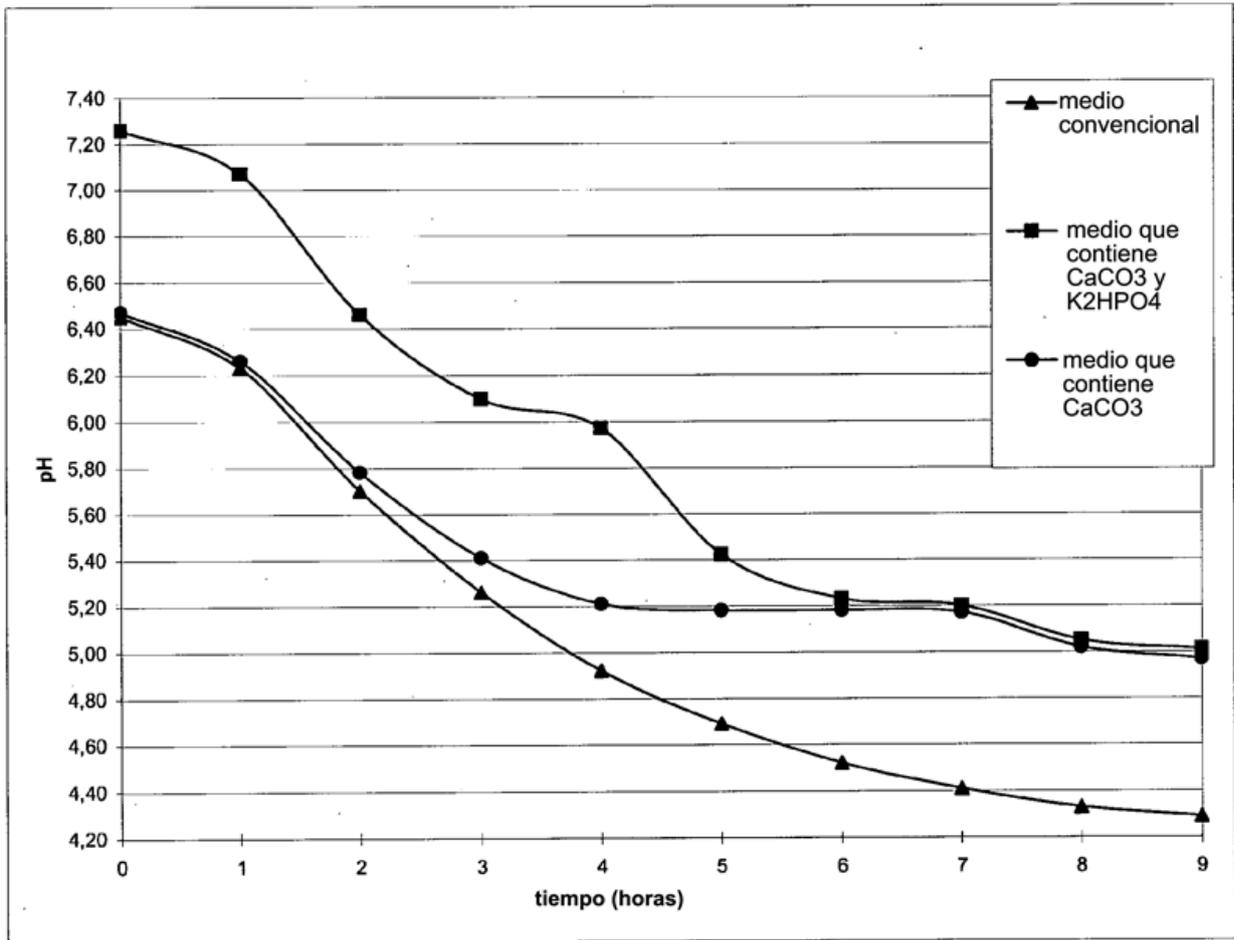


FIG. 1/3

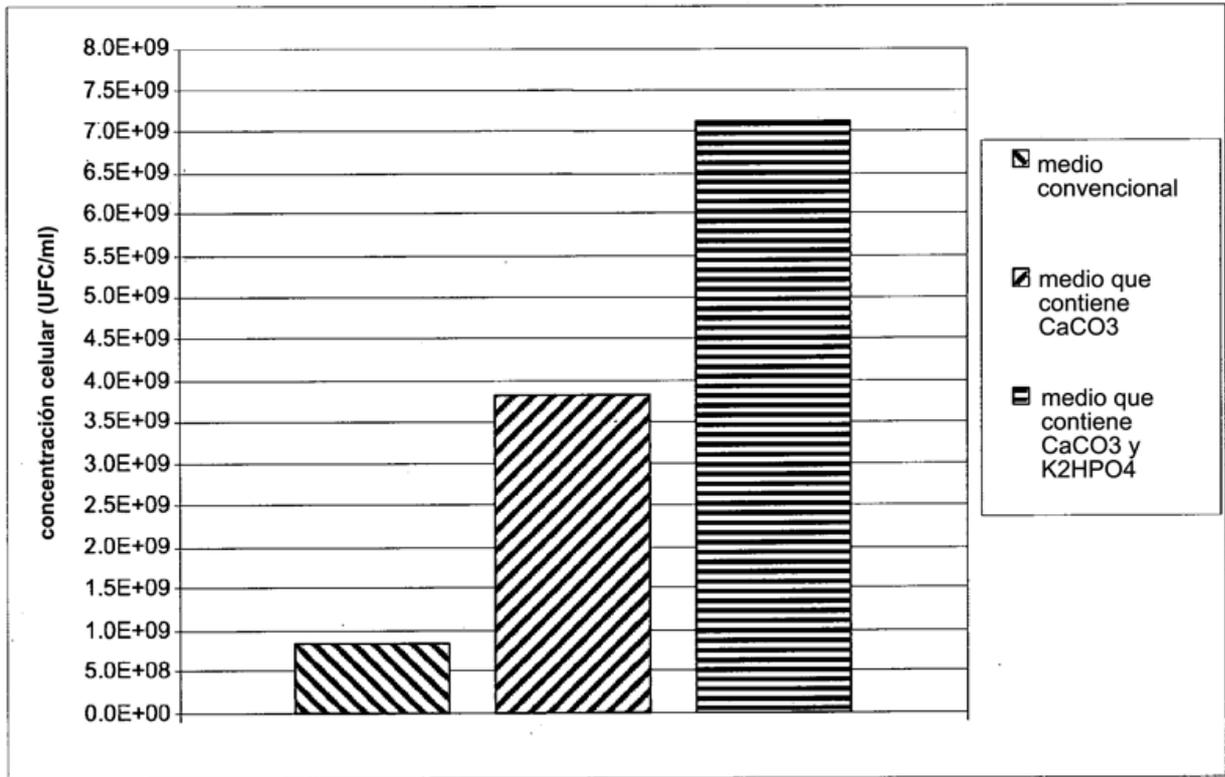


FIG. 2/3

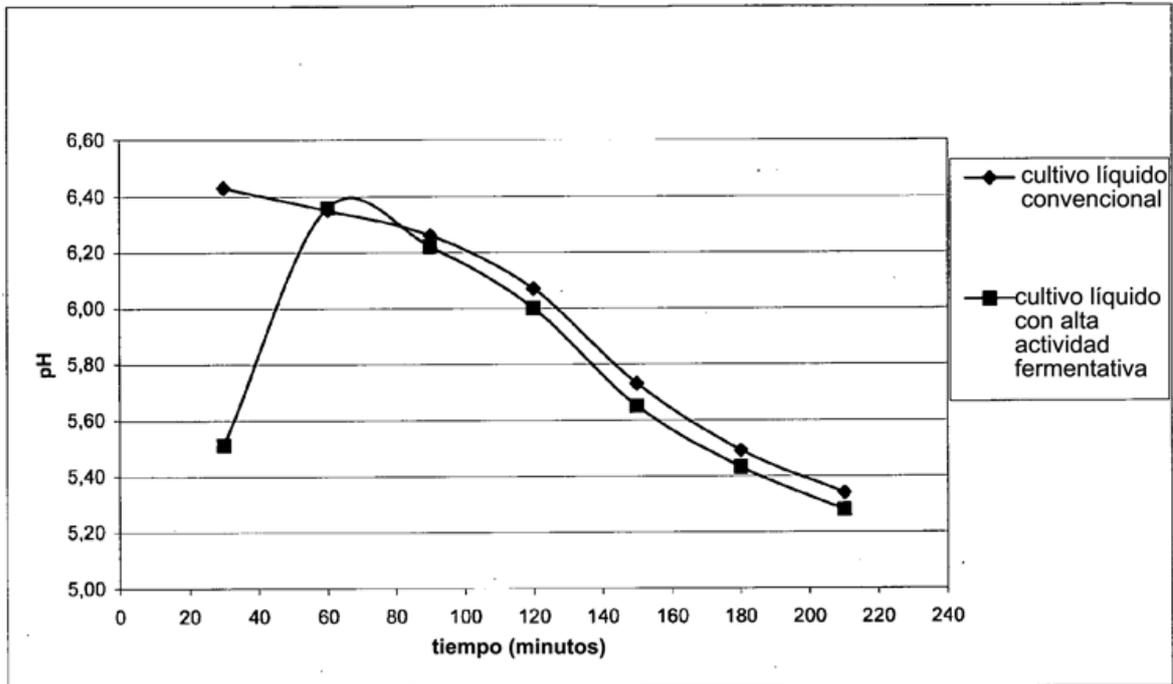


FIG. 3/3

TABLA 1

	tiempo (horas)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH del medio de cultivo	desarrollo de biomasa									enfriamiento
medio convencional	6.45	6.23	5.70	5.26	4.92	4.69	4.52	4.41	4.33	4.29
medio que contiene CaCO_3	6.47	6.26	5.78	5.41	5.21	5.18	5.18	5.17	5.02	4.97
medio que contiene CaCO_3 y K_2HPO_4	7.26	7.07	6.46	6.10	5.97	5.42	5.23	5.20	5.05	5.01

TABLA 2

tipo de medio	concentración celular alcanzada (UFC/ml)
medio convencional	8.5E+08
medio que contiene CaCO ₃	3.8E+09
medio que contiene CaCO ₃ y K ₂ HPO ₄	7.1E+09

TABLA 3

pH de la leche	lectura del pH en minutos							pH del medio de cultivo en la inoculación	% de inoculación de leche	volúmenes de cultivo para la inoculación de 1,000 litros de leche
	30	60	90	120	150	180	210			
cultivo iniciador líquido convencional	6.43	6.35	6.26	6.07	5.73	5.49	5.34	4.48	5	50
cultivo iniciador líquido con alta actividad fermentativa	6.51	6.36	6.22	6.00	5.65	5.43	5.28	5.01	0.5	5