

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 557**

51 Int. Cl.:

A23C 19/032 (2006.01)

A23C 19/05 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

A23C 19/068 (2006.01)

A23C 19/072 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2008** **PCT/EP2008/061413**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.03.2010** **WO10022790**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2008** **E 08803406 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018** **EP 2334191**

54 Título: **Uso de *L. helveticus* en un método para producir queso**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

RATTRAY, FERGAL;
JOHANSEN, ANNETTE HELLE y
BROE, MIKKEL LAUST

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 714 557 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

Uso de *L. helveticus* en un método para producir queso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para producir queso, especialmente tipo Cheddar y queso tipo continental, con un cultivo de *Lactobacillus helveticus* como cultivo adjunto.

10 **Antecedentes de la invención**

Los quesos tipo Cheddar se producen con o bien cultivos mesófilos o una mezcla de cultivos mesófilos y termófilos. Se salan en seco después de la etapa de molienda. Un ejemplo de una producción de Cheddar bastante tradicional es dada a continuación para ilustrar los procesos de fabricación (según Walstra y col., 2006 "Dairy Science and Technology"/Segunda Edición, Taylor&Francis, página 713): la leche se pasteuriza (15 s/71 °C), se rellena en la cuba para queso con una temperatura de 30 °C y se somete a preacidificación con adición de cultivo iniciador ("stater") durante 40 min a 30 °C. se añade el cuajo y el proceso de coagulación tarda 35 min a 30 °C. El coágulo se corta (10 min) y durante 30 min de agitación se calienta la cuajada/suero de leche hasta la temperatura de escaldado de 40 °C. La temperatura de escaldado se mantiene durante 60 minutos más. A continuación, la cuajada se cuaja, se fusiona dentro de una masa compacta y se extrae el suero de leche (30 min). Después, tiene lugar la transformación en cheddar (100 min) cuando la masa de la cuajada se corta en tiras largas que se amontonan y se voltean. Antes del salado, la cuajada se muele en pequeñas tiras. Se añade sal y se mezcla con las tiras de cuajada. A continuación, la cuajada salada se rellena en moldes y se prensa (16 h/2 bar). Después de una cierta fase de secado, los quesos se empaquetan y se maduran a temperatura relativamente baja tal como 8 a 11 °C.

Tradicionalmente, los quesos del tipo continental se producen con cultivos iniciadores mesófilos. Un ejemplo de un queso del tipo continental es el queso Samø. Un queso Samø (30 % de grasa en materia seca) se produce según las siguientes etapas: la leche se estandariza en contenido de grasa (por ejemplo, 1,6 % de grasa), se pasteuriza (20 s, 72 °C) y se rellena en la cuba para queso con una temperatura de 31 °C. Se puede añadir KNO₃ y CaCl₂ a la leche. Después, la leche se inocula con el cultivo iniciador mesófilo. Se añade el cuajo y el proceso de coagulación tarda 45 min a 31 °C. El coágulo se corta (5 min) y se drena 35 % del suero de leche. Se añade agua caliente y el escaldado se realiza a 37 °C. La fase de extracción por agitación dura 40 min y después el suero de leche se drena y la cuajada se transfiere a los moldes. La cuajada se prensa en los moldes a 4 bar y, a continuación, a 6 bar durante 70 min en total. Después de una fase de reposo posterior la temperatura del queso cae a 12 °C. Posteriormente los quesos se salan en un suero salino (20 horas).

En la fabricación de producto lácteo fermentado hay una necesidad constante de método de fabricación alternativo y mejorado. Tales métodos deseados generalmente se dirigen a mejorar el proceso de fabricación, por ejemplo, reduciendo el coste, incrementando la velocidad del proceso general y/o mejorando las características del producto final. Las mejoras de producto deseadas incluyen todos los parámetros de calidad del producto conocidos tales como gusto, textura, sabor, etc. En los productos fermentados, el proceso de fabricación incluye la adición de un cultivo iniciador que lleva a cabo la fermentación deseada. En la producción de queso, el objetivo del cultivo iniciador es principalmente acidificar la materia prima, leche. Con frecuencia, no es posible optimizar la función del iniciador primario de un modo que asegure el gusto/sabor óptimo del producto final.

En el caso de la producción de queso, con frecuencia la etapa de maduración está incluida en el proceso de producción. Durante la fase de maduración la proteólisis, el catabolismo de aminoácidos y la lipólisis son factores clave para el desarrollo de la textura y el sabor en el producto de queso. La fase de maduración debería dar como resultado el desarrollo de las propiedades organolépticas deseadas del queso en un marco de tiempo corto. Como resultado se ha sugerido aplicar "cultivos adjuntos" en la fabricación de productos lácteos fermentados que se dirigen a la mejora de las características del producto tales como textura y/o sabor. Esto es de especial relevancia en los quesos reducidos en grasa o bajos en grasa. Se espera que los cultivos adjuntos mejoren las características del producto tales como textura y/o sabor pero no interfieran con la acidificación de la leche causada por el cultivo iniciador primario. Los cultivos adjuntos influyen en el proceso de maduración del queso a través de sus sistemas enzimáticos que implican entre otras proteinasas, peptidasas, aminopeptidasas, aminotransferasas, esterases y lipasas. El potencial enzimático es dependiente de especie y/o cepa.

➤ Los cultivos adjuntos son con frecuencia cepas de *Lactobacillus* que muestran que contribuyen al desarrollo del sabor. Se ha estudiado el uso de *Lactobacillus helveticus* como cultivo adjunto para el queso. Sin embargo, solamente se puede usar *Lactobacillus helveticus* como cultivo adjunto a tasas de inoculación limitadas debido a su impacto sobre el perfil de acidificación. Esto es especialmente relevante en tecnologías queseras en donde la temperatura de escaldado es bastante alta para permitir el crecimiento significativo del cultivo adjunto de *Lactobacillus helveticus* termófilo (como, por ejemplo, 40 °C en una producción de queso Cheddar). Se propusieron diferentes planteamientos para superar este problema. Un planteamiento es usar cultivos adjuntos atenuados (no viables). Los métodos más investigados para la atenuación son de carácter físico, por ejemplo, golpe de calor y golpe de frío. La desventaja de este planteamiento es que el proceso de atenuación es una

etapa extra durante la preparación de cultivo que se tiene que llevar a cabo o bien en el fabricante de cultivo o el fabricante de queso bajo condiciones reproducibles. Se debería enfatizar que los cambios en el proceso de acidificación durante una producción de queso impactarán sin ninguna adaptación adicional del proceso de producción de queso sobre la separación por drenaje del suero de leche de la cuajada de leche, el contenido de minerales en la cuajada/queso y el pH mínimo durante la producción de queso. Esto tiene importantes consecuencias indeseadas sobre la composición del queso, la maduración del queso y las características obtenidas del producto tales como textura y/o sabor.

Madkor y col. ("Ripening of cheddar cheese with added attenuated adjunct cultures of lactobacilli", *Journal of Dairy Science*, vol. 83, 1 de agosto de 2000 páginas 1.684-1.691) y Tungjaroenchai W. y col. ("Influence of adjunct cultures on ripening of reduced fat edam cheeses", *Journal of Dairy Science*, vol. 84, 1 de octubre de 2001, páginas 2.117-2.124) describen el uso de *Lactobacillus helveticus* para la producción de queso.

Compendio de la invención

Sorprendentemente se ha resuelto que es posible obtener cultivo adjunto de *Lactobacillus* que no influya en la acidificación de la leche durante la producción de queso. El cultivo de *Lactobacillus* es un mutante de una cepa acidificante, y se ha resuelto que es no acidificante. Según el presente documento, los presentes inventores han propuesto un método para mejorar la textura y/o gusto y/o sabor de los quesos, especialmente del tipo cheddar y el tipo continental cuyo método implica usar una cepa de *Lactobacillus helveticus* termófila no acidificante como cultivo adjunto sin influir en la acidificación de la leche. Las cepas de *Lactobacillus helveticus* no acidificantes se obtuvieron por mutación de una cepa madre acidificante DSM 19500.

Durante la producción de queso, los mutantes no acidificantes se pueden añadir a la leche del queso junto con los cultivos iniciadores primarios.

Sorprendentemente se observó que los mutantes de *Lactobacillus helveticus* no acidificantes conservaban la capacidad de la cepa madre de mejorar la textura y/o gusto y/o sabor del queso, especialmente para quitar el amargor del queso y para introducir la nota de sabor "dulce" típico de *Lactobacillus helveticus* en queso madurado. El mutante se usó para la producción de queso como un cultivo adjunto no atenuado, así no era necesario el proceso de atenuación extra.

De acuerdo con el descubrimiento sorprendente, la presente invención se refiere a la cepa de *Lactobacillus helveticus* DSM19501 o mutantes de la misma que no son capaces de bajar el pH más de 1,5 unidades de pH desde el pH de partida 6,5 después de 10 horas de incubación a 37 °C cuando se inocula a partir de un cultivo durante una noche ("overnight") fresco a dosis de inoculación de $1,5 \times 10^7$ ufc/ml en 200 ml de leche.

Descripción detallada de la invención

Una realización interesante se refiere a un proceso para la producción de queso (incluyendo queso reducido y bajo en grasa), el cual comprende: añadir a la leche

- un cultivo iniciador, tal como cultivo que comprende una cepa acidificante perteneciente a un género seleccionado del grupo que consiste en: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, y *Enterococcus*;
- un cultivo adjunto que comprende una cepa de *Lactobacillus helveticus* no acidificante; y
- un coagulante, tal como una enzima de coagulación de la leche; y

calentar la mezcla a una temperatura (o mantener la temperatura) en el intervalo de 30 a 45 °C, tal como en el intervalo de 35 a 43 °C o en el intervalo de 37 a 43 °C.

Otra realización de interés se refiere a un proceso para producir queso (incluyendo el queso reducido y bajo en grasa), el cual comprende: añadir a la leche

- un cultivo iniciador, tal como cultivo que comprende una cepa acidificante perteneciente a un género seleccionado del grupo que consiste en: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, y *Enterococcus*;
- un cultivo adjunto que comprende una cepa de *Lactobacillus helveticus* no acidificante; y
- un coagulante, tal como una enzima de coagulación de la leche; y

calentar la mezcla a una temperatura (o mantener la temperatura) en el intervalo de 30 a 45 °C, tal como en el intervalo de 35 a 43 °C o en el intervalo de 37 a 43 °C y mantener la mezcla a ese intervalo de temperatura durante 5 a 70 minutos inmediatamente antes de que se separe el suero de leche o el prepresado debajo del suero de leche.

También, la invención se refiere a un proceso para mejorar la textura y/o gusto y/o sabor del queso, y un proceso para mejorar la calidad del queso, comprendiendo los procesos añadir a la leche

- 5 - un cultivo de bacterias de ácido láctico que comprende una cepa perteneciente a un género seleccionado del grupo que consiste en: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, y *Enterococcus*, y
 - una cepa de *Lactobacillus helveticus* no acidificante; y;
 - un coagulante, tal como una enzima de coagulación de la leche; y
- 10 calentar la mezcla a una temperatura (o mantener la temperatura) en el intervalo de 30 a 45 °C, tal como en el intervalo de 35 a 43 °C o en el intervalo de 37 a 43 °C.

- La cepa de *Lactobacillus helveticus* no acidificante no es capaz de bajar el pH más de 1,5 unidades de pH (tal como más de 1,3) desde el pH de partida 6,5 después de 10 horas de incubación a 37 °C cuando se inocula a partir de un cultivo durante una noche fresco a dosis de inoculación de $1,5 \times 10^7$ ufc/ml en 200 ml de leche, especialmente en
- 15 leche preparada a partir de leche en polvo desnatada al 9,5 % rehidratada en agua (tratada con calor a 140 °C/8 s y 100 °C/30 min). Por tanto, en la realización más preferida, la cepa de *Lactobacillus helveticus* no acidificante no es capaz de bajar el pH más de 1,3 unidades de pH desde el pH de partida 6,5 después de 10 horas de incubación a 37 °C cuando se inocula a partir de un cultivo durante una noche fresco a dosis de inoculación de $1,5 \times 10^7$ ufc/ml en
- 20 200 ml de leche preparada a partir de leche en polvo desnatada al 9,5 % rehidratada en agua (tratada con calor a 140 °C/8 s y 100 °C/30 min).

- La cepa de *Lactobacillus helveticus* no acidificante puede ser un mutante de una cepa acidificante (la cual en el presente contexto es una cepa capaz de bajar el pH más de 1,3 (o más de 1,5) unidades de pH desde el pH de partida 6,5 después de 10 horas de incubación a 37 °C cuando se inocula a partir de un cultivo durante una noche fresco a dosis de inoculación de $1,5 \times 10^7$ ufc/ml en 200 ml de leche preparada a partir de leche en polvo desnatada al 9,5 % rehidratada en agua (tratada con calor a 140 °C/8 s y 100 °C/30 min). En una realización, la cepa de
- 25 *Lactobacillus helveticus* no acidificante es un mutante de una cepa de *Lactobacillus helveticus* acidificante, preferentemente un mutante que tiene una actividad proteasa unida a pared celular al menos tan alta como la cepa madre (determinada por el método idéntico descrito en el ejemplo 1c). La cepa de *Lactobacillus helveticus* no acidificante es un mutante de la cepa acidificante DSM 19500, por ejemplo, el mutante DSM19501.
- 30

- En una realización importante del proceso de la invención, el cultivo iniciador se añade en una cantidad de al menos 10^3 UFC por ml de leche, y/o la cepa de *Lactobacillus helveticus* se añade en cantidad de al menos 10^4 (tal como al menos 10^5 , 10^6 , al menos 10^7 o 10^8) UFC por ml de leche.
- 35

- En el proceso de la invención el cultivo iniciador puede comprender bacterias pertenecientes a una cepa seleccionada del grupo que consiste en: *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus acidophilus*, preferentemente la cepa es *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.
- 40

- El queso producido por el proceso puede ser un queso tipo cheddar, o un queso tipo continental (por ejemplo, Gouda, Danbo, Havarti, etc.), incluyendo el queso bajo en grasa, y por tanto actualmente se prefiere que no se añadan bacterias pertenecientes al género *Propionibacterium* a la leche, especialmente en una concentración por encima de 10^2 ufc por ml, sino que el proceso en su lugar comprenda la etapa adicional de prensado de la mezcla obtenida en la etapa de calentamiento, o bien antes o después del salado. El queso prensado y salado preferentemente se conserva a una temperatura en el intervalo de 1 a 25 °C, o el queso prensado y salado no se mantiene a una temperatura por encima de 25 °C durante más de 2 horas.
- 50

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un queso (incluyendo un queso bajo en grasa) obtenible por el proceso de cualquier reivindicación precedente, tal como un queso tipo cheddar.

55 Definiciones

- Por el término "leche" se entiende una composición que comprende secreción láctea obtenida de cualquier mamífero, tal como un animal de una especie perteneciente a la subfamilia Bovinae (que incluye la vaca doméstica (*Bos taurus*) y el búfalo); un animal de una especie perteneciente a la subfamilia Caprinae (que incluye cabra y oveja); o un animal de las especies de Camelidae (que incluye los camellos). Opcionalmente la leche se acidifica, por ejemplo, por adición de un ácido (tal como ácido cítrico, acético o láctico) o por adición de un microorganismo productor de ácido. La leche puede estar cruda o procesada, por ejemplo, por filtración, esterilización, pasteurización, homogenización, fraccionamiento (por ejemplo, reduciendo el contenido de grasa de la leche), etc., o puede ser leche en polvo reconstituida. Un ejemplo importante de "leche" según la presente invención es la leche de vaca pasteurizada. Se entiende que la leche se puede acidificar, mezclar o procesar antes, durante y/o después de la adición de los cultivos bacterianos.
- 60
- 65

El término “coagulante” se refiere a cualquier tipo de agente de coagulación de la leche, tal como una enzima nativa derivada de fuentes microbianas, vegetales o de tejido animal o una enzima de coagulación de la leche proporcionada como un producto génico de células recombinantes que expresan una enzima de coagulación de la leche de origen animal o microbiano. El término incluye quimosina bovina purificada de tejido abomaso o producida por fermentación (por ejemplo, CHY-MAX® o CHY-MAX® M).

El término “queso” se refiere a un producto preparado poniendo en contacto opcionalmente leche acidificada (por ejemplo, por medio de un cultivo bacteriano de ácido láctico) con un coagulante, y drenando la cuajada resultante. Los quesos y su preparación se describen en “Cheese and Fermented Milk Foods”, por Frank V. Kosikowski.

El término “queso de tipo cheddar” se debería entender como quesos de los tipos tales como Cheddar, Territoriales, Cheddar americano, Monterey Jack y Colby, y/o quesos producidos por un proceso que incluye calentamiento de la cuajada a una temperatura que no supera los 45 °C. En el presente contexto, el queso del tipo cheddar se caracteriza por:

- Grasa en materia seca: 10 a 60 %
- Humedad: 34 a 42 %
- Contenido de sal: 1,5 a 2,5 %
- Etapa de transformación en Cheddar y posterior molienda
- Salado después de la molienda pero antes del prensado
- Etapa de prensado

El término “queso del tipo continental” se debería entender como quesos de los tipos, tales como Gouda, Danbo, Edam, St. Paulin, Raclette, Fontal, etc. y/o quesos producidos por un proceso que incluye calentamiento de la cuajada a una temperatura que no supera los 45 °C. En el presente contexto, el queso del tipo continental se caracteriza por:

- Grasa en materia seca: 10 a 60 %
- Contenido de agua: 35 a 57 %
- Agua en la materia de queso libre de grasa: 53 a 63 %
- Contenido de sal: 1 a 3,5 %
- Etapa de prensado durante el proceso de fabricación de queso
- Salado después de prensado con mayor frecuencia en una solución salina

El término “queso reducido en grasa” se refiere a queso que tiene un contenido de grasa reducida a 32 % de grasa en materia seca o menos, bajado a 25 % de grasa en materia seca, y el término “queso bajo en grasa” se refiere a queso que tiene un contenido de grasa reducido a 25 % de grasa en materia seca o menos. El experto en la técnica está familiarizado con el ajuste del contenido de grasa de la leche con respecto al contenido de proteína variante de la leche. El contenido en grasa en el queso se puede determinar después del método de van Gulik ISO 3433, comúnmente conocido por el experto en la técnica. Ejemplo para el queso Gouda:

queso de grasa completa: 45 % de grasa en materia seca/aproximadamente 3,1 % de grasa en leche
 queso reducido en grasa: 30 % de grasa en materia seca/aproximadamente 1,6 % de grasa en leche
 queso bajo en grasa: 15 % de grasa en materia seca/aproximadamente 0,7 % de grasa en leche

Como se usa en la presente memoria el término “bacteria de ácido láctico” se designa a una bacteria microaerófila o anaeróbica gram positiva, la cual fermenta azúcares con la producción de ácidos incluyendo el ácido láctico como el ácido predominantemente producido. Las bacterias de ácido láctico industrialmente más útiles se encuentran entre *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.* Además, las bacterias productoras de ácido láctico pertenecientes al grupo de las bacterias anaeróbicas estrictas, *Bifidobacterium spp.*, las cuales frecuentemente se usan como cultivos alimenticios solos o en combinación con otras bacterias de ácido láctico, en general están incluidas en el grupo de las bacterias de ácido láctico. El término “UFC” (o “ufc”) es la abreviatura para las unidades formadoras de célula.

El término “cultivo iniciador” se refiere a cualquier cultivo bacteriano que es adecuado para su uso en la acidificación de la leche, especialmente bacterias de ácido láctico tales como Bifidobacterias, Lactobacilos, Lactococos, Leuconostocs, Micrococos y Pediococos. Se apreciará que el término cultivo iniciador puede abarcar un cultivo que contiene una cepa única de bacteria, o más de una cepa bacteriana. El término también puede incluir organismos genéticamente modificados (OGM). En cualquier evento, el término es bien conocido en la técnica y la invención se extiende igualmente a todos los cultivos iniciadores conocidos. El término incluye cultivos bacterianos que contienen una cepa de un género seleccionado del grupo que consiste en *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, etc. tal como una cepa de una especie seleccionada del grupo que consiste en: *Lactococcus lactis* (incluyendo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremosis*, y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), *Leuconostoc mesenteroides* (incluyendo la subsp. *cremosis*), *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei* (incluyendo la subsp. *casei*) y, *Lactobacillus paracasei* (incluyendo la subsp. *paracasei*), *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus helveticus*,

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus acidophilus*. Otras especies bacterianas útiles son especies de *Bifidobacterium* que incluyen *B. bifidum*, *B. lactis*, y *B. longum*, *Streptococcus faecium*, *Leuconostoc lactis*.

Como se mencionó previamente, las bacterias de ácido láctico son esenciales en la producción de casi todos los productos lácteos fermentados, por ejemplo, queso, y se suministran normalmente a la industria láctea o bien como cultivos congelados o liofilizados para la propagación del iniciador a gran escala o como los llamados cultivos “de inoculación directa” (DVS), destinados a la inoculación directa en un recipiente de fermentación o cuba para la producción de un producto lácteo. Tales cultivos en general son referidos como “cultivos iniciadores” o “iniciadores”.

Las cepas de cultivo iniciador comúnmente usadas de bacterias de ácido láctico en general se dividen en organismos mesófilos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo a aproximadamente 30 a 35 °C y organismos termófilos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo en el intervalo de aproximadamente 40 a aproximadamente 45 °C. Los organismos típicos pertenecientes al grupo mesófilo incluyen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremosis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremosis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Las especies bacterianas de ácido láctico termófilas incluyen como ejemplos *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus acidophilus*.

Además, las especies de *Propionibacterium* se usan como cultivos iniciadores lácteos, en particular en la fabricación de queso.

Los “cultivos adjuntos” se definen en este contexto como cepas de microorganismos relacionados con queso que se añaden a la leche del queso para mejorar la calidad sensorial del queso en términos de textura y/o gusto y/o sabor. Los cultivos adjuntos se seleccionan específicamente para sus capacidades para mejorar la calidad sensorial del queso y se añaden intencionalmente a la leche del queso por el fabricante de queso a preferentemente 10^2 a 10^8 ufc/ml de leche. Los cultivos adjuntos influyen en el proceso de maduración del queso a través de sus sistemas enzimáticos que implican entre otras proteinasas, peptidasas, aminopeptidasas, aminotransferasas, esterases y lipasas. El potencial enzimático es dependiente de especie y/o cepa.

Los cultivos adjuntos han llegado a ser una herramienta importante para los fabricantes de queso para conseguir quesos con gusto y/o textura y/o sabor mejorado. La necesidad de mejorar el desarrollo de sabor especialmente en queso reducido o bajo en grasa ha creado un interés creciente en la utilización de cultivos adjuntos.

El término “no acidificante” en el presente contexto se refiere a una cepa que no baja el pH de la leche (bovina) más de 1,5, o actualmente preferido, no más de 1,3 unidades de pH desde el pH de partida 6,5 después de 10 horas de incubación a 37 °C, preferentemente bajo las siguientes condiciones:

- inoculado a partir de un cultivo durante una noche fresco a dosis de inoculación de $1,5 \times 10^7$ ufc/ml
- dentro de la leche (por ejemplo, 200 ml) preparada a partir de leche desnatada al 9,5 %, por ejemplo, en polvo rehidratada en agua, y preferentemente tratada con calor a 140 °C/8 s y 100 °C/30 min. El experto en la técnica debería entender cómo se incuba la cepa de *L. helveticus* y valorar las propiedades de acidificación de la cepa, y encontrará consejo en el ensayo: valoración de la actividad de acidificación de los mutantes por medición directa del pH en leche, véase el ejemplo 2.

En el presente contexto, el término “mutante” se debería entender como una cepa derivada de una cepa de la invención por medio de, por ejemplo, modificación por ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico. Se prefiere que el mutante sea un mutante funcionalmente equivalente, por ejemplo, un mutante que tiene básicamente las mismas propiedades no acidificantes, o mejoradas, que la cepa madre. Tal mutante es una parte de la presente invención. Especialmente, el término “mutante” se refiere a una cepa obtenida sometiendo una cepa de la invención a cualquier tratamiento de mutagenización convencionalmente usado incluyendo el tratamiento con un mutágeno químico tal como etano metano sulfonato de (EMS), o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o a un mutante que se da espontáneamente.

En el presente contexto, el término “variante” se debería entender como cepa que es funcionalmente equivalente a una cepa de la invención, por ejemplo, que tiene básicamente las mismas propiedades no acidificantes, o mejoradas. Tales variantes, las cuales se pueden identificar usando técnicas de cribado apropiadas, son una parte de la presente invención.

El uso de los términos “un” y “una” y “el/la” y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) son para ser interpretados para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” son para ser interpretados como términos abiertos (es decir, significando “que incluye, pero no se limita a”) a menos que se indique lo contrario. La relación de intervalos de valores en el presente documento simplemente está dirigida a servir como un método

abreviado de referencia de manera individual a cada valor separado que cae dentro del intervalo, a menos que se en el presente documento indique lo contrario, y cada valor separado se incorpora dentro de la memoria como si estuviera enumerado individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o si no se contradiga claramente por el contexto. El uso de alguno y todos los ejemplos, o vocabulario ilustrativo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, está destinado simplemente a aclarar mejor la invención y no posee una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún vocabulario en la memoria se debería interpretar que indica que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

Dibujos

La Figura 1 representa la actividad proteínasa unida a pared celular del tipo silvestre y un mutante de *Lb. helveticus* DMS19500. La actividad proteínasa asociada a pared celular se muestra como actividad específica (unidades de fluorescencia/unidad de DO), cf. el ejemplo 1.

La Figura 2 representa el perfil de acidificación en leche de la cepa madre de *Lactobacillus helveticus* DSM19500 y la cepa mutante de *Lactobacillus helveticus* DSM19501, cf. el ejemplo 2.

La Figura 3 representa el perfil de acidificación durante la producción del queso control, queso producido con la cepa madre de *Lactobacillus helveticus* DSM19500 como adjunto y el queso producido con la cepa mutante de *Lactobacillus helveticus* DSM19501 como adjunto, cf. el ejemplo 3.

La Figura 4 representa el perfil de sabor del queso control, queso producido con cepa madre de *Lactobacillus helveticus* DSM19500 y el queso producido con la cepa mutante de *Lactobacillus helveticus* DSM19501, cf. el ejemplo 3.

Depósitos y solución experta

La cepa madre de *Lactobacillus helveticus* se depositó el 04-07-2007 en el "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH", Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig (DSM) y se dio el número de acceso DSM 19500. La cepa mutante de *Lactobacillus helveticus* se depositó el 04-07-2007 en el "DSM" y se dio el número de acceso DSM19501. Los depósitos se hicieron según el tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con el fin del procedimiento de patente.

El solicitante requiere que una muestra de los microorganismos depositados indicados anteriormente se pueda hacer disponible solamente a un experto, hasta la fecha sobre lo cual se concedió la patente.

Referencias

Walstra y col., 2006 "Dairy Science and Technology" / Segunda Edición, Taylor&Francis "Cheese and Fermented Milk Foods", por Frank V. Kosikowski.

El-Soda y col., 2000. "Adjunct cultures: Recent Developments and Potential Significance to the Cheese Industry". *Journal of Dairy Science*. 83:609-619.

Todas las referencias citadas en este documento de patente están incorporadas por la presente en el presente documento en su totalidad por referencia.

Experimental

Fabricación de queso convencional

La mayoría de las producciones de queso incluyen una pasteurización y estandarización de la grasa de la leche del queso antes de la inoculación del cultivo iniciador de bacterias de ácido láctico (o bien como a gran escala líquido o como bacterias concentradas (congeladas o liofilizadas), por ejemplo, inoculación directa (DVS) de Chr. Hansen). La inoculación del cultivo iniciador tiene lugar generalmente a temperaturas de 30 a 35 °C. El denominado tiempo de premaduración puede variar entre los tipos de queso, pero generalmente está en el intervalo de 10 a 60 min antes de que se añada un coagulante para cuajar la leche que tiene un tiempo de coagulación general en el intervalo de 15 a 60 min.

Cuando se forma la cuajada se corta en cubos (generalmente 5 a 20 mm) para facilitar la sinéresis del suero de leche y la concentración de los constituyentes de la leche durante una agitación suave. Muchas de las variedades de queso se someten a un incremento de temperaturas en la cuba para queso (generalmente 36 a 45 °C). Esto normalmente se hace con dos fines: 1) incrementar la velocidad de sinéresis y reducir la humedad final en el queso y 2) afectar al cultivo iniciador o bien incrementado la velocidad de acidificación de especialmente el LAB termófilo y/o

induciendo la lisis del LAB mesófilo. Durante el proceso en la cuba para queso, se pueden separar partes del suero de leche y se puede añadir agua. Cuando los granos de cuajada obtienen la textura y la acidez correcta (generalmente pH 5,0 a 5,5) los granos se moldean (con o sin suero de leche separado) y se presionan en formas dependiendo de la variedad específica de queso. La mayoría de los quesos se salan, lo cual se puede hacer o bien antes (generalmente salado en seco) o después (salado por suero salino) del moldeado. Las condiciones de maduración y almacenaje varían entre diferentes variedades de queso.

Análisis sensorial

Según las Normas Internacionales (ISO 5492:1992 "Sensory analysis-vocabulary") la percepción sensorial incluye los atributos "gusto", "sabor", "olor" y "aroma". El aroma y el olor están principalmente asociados con la percepción por el órgano olfativo (nariz) antes de y durante la comida. El gusto se define como los gustos básicos percibidos por las papilas gustativas en la boca. Generalmente, el gusto se describe como "dulce", "agrio/ácido", "salado" y "amargo". El sabor se define como una combinación compleja de las sensaciones olfativas, gustativas (gusto) y trigeminales (impresión) percibidas durante la comida. Cuando los productos alimenticios son para ser evaluados sensorialmente es costumbre centrarse en la percepción del gusto y el sabor.

Por tanto, cuando la expresión "gusto y/o sabor mejorado/alterado" se usa en el presente documento, es para ser entendida como el gusto y/o sabor mejorado/alterado como se percibe y se describe por el panel sensorial que evalúa el queso de la invención. Esto no se debería tomar como una exclusión del olor y/o aroma posiblemente alterado sino simplemente como un medio sencillo para describir el producto lácteo fermentado de la invención.

Para ilustrar, en el ejemplo de trabajo 3 en el presente documento, un método de evaluación sensorial adecuado es el "Perfil sensorial". Preferentemente, el ensayo se realiza de acuerdo con la Norma Internacional (ISO 13299:2003 "Sensory analysis-Methodology-General guidance for establishing a sensory profile").

Esta norma describe una guía sobre las etapas que son comunes a todos los perfilados sensoriales. Los perfiles sensoriales se pueden establecer para productos tales como, por ejemplo, comidas y bebidas. El perfilado sensorial se basa en el concepto de que la impresión sensorial producida por la muestra consiste en un número de atributos sensoriales identificables (descriptores), cada uno de los cuales está presente a un grado mayor o menor. El listado de descriptores sensoriales relevantes, cada uno con su valor de intensidad, es el perfil sensorial. El perfilado sensorial se puede usar para comparar un producto/muestra con un patrón o con otros productos similares, también a través de todos los sentidos. Por tanto, el método es adecuado para el presente fin, es decir, evalúa el efecto del uso de un ingrediente adicional, es decir, un cultivo adjunto en la producción de un producto lácteo fermentado.

Como se ilustrará en el ejemplo 3 en el presente documento, los asesores del panel sensorial serán capaces de comparar el producto producido según la presente invención que usa un *Lactobacillus helveticus* no acidificante como cultivo adjunto en comparación con un producto producido con un *Lactobacillus helveticus* acidificante y el producto producido sin cultivo adjunto.

Ejemplo 1: Generación de mutantes de *Lactobacillus helveticus* no acidificantes y verificación de su comportamiento de acidificación en leche

a) Generación de mutantes no acidificantes de *Lactobacillus helveticus* DSM19500 por mutagénesis por etil metano sulfonato (EMS)

- A partir de ampolla de reserva congelada, se inocularon 100 µl de cepa DSM19500 dentro de 10 ml de caldo M17+lactosa al 1 %. El cultivo se incubó a 37 °C durante una noche (anaeróbico).
- Se añadieron 150 µl de etil metano sulfonato a los 10 ml de cultivo durante una noche y el tubo se selló con parafilm. El cultivo con EMS se inoculó en una caja incubadora cerrada a 37 °C girando lentamente durante 2 horas. Se inoculó 200 µl de cultivo con EMS en 10 ml de caldo M17+lactosa al 1 %. El cultivo se incubó a 37 °C durante una noche (anaeróbico).
- Se añadió 200 µl de glicerol al 87 % a 1.000 µl de cultivo durante una noche con EMS, se mezcló cuidadosamente y las reservas se almacenaron a menos 80 °C. Se extendieron 100 µl de muestra diluida a 10^{-4} a 10^{-7} sobre placas Petri con 20 ml de agar M17+lactosa al 1 % p/v+0,5 mg/ml de sulfato de estreptomicina y se extendieron 100 µl de muestra diluida a 10^{-4} a 10^{-7} sobre placas Petri con 20 ml de agar M17+lactosa al 1 % y se incubó a 37 °C, anaeróticamente, durante una noche.
- La frecuencia de mutagénesis se revisó contando las colonias sobre las placas con estreptomicina y comparando con los números de colonias sobre las placas sin estreptomicina. La frecuencia de colonias resistentes a estreptomicina debería incrementar si la mutagénesis ha funcionado satisfactoriamente. Además, el número de colonias sobre las placas sin estreptomicina se usó para calcular la UFC/ml para obtener 3.000 colonias cuando se coloca en placa el cultivo sometido a mutagénesis sobre bandeja Q (Genetix Ltd., UK) para la recolección por un recolector de colonia automatizado.
- Las bandejas Q contenían agar MRS y se incubaron a 37 °C durante una noche anaeróticamente. Las colonias se transfirieron por el recolector de colonia a placas de microtitulación para la valoración de la

actividad de acidificación en la leche.

b) Ensayo para la valoración de la actividad de acidificación de los mutantes en placas de microtitulación durante el proceso de cribado

La leche usada para los experimentos de acidificación se preparó a partir de leche en polvo desnatada al 9,5 % rehidratada en agua y posteriormente tratada con calor a 140 °C/8 s y 100 °C/30 min.

Se usaron placas de microtitulación (384 pocillos) con leche que contenía 0,0476 mg/ml de púrpura de bromocresol (sal de Na) y 0,0476 mg/ml de verde de bromocresol (sal de Na) para cribado de mutantes capaces de crecer en leche (método visto en el documento WO2005/068982). Las placas de microtitulación se incubaron a 37 °C durante una noche, anaeróticamente. Si la leche cambiaba de color de azul a amarillo, la cepa era capaz de crecer y producir ácido a partir de la lactosa acidificando así los medios. Si el color de la leche permanecía azul la cepa no era capaz de producir ácido en la leche.

La estabilidad de los aislados no acidificantes se ensayaron volviendo a poner (*re-striking*) 3 veces sobre las placas de agar con leche con indicador: las placas de agar se prepararon a partir de leche que contenía 0,0476 mg/ml de púrpura de bromocresol (sal de Na) y 0,0476 mg/ml de verde de bromocresol (sal de Na) como se describió anteriormente. Se disolvió 3,375 g de agar bacto en 25 ml de agua milliQ y se añadieron a 200 ml de leche con indicador caliente. Los aislados se incubaron a 37 °C y se verificó que los aislados no acidificantes no comenzaron la acidificación, sino que permanecieron azul en color (indicador de pH) y crecieron escasamente sobre las placas de leche con indicador. La cepa madre DSM19500 se volvió amarilla sobre las placas de agar con leche con indicador.

c) Valoración de la actividad proteinasa

Los aislados seleccionados, incapaces de crecer en leche, se inocularon en placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía medios MRS. La placa de microtitulación se incubó a 37 °C, durante una noche anaeróticamente. La actividad proteinasa asociada a pared celular se determinó en un robot de manejo de líquidos como se describe a continuación:

Solución A: tampón MES 100 mM, pH 5,5 que contenía CaCl₂ 50 mM (19,52 g de MES y 7,35 g de CaCl₂. Añadir agua hasta 800 ml, ajustar pH a 5,5 con HCl 1 M. Rellenar con agua hasta 1.000 ml).

Solución B: 5 mg/ml de caseína marcada con FITC (Sigma C3777), preparada en agua Milli-Q.

Solución C: TCA al 5 % p/v (5 g de TCA. Añadir agua Milli-Q hasta 100 ml).

Solución D: Tris-HCl 500 mM, pH 8,5 (60,55 g de Tris-HCl. Añadir agua a 800 ml, ajustar pH a 8,5 con HCl 1 M. Rellenar con agua hasta 1.000 ml).

Placas de microtitulación: *Nunc* (Nº del producto 167008), *Nunc Black* (Nº del producto 237105), placa *MJR PCR* (en forma de V, Nº del producto HSP-9665).

Robot de manejo de líquidos Tecan con 8 y 96 unidades de pipeteo, lector de fluorescencia/absorbancia (Genious o Vic2), incubador Galaxy, dos brazos robóticos, unidades de enfriamiento y una centrífuga de placa de microtitulación

1. La placa de microtitulación se centrifugó (2.200 rpm durante 2 minutos, 6 °C) y 180 µl de sobrenadante se aspiró al material sobrante. Las células se resuspendieron en 180 µl de solución A (enfriada previamente a 4 °C). Esta etapa de lavado se repitió una vez más.

2. Se dispensaron 4 µl de caseína marcada con FITC (enfriada previamente a 4 °C) a una placa de microtitulación *MJR PCR*.

3. Se dispensaron 20 µl de suspensión celular a la placa de microtitulación *MJR PCR*. La placa de microtitulación *MJR PCR* se incubó durante 3 horas o 6 horas a 37 °C (una placa de microtitulación por tiempo de incubación).

4. Se dispensaron 57,5 µl de solución C a la placa de microtitulación *MJR PCR*. La placa de microtitulación *MJR PCR* se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa de microtitulación *MJR PCR* (2.200 rpm durante 2 minutos, 6 °C) se centrifugó y se dispensaron 45 µl desde la placa de microtitulación *MJR PCR* a una placa de microtitulación *Nunc Black*. 125 µl de la solución D se aspiró a la placa de microtitulación *Nunc Black* y se mezcló.

5. Se leyó la fluorescencia (lector Genious) de la placa de microtitulación *Nunc Black* usando la excitación y las longitudes de onda de emisión de 485 y 535 nm, respectivamente.

A la vez se determinó la densidad óptica de las suspensiones celulares lavadas:

20 µl de células tres veces lavadas y finalmente resuspendidas de la etapa 1 se aspiraron a una placa de microtitulación *Nunc Black*. Se añadió 80 µl de solución A a la placa de microtitulación *Nunc Black* y se mezcló. Se midió la densidad óptica de las suspensiones celulares a 595 nm.

La Figura 1 muestra la actividad proteinasa unida a la pared celular de la cepa tipo silvestre de *Lactobacillus*

helveticus DSM19500 y el mutante DSM19501. La actividad proteinasa asociada a la pared celular se muestra como actividad específica (unidades de fluorescencia/unidad de DO). Por cepa, se produjeron 8 subcultivos de crecimiento independientes y se dieron las desviaciones estándar para estas 8 réplicas por cepa.

- 5 Se mostró que el mutante no acidificante DSM19501 tiene actividad proteinasa unida a la pared celular comparable con la cepa madre

Ejemplo 2: Valoración de la actividad de acidificación de los mutantes por medición del pH directa en leche

- 10 Como inicio, se produjeron ampollas de trabajo incubando las cepas en caldo MRS a 37 °C durante una noche. El pH se ajustó a pH 6,2 con NaOH y glicerol esterilizado al 20 %. Las ampollas de cada cepa se almacenaron congeladas a -80 °C. Las cepas se inocularon a partir de las ampollas congeladas a 1 % v/v en medio de crecimiento MRS y se incubaron a 37 °C durante una noche para obtener $1,5 \times 10^9$ ufc/ml.
- 15 Se inocularon 2 ml del cultivo durante una noche en 200 ml de leche y se incubaron a 37 °C. La leche usada para los experimentos de acidificación se preparó a partir de leche en polvo desnatada al 9,5 % rehidratada en agua y posteriormente se tratada con calor a 140 °C/8 s y 100 °C/30 min. El pH se midió continuamente con sondas de pH conectadas a un registrador de datos.
- 20 La cepa madre se acidificó hasta pH 4,2 a las 10 horas mientras que la cepa no acidificante permaneció a pH mayor (véase la figura 2).

Ejemplo 3: Uso del mutante de *Lactobacillus helveticus* no acidificante DSM19501 como cultivo adjunto en la producción de queso Cheddar

- 25 Los quesos Cheddar (50% de grasa en materia seca y 54 % de humedad en sustancia no grasa) se produjeron a partir de leche bovina pasteurizada (72 °C durante 15 s) usando quimosina (CHY-MAX™ Plus, Chr. Hansen A/S) y un cultivo iniciador de Cheddar congelado F-DVS RST-630 compuesto de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Streptococcus thermophilus* (0,008 % de p/p de F-DVS RST630, Chr. Hansen A/S).
- 30 Los quesos experimentales se produjeron con solo el cultivo iniciador, en combinación con la cepa madre de *Lactobacillus helveticus* DSM19500 o en combinación con la cepa mutante de *Lactobacillus helveticus* no acidificante DSM19501 respectivamente. El nivel de inoculación de las cepas de *Lactobacillus helveticus* era de 6×10^6 ufc/ml de leche.
- 35 El método de fabricación usado era como se describió previamente (la fabricación de queso convencional) con una inoculación de iniciador a 32 °C, un tiempo de premaduración de 45 minutos y un tiempo de cuajado de 45 minutos. El coágulo se cortó en cubos (5x5x5 mm), se agitó durante 15 min y, a continuación, se incrementó la temperatura a 40 °C en 40 minutos. Después del escaldado la agitación continuó durante más de 20 minutos. A continuación, el suero de leche se drenó y la cuajada se drenó más hasta que se alcanzó el pH de 5,2 a 5,3. La cuajada se molió, se
- 40 saló y se rellenó en moldes. Los quesos se presionaron en moldes durante 17 horas. Se obtuvo un queso de aproximadamente 14 kg a partir de cada cuba de 150 kg de leche de cuba.
- Después de prensar se retiraron los quesos de los moldes y se empaquetaron al vacío en bolsas de plástico Cryovac® BL1L (Cryovac, St. Neots, Bélgica) y se almacenaron a 9 °C durante un tiempo de almacenaje definido.
- 45

La evolución de los valores de pH se siguió durante la producción de queso como se muestra a continuación:

Etapa en la fabricación	Tiempo [horas] después de la adición de cultivo	Queso control sin adjunto	Queso con cultivo adjunto mutante DSM19501	Queso con cultivo adjunto cepa madre DSM19500
Añadir leche	0:00	6,62	6,62	6,62
Extraer suero de leche	2:45	6,39	6,35	6,31
2. voltear	3:20	5,85	5,79	5,74
3. voltear	3:40	5,59	5,54	5,45
4. voltear	4:05	5,39	5,36	5,24*
5. voltear	4:15	5,34	5,27*	
6. voltear	4:30	5,29*		
Queso de 1 semana de maduración		5,26	5,26	5,08

* pH de molienda alcanzado

- 50 El pH de molienda se alcanzó 25 minutos antes cuando se usó la cepa madre de *Lactobacillus helveticus* DSM19500 como adjunto en comparación con el queso de referencia sin usar el cultivo adjunto de *Lactobacillus*

helveticus.

El uso del mutante no acidificante DSM19501 tenía solamente influencia menor sobre la acidificación de la leche, véase la figura 3.

El pH a 1 semana de maduración era significativamente menor en el queso producido con la cepa madre de *Lactobacillus helveticus* DSM19500 como adjunto.

Evaluación sensorial

Un panel experto (5 panelistas) evaluó los quesos organolépticamente después de 10 semanas de maduración. Las bandejas con muestras de quesos se templaron en un armario termostático a 12 °C antes de la evaluación sensorial. A los panelistas se les pidió considerar cada queso sobre una escala no diferenciada de 15 cm para cada atributo sensorial (siendo 0 baja intensidad y siendo 15 alta intensidad).

El queso control producido sin cultivo adjunto era el queso de referencia para el perfilado sensorial. Primero se estableció perfil sensorial consenso del queso de referencia.

Entonces, se evaluaron los dos quesos que contenían cultivos adjuntos y el queso control sin cultivo adjunto. Un código de identificación de tres dígitos aleatorios se dio a cada una de las muestras. El perfil consenso de cada queso se estableció en comparación con la referencia. Los valores dados para el queso control en la tabla de más adelante son promedios del primer perfilado como queso de referencia y la segunda evaluación entre las muestras codificadas.

Perfiles de sabor de quesos Cheddar a 10 semanas de maduración (escala 0 a 15 cm)

	Queso control sin cultivo adjunto	Queso con cultivo adjunto DSM19501	Queso con cultivo adjunto DSM19500
Leche hervida	6,50	6,00	4,00
Suero de leche	4,00	4,00	4,00
Grasa en leche	9,13	4,00	6,50
Azufre	2,75	2,75	1,50
Caldoso	5,50	5,25	7,75
Casero	4,00	4,25	5,25
Agrio	6,50	6,50	6,50
Amargo	5,25	4,00	3,50
Salado	5,63	6,50	7,75
Dulce	4,63	6,50	7,50

Los perfiles de sabor de los tres quesos (excepto los descriptores “suero de leche” y “agrio” que tienen los mismos valores para todos los tres quesos) se muestran en la figura 4.

El queso control producido sin cultivo adjunto se relacionó con los descriptores sensoriales “leche hervida”, “amargo” y “grasa en leche”. Por el contrario, los dos quesos producidos con cepas de *Lactobacillus helveticus* adjuntas eran diferentes del queso control. Los descriptores sensoriales como “salado” y “dulce” dominaron más y aquellos quesos se describieron como significativamente menos amargos que el queso control.

De ese modo se demostró que las cepas de *Lactobacillus helveticus* no acidificantes se pueden usar con éxito como cultivos adjuntos para mejorar el sabor y/o la textura y/o el gusto en el queso.

REIVINDICACIONES

1. La cepa de *Lactobacillus helveticus* DSM19501 o los mutantes de la misma que no son capaces de bajar el pH más de 1,5 unidades de pH desde el pH de partida 6,5 después de 10 horas de incubación a 37 °C cuando se inocula a partir de un cultivo durante una noche fresco a dosis de inoculación de $1,5 \times 10^7$ ufc/ml en 200 ml de leche.
- 5

FIG. 1

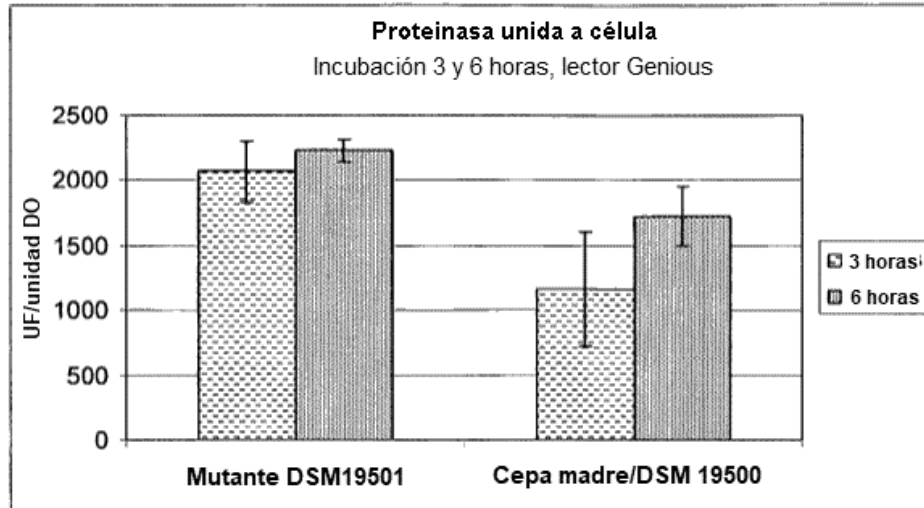


FIG. 2

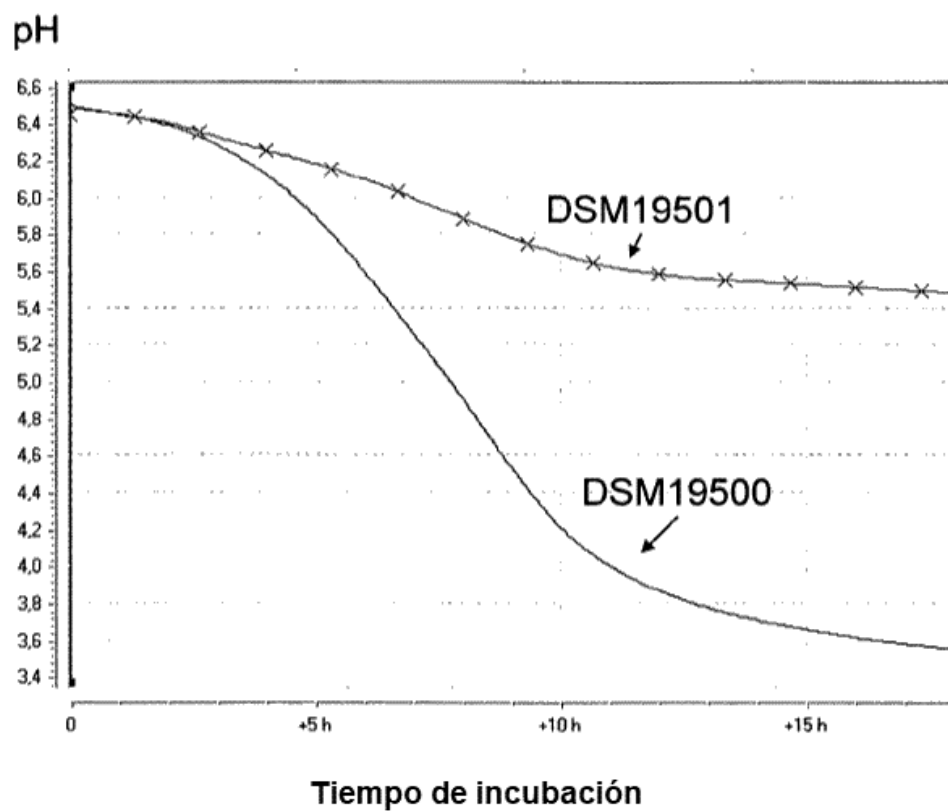


FIG. 3

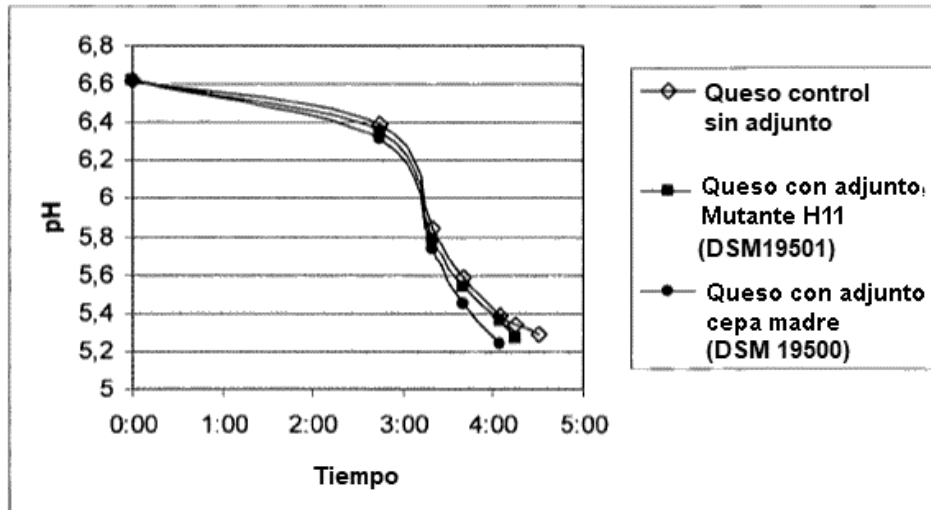


FIG. 4

