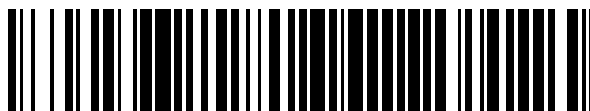


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 907**

51 Int. Cl.:

A23C 19/032 (2006.01)

A23C 19/068 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2013** **PCT/EP2013/001982**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014** **WO14005718**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2013** **E 13736776 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019** **EP 2869709**

54 Título: **Método para preparar quesos con aroma mejorado**

30 Prioridad:

06.07.2012 EP 12305813

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

26.06.2019

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)

Langebrogade 1
1411 Copenhagen K, DK

72 Inventor/es:

MANOURY, ELISE y
LAFFITTE, VÉRONIQUE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 717 907 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para preparar quesos con aroma mejorado

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona un método para preparar productos de leche fermentados, especialmente quesos tales como quesos madurados por láminas, con aroma mejorado.

10 Antecedentes de la invención

Los quesos se pueden clasificar, entre otros criterios, por el tipo de etapa de maduración a la que se han sometido. Uno puede distinguir por un lado quesos madurados por extensión (o quesos manchados), y por otro lado quesos madurados por láminas.

15 Los quesos madurados por extensión son quesos que generalmente tienen una corteza que comprende microorganismos involucrados en la maduración del queso, especialmente para el sabor del queso, mientras que los quesos madurados por láminas no tienen ninguna corteza (ningún o un crecimiento limitado de microorganismos en su superficie). Hoy en día, el segmento de quesos madurados por láminas aumenta significativamente ya que presenta muchas ventajas en comparación con los quesos madurados por extensión, tanto para los productores de queso como para los consumidores finales. De hecho, la tecnología sin corteza para los productores permite la reducción de costes debido a la tecnología por extensión que requiere mucha mano de obra. También presenta la ventaja de aumentar el rendimiento al perder menos agua a lo largo de la maduración envuelta y evitar riesgos de estropear el queso durante las manipulaciones de maduración y también a lo largo de toda la vida útil del queso. Las etapas de maduración se dominan mejor con la tecnología sin corteza, lo que permite a los productores obtener una mejor estandarización y reproducibilidad de sus producciones de queso. Para los consumidores, el aspecto del queso es más atractivo y conveniente (menos pegajoso, más fácil de manejar). Esta ventaja se abre incluso a un mercado mundial en el que ya no se quiere la corteza del queso. Pero los consumidores todavía quieren quesos con aromas típicos.

30 Es bien sabido que esta tecnología actual de queso madurado por láminas sufre profundamente por la falta de sabores, como el aroma de azufre. Usualmente, la producción de compuestos de azufre en quesos madurados por extensión se produce principalmente a través del desarrollo de *brevibacteria* en la superficie del queso. Sin embargo, debido a sus estrictas condiciones de crecimiento aeróbico, es difícil utilizar *brevibacteria* para producir sabores en el cuerpo del queso.

35 Por lo tanto, existe una necesidad no satisfecha en la técnica de métodos para obtener queso, en particular queso madurado por láminas, que tenga un aroma satisfactorio.

Sumario de la invención

40 Los inventores han descubierto que las cepas que pertenecen a la especie *Lactobacillus sakei*, cuando se inoculan en la leche, pueden producir compuestos volátiles de azufre durante la etapa o etapas de fermentación y/o maduración de un proceso para producir un producto lácteo fermentado y, por lo tanto, desarrollar aroma de azufre, preferiblemente aroma sulfuroso a huevo en el producto lácteo fermentado resultante.

45 La invención se relaciona con el uso de al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* para desarrollar aroma de azufre, preferiblemente aroma sulfuroso a huevo, en quesos duros o semiduros, en donde dicha al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* se inocula en leche en combinación con al menos una cepa de la bacteria acidificante de ácido láctico.

50 La invención también se relaciona con un método para fabricar un queso duro o semiduro que tiene un aroma de azufre, preferiblemente aroma sulfuroso a huevo, que comprende la etapa de inocular leche con al menos una cepa de *Lactobacillus sakei*, en combinación con al menos una cepa de bacteria acidificante de ácido láctico, en donde dicha al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* se inocula como concentrados secos, liofilizados o congelados secos.

55 La invención también se relaciona con un queso duro o semiduro como se define en las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

60 La presente solicitud divulga el uso de al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* para producir compuestos volátiles de azufre en productos lácteos fermentados.

65 Como se usa aquí, la expresión "compuestos de azufre volátiles" se refiere a cualquier compuesto responsable de un aroma de azufre como los tioles (por ejemplo, sulfuro de hidrógeno, metanotiol, etc.), sulfuros (por ejemplo, dimetilsulfuro, dimetildisulfuro, dimetiltrisulfuro, dimetilquadsulfuro, etc.), tioéter (por ejemplo, 2,4-ditiapentano, 3,4-ditiahexano, 2,4,5-tritiahexano, 3(metil)2,4-ditiapentano, etc.), S-metiltioésteres (por ejemplo, s-metiltioacetato, s-

metiltiopropionato, s-metiltiobutirato, s-metiltioisobutirato, s-metiltioisovalerato, s-metilhexanoato, etc.) y aldehídos (por ejemplo, metional, metiltioacetaldehído, etc.).

En una realización particular, la presente solicitud divulga el uso de al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* para producir sulfuro de hidrógeno en productos de leche fermentados, preferiblemente en quesos. En una realización particular, la concentración de sulfuro de hidrógeno producida en productos de leche fermentados, en donde al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* se usa de acuerdo con las diferentes realizaciones de la invención, aumenta de un factor de al menos 3, de al menos 4, de al menos 5, de al menos 6, de al menos 7, de al menos 8, de al menos 9, de al menos 10 o de al menos 15, en comparación con productos fermentados similares obtenidos en las mismas condiciones en la ausencia de *Lactobacillus sakei*. En una realización particular, la concentración de sulfuro de hidrógeno se determina, como se describe en los ejemplos, al menos 2 semanas después de que la leche se haya inoculado con al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* de acuerdo con las diferentes realizaciones de la invención, bajo condiciones que permitan fermentación y maduración.

La invención se relaciona con el uso de al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* para desarrollar aroma de azufre, preferiblemente aroma sulfuroso a huevo, en quesos duros o semiduros, en donde dicha al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* se inocula en leche en combinación con al menos una cepa de la bacteria acidificante de ácido láctico.

El aroma sulfuroso a huevo se puede cuantificar mediante una prueba de evaluación sensorial, mediante un panel de evaluadores bien entrenados, utilizando una escala de siete puntos (de 0, es decir, nivel de no percepción del aroma a 6, es decir, nivel de percepción muy alta del aroma a azufre).

Típicamente, el uso de al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* permite el desarrollo de aroma de azufre con una puntuación de al menos 1,1, preferiblemente al menos 1,5, incluso más preferiblemente al menos 2, incluso más preferiblemente al menos 2,5, incluso más preferiblemente al menos 3 cuando se mide en una escala de siete puntos, en productos de leche fermentados.

Típicamente, el uso de al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* de acuerdo con la invención permite aumentar la puntuación de aroma sulfuroso a huevo en al menos 3 puntos, cuando se mide en una escala de siete puntos, en productos de leche fermentada en comparación con productos de leche fermentada similares obtenidos en la ausencia de *Lactobacillus sakei*.

La solicitud también describe un método para producir compuestos volátiles de azufre en productos de leche fermentados, que comprende la etapa de inocular leche con al menos una cepa de *Lactobacillus sakei*.

La invención también se relaciona con un método para fabricar un queso duro o semiduro que tiene un aroma de azufre, preferiblemente un aroma sulfuroso a huevo, que comprende la etapa de inocular leche con al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* en combinación con al menos una cepa de bacteria acidificante de ácido láctico, en donde dicha al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* se inocula como concentrados secos, liofilizados o congelados secos.

Lactobacillus sakei es una bacteria microaerófila Gram positiva que se encuentra comúnmente en la carne y pescado frescos. Esta bacteria es valiosa en la fermentación de productos cárnicos y exhibe propiedades que permiten una mejor conservación y almacenamiento de carnes y pescados frescos. Es la bacteria predominante utilizada para la fermentación de la carne, especialmente en Europa como agentes de acidificación y/o conservación. Ahora se ha encontrado sorprendentemente que *Lactobacillus sakei* es capaz de adaptarse y crecer en la leche, un medio que es totalmente diferente de la carne o el pescado. Las bacterias se pueden utilizar principalmente como agente de aromatización, especialmente para desarrollar el aroma de azufre de los productos lácteos fermentados, como los quesos.

La cepa de *Lactobacillus sakei* de acuerdo con la invención puede ser cualquier cepa de *Lactobacillus sakei*.

En una realización, la cepa de *Lactobacillus sakei* se selecciona del grupo que consiste en:

-cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la CNCM por Danisco France SAS el 25 de abril de 2007 con el número CNCM 1-3750;

-cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la CNCM por Rhodia Food SAS el 23 de mayo de 2000 con el número CNCM 1-2479;

y mezclas de estos.

Preferiblemente, la cepa de *Lactobacillus sakei* es *Lactobacillus sakei* depositada en el CNCM por Danisco France SAS el 25 de abril de 2007 con el número CNCM 1-3750. Típicamente, la cepa de *Lactobacillus sakei* se agrega a una rata de 10^5 a 10^{12} CFU (o unidades formadoras de colonias) por litro de leche, preferiblemente de 10^5 a 10^{11} CFU por

litro de leche, preferiblemente de 10^6 a 10^{10} CFU por litro de leche, preferiblemente de 10^7 a 10^9 CFU por litro de leche, preferiblemente aproximadamente 10^8 o 10^9 CFU por litro de leche.

La cepa de *Lactobacillus sakei* se puede usar sola o en combinación con otros microorganismos.

Cuando se utilizan en combinación, dichos otros microorganismos se seleccionan típicamente de bacterias, hongos, mohos, levaduras, arqueas, protistas o cualquier mezcla de estos.

En una realización, dichos hongos/mohos se seleccionan de *Penicillium* spp, *Geotrichum* spp, *Lecanicillium* spp y *Trichothecium* spp.

En una realización, dichas levaduras se seleccionan de *Kluyveromyces* spp, *Debaryomyces* spp, *Yarrowia* spp, *Pichia* spp, *Williopsis* spp y *Saccharomyces* spp.

En una realización preferida, dichos microorganismos son bacterias de cualquier género o especie. Las bacterias preferidas de acuerdo con la invención son bacterias de ácido láctico, bacilos, estafilococos tales como *Staphylococcus vitulinus*, y bacterias corineformes tales como, por ejemplo, *Arthrobacter* spp, *Corynebacterium* spp, *Brevibacterium* spp tales como *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens* y/o *Brevibacterium aurantiacum*.

En una realización particular de la invención, la cepa de *Lactobacillus sakei* se usa en combinación con una cepa de estafilococo tal como *Staphylococcus vitulinus* y/o con una cepa de brevibacteria tal como *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens* o/y *Brevibacterium aurantiacum*.

En una realización particular, la cepa de *Lactobacillus sakei* se usa en combinación con al menos una cepa de *Staphylococcus vitulinus*, preferiblemente la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada en la CNCM por Danisco France SAS el 25 de abril de 2007 con el número CNCM 1-3751. Ventajosamente, el aroma de azufre desarrollado por estas combinaciones es incluso mayor que el aroma de azufre desarrollado por la cepa de *Lactobacillus sakei* sola. Típicamente, la cepa de *Staphylococcus vitulinus* se agrega a una rata de 10^5 a 10^{12} CFU (o unidades formadoras de colonias) por litro de leche, preferiblemente de 10^5 a 10^{11} CFU por litro de leche, preferiblemente de 10^6 a 10^{10} CFU por litro de leche, preferiblemente de 10^7 a 10^9 CFU por litro de leche, preferiblemente aproximadamente 10^8 o 10^9 CFU por litro de leche.

Por lo tanto, la invención también se relaciona con una composición bacteriana que comprende al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* y al menos una otra cepa seleccionada del grupo que consiste en:

-una cepa de *Staphylococcus*, tal como una cepa de *Staphylococcus vitulinus*, preferiblemente la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada en la CNCM por Danisco France SAS el 25 de abril de 2007 con el número CNCM 1-3751,

-una cepa de *Brevibacterium*, tal como una cepa de *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens* o *Brevibacterium aurantiacum*.

En una realización particular, la cepa de *Lactobacillus sakei* se usa en combinación con al menos una bacteria del ácido láctico (LAB). En una realización particular, la cepa de *Lactobacillus sakei*, sola o en combinación con al menos una cepa de estafilococo y/o al menos una cepa de brevibacteria como se describe aquí, se usa en combinación con al menos una bacteria de ácido láctico (LAB). De acuerdo con la invención, el término "bacterias del ácido láctico" incluye cualquier bacteria capaz de producir, como principal producto final metabólico de la fermentación de carbohidratos, ácido láctico o al menos uno de sus derivados (incluido, pero sin limitarse a, ácido propiónico). Por lo tanto, el término pretende incluir bacterias de ácido propiónico (PAB), que producen ácido propiónico como producto de fermentación de carbohidratos. Preferiblemente, las bacterias en la presente invención son bacterias de ácido láctico que generalmente son reconocidas como seguras para el consumo humano o animal (por ejemplo, bacterias que están aprobadas por GRAS, bacterias que están incluidas en la lista más actualizada de microorganismos QPS, etc.).

Las bacterias de ácido láctico adecuadas pueden seleccionarse del género *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y mezclas de estos. Típicamente, los microorganismos son probióticos o DFM (microorganismo de alimentación directa). De acuerdo con la invención, "probióticos" o "DFMs" significa microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud al huésped, el huésped siendo un ser humano en el caso de los probióticos y un animal en el caso de los DFMs.

Estas LAB pueden seleccionarse del grupo que comprende las siguientes especies y sus subespecies *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (por ejemplo, *Bifidobacterium animalis lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* (por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*), *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus*

acidilactici, *Pediococcus parvulus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium jensenii* y *Streptococcus salivarius* (por ejemplo, *Streptococcus salivarius thermophilus*).

5 Dentro de la invención, la cepa de *Lactobacillus sakei* se usa en combinación con al menos una bacteria acidificante de ácido láctico. En una realización particular de la invención, la cepa de *Lactobacillus sakei*, sola o en combinación con al menos una cepa de *Staphylococcus* y/o al menos una cepa de *Brevibacterium* como se describe aquí, se usa en combinación con al menos una bacteria acidificante de ácido láctico.

10 Sin querer limitarse a ninguna teoría, los inventores creen que, durante la fermentación de la leche, existe una simbiosis entre las bacterias acidificantes del ácido láctico presentes en el cultivo iniciador (cuya función es principalmente disminuir el pH y/o modificar la matriz proteica de la leche) y el *Lactobacillus sakei* (cuya función es principalmente aumentar el desarrollo del aroma de azufre).

15 Como se usa aquí, la expresión "bacterias acidificantes de ácido láctico" tiene su significado general en la técnica. Las propiedades acidificantes de las bacterias del ácido láctico se pueden describir por la tasa de acidificación, utilizando el siguiente descriptor calculado por CINAC: Pendiente entre pH 6 y pH 5 (unidad pH/min (pHu/min)). En las condiciones de prueba, la fermentación se realiza en 100 ml de leche UHT semidesnatada (Le Petit Vendéen®) inoculada con las bacterias del ácido láctico que se analizarán a una tasa de 5 a 10 g/100 l, luego se incuban a 32 °C (en un baño de agua). El pH se controla continuamente utilizando un aparato CINAC. Bajo estas condiciones operativas, se estima que esta variable es característica de las bacterias de ácido láctico en lugar de la tasa de inoculación. Se pueden distinguir varios grupos de bacterias de ácido láctico:

25 -las bacterias de ácido láctico con la llamada acidificación lenta, la pendiente pH6-pH5 de las cuales es al menos 0,0010 pHu/min,

-las bacterias del ácido láctico con la llamada acidificación intermedia, la pendiente pH6-pH5 de las cuales está entre 0,0050 y 0,0075 pHu/min,

30 -y las bacterias de ácido láctico con la llamada acidificación rápida, la pendiente pH6-pH5 de las cuales es mayor que 0,0075 pHu/min.

El término "bacterias acidificantes de ácido láctico" abarca las bacterias de ácido láctico de los 3 grupos mencionados anteriormente (es decir, bacterias de acidificación de ácido láctico lenta, intermedia y/o rápida). La persona experimentada podrá elegir las bacterias acidificantes de ácido láctico deseadas según la tecnología.

35 En una realización particular, la cepa de *Lactobacillus sakei* se usa en combinación con al menos una bacteria acidificante de ácido láctico que pertenece al género *Lactobacillus*. Algunos ejemplos particulares son cepas de *Lactobacillus acidophilus* tales como *Lactobacillus acidophilus* depositada en el CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15), por Danisco France SAS el 3 de julio de 2007 con el número CNCM 1-3784, o cepas de *Lactobacillus paracasei*.

En una realización particular, la cepa de *Lactobacillus sakei* se usa en combinación con al menos una bacteria acidificante de ácido láctico que pertenece al género *Lactococcus*.

45 En una realización particular, la cepa de *Lactobacillus sakei* se usa en combinación con al menos una bacteria acidificante de ácido láctico perteneciente a la especie *Lactococcus lactis*, preferiblemente *Lactococcus lactis* subsp *lactis* y/o *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*.

50 En una realización particular, la cepa de *Lactobacillus sakei* se usa en combinación con al menos un cultivo iniciador. La persona experimentada en la técnica puede seleccionar fácilmente el cultivo iniciador de queso apropiado, dependiendo del tipo de producto de leche fermentado que se produzca.

De hecho, hay diferentes tipos de cultivos de queso iniciadores disponibles. Hay dos tipos básicos de cultivos iniciadores.

55 Los iniciadores mesofílicos funcionan a temperaturas moderadas y se utilizan cuando las cuajadas se calientan a una temperatura que no exceda los 39 °C. Los ejemplos clásicos de quesos hechos de tales cultivos son Cheddar y Gouda.

60 Se emplean cultivos termofílicos cuando las cuajadas se calientan a una temperatura tan alta como 52 °C. Muchos quesos suizos e italianos utilizan cultivos termofílicos, así como algunos otros tipos de quesos como el Cheddar.

En una realización preferida, el cultivo iniciador comprende bacterias de ácido láctico y preferiblemente bacterias acidificantes de ácido láctico como se definió y se detalló anteriormente.

65 En una realización preferida, el cultivo iniciador es el cultivo iniciador de queso Choozit™ Classic 111 FRO comercializado por Dupont-Danisco.

Por lo tanto, la invención también se relaciona con una composición bacteriana que comprende:

1. al menos una cepa de *Lactobacillus sakei*, como se define aquí;

5 2. al menos una otra cepa seleccionada del grupo que consiste en:

-una cepa de estafilococo, como una cepa de *Staphylococcus vitulinus*, preferiblemente la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada en la CNCM por Danisco France SAS el 25 de abril de 2007 con el número CNCM 1-3751, y

10 -una cepa de *brevibacteria*, tal como una cepa de *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens* o *Brevibacterium aurantiacum*; y

3. al menos una bacteria acidificante de ácido láctico, o un cultivo iniciador como se definió anteriormente.

15 Las bacterias utilizadas en la presente invención pueden proporcionarse en forma de una suspensión bacteriana, antes o después de la congelación, o en forma de concentrados bacterianos. Dichos concentrados bacterianos pueden estar, secos, liofilizados o congelados secos.

20 Típicamente, las bacterias utilizadas en la presente invención pueden almacenarse a temperatura ambiente, a una temperatura de aproximadamente 4 °C, aproximadamente -20 °C, aproximadamente -80 °C o aproximadamente -200 °C.

Pueden estar asociados con diversos excipientes.

25 Como se usa aquí, el término "leche" tiene su significado general en la técnica. Puede ser una leche de origen animal y/o de origen vegetal.

30 Una leche de origen animal se refiere al líquido blanco producido por las glándulas mamarias de los mamíferos. La leche de acuerdo con la presente invención puede ser leche de cualquier origen mamífero tal como leche de vaca, leche de cabra, leche de oveja, leche de camello, leche de búfalo o una combinación de estos.

Una leche de origen vegetal es cualquier sustancia fermentable de origen vegetal, por ejemplo, que proviene de semillas de soja, arroz o malta.

35 La expresión "leche" también abarca cualquier leche reconstituida y/o recombinada, por ejemplo, una leche obtenida agregando agua a la leche desnatada en polvo o a la leche entera en polvo o una leche obtenida mezclando cualquier componente de la leche.

40 Tal como se usa aquí, la expresión "productos de leche fermentados", también denominados alimentos lácteos cultivados, productos lácteos cultivados o productos de leche cultivados, son i) leche o productos a base de leche que han sido fermentados directamente con bacterias de ácido láctico como *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* o ii) productos alimenticios que se han producido con un proceso que implica una etapa de la fermentación de la leche con bacterias de ácido láctico como *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*, y que se han sometido a modificaciones adicionales, como una etapa de maduración o que se han mezclado con otros ingredientes alimentarios.

50 Algunos ejemplos de "productos de leche fermentados" son "leches fermentadas", quesos, bebidas a base de leche, yogures, yogures para beber. Preferiblemente, los "productos de leche fermentados" son "leches fermentadas" o quesos. Preferiblemente, los "productos de leche fermentados" son quesos.

55 Como se usa aquí, el término "queso" tiene su significado general en la técnica. Se refiere al producto de leche fermentado producido por coagulación de la proteína de la leche caseína. Típicamente, la leche se acidifica y la adición de la enzima de cuajo provoca la coagulación. Los sólidos se separan y se comprimen en su forma final. Algunos quesos tienen mohos en la corteza o en todas partes. La mayoría de los quesos se funden a la temperatura de cocción.

Se producen cientos de tipos de queso. Sus estilos, texturas y sabores dependen del origen de la leche (incluida la dieta del animal), de si han sido pasteurizados, del contenido de grasa de la mantequilla, del tipo de microorganismos que se utilizan, del procesamiento y de la maduración (envejecimiento).

60 Los quesos se pueden clasificar de acuerdo con su contenido de humedad (expresado en porcentaje de agua por el peso total del queso): un queso puede ser duro con un contenido de humedad inferior al 39%, semiduro con un contenido de humedad del 39% al 45% o suave con un contenido de humedad superior al 45%, preferiblemente de 45 a 55%, preferiblemente de 45 a 50%.

En una realización preferida, el queso de acuerdo con la invención no es un queso blando, es decir, tiene un nivel de humedad inferior al 45% de agua por peso, preferiblemente inferior a 40, incluso más preferiblemente inferior a 38, 35, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, o el 10% de agua por peso.

- 5 Los quesos también se pueden clasificar de acuerdo con su proceso de fabricación y, en particular, según el tipo de etapa de maduración empleado:

-Quesos madurados por extensión

- 10 Los quesos madurados por extensión son quesos de corteza lavada, lo que significa que, durante su producción, se limpian o cepillan repetidamente con una solución de bacterias u hongos (más comúnmente *Brevibacterium*, *Debaryomyces* y/o *Geotrichum*). Este proceso permite producir una corteza firme y sabrosa alrededor del queso con un sabor más fuerte a medida que el queso madura.

- 15 En algunos casos, los quesos más viejos se extienden sobre quesos jóvenes para transferir los microorganismos. Muchos de estos, pero no todos, tienen un color rosado o naranja distintivo en el exterior del queso. Sin embargo, debido a las etapas regulares de "lavado", particularmente en las primeras etapas de producción, este proceso requiere bastante mano de obra en comparación con otros métodos de producción de queso, y es más difícil de estandarizar, lo que conduce a la variabilidad en la calidad de los quesos.

- 20 -Quesos madurados por láminas

- Otros tipos de queso se maduran utilizando la tecnología de maduración por lámina. De acuerdo con este tipo de maduración, el queso se cubre con una película, como una película de lámina (por ejemplo, una lámina de plástico, una lámina de aluminio, etc.) y/o una cera, y se coloca a una temperatura de 4 °C a 25 °C, preferiblemente de 9 °C a 25
25 17 °C, preferiblemente alrededor de 12 °C, mientras madura. Este proceso de maduración da como resultado un queso sin corteza, que no tiene o tiene un crecimiento limitado de microorganismos en su superficie y, por lo tanto, tiene un sabor limitado en comparación con los quesos madurados por extensión. El método de acuerdo con esta invención, por lo tanto, permite resolver este problema.

- 30 En una realización, la invención se relaciona con un proceso para hacer un queso madurado por lámina que comprende las etapas de:

- 35 a) inocular leche con al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* y al menos una cepa de bacterias acidificantes de ácido láctico.

b) fermentar durante un período de tiempo comprendido entre 2 y 24 horas a una temperatura comprendida entre 28 °C y 55 °C

- 40 c) cubrir el producto fermentado obtenido en la etapa b) con una película de lámina

d) madurar durante un período de tiempo comprendido entre 2 semanas y 24 meses a una temperatura comprendida entre 4 °C y 25 °C.

- 45 Generalmente, un queso semiduro madurado por lámina se madura como un queso sin corteza, con el queso joven empacado en lámina después de poner en salmuera y luego se madura a una temperatura de 4-14 °C, preferiblemente de 9-11 °C.

- 50 En el caso de los quesos suizos y Emmental y otros quesos madurados por lámina dura, inicialmente se realiza una etapa de premaduración en una habitación fría que comprende una temperatura de 10 a 15 °C durante 2-4 semanas, luego en una habitación cálida que comprende una temperatura de 15 a 25 °C durante un mínimo de 2 semanas, y al final en la cámara fría que comprende una temperatura de 10 a 15 °C durante varias semanas/meses.

- 55 Cuando el queso está madurado por lámina, se pierde poca humedad durante la maduración, lo que es particularmente ventajoso económicamente. Además, no hay ninguna o hay una cantidad limitada de pérdidas de corte cuando los quesos madurados por lámina se cortan en rebanadas o barras, ya que generalmente tienen una forma rectangular.

- 60 El queso madurado por lámina se recubre, por ejemplo, con películas termoplásticas de polímeros de PE, PP, polivinilo (PV): PV-OH o PVacetato. Se pueden usar películas termoplásticas permeables o no permeables. También se puede utilizar recubrimiento con cera de grado alimenticio.

En una realización preferida, el queso de acuerdo con la invención es, por lo tanto, un queso madurado por lámina.

- 65 En otra realización, la invención se relaciona con un proceso para hacer un queso madurado por extensión que comprende las etapas de:

a) inocular leche con al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* y al menos una cepa de bacterias acidificantes de ácido láctico.

b) fermentar durante un período de tiempo comprendido entre 2 y 24 horas a una temperatura comprendida entre 28 °C y 55 °C

c) madurar durante un período de tiempo comprendido entre 2 semanas y 24 meses a una temperatura comprendida entre 4 °C y 25 °C.

La cepa de *Lactobacillus sakei* también es útil para conservar los productos lácteos fermentados contra el deterioro. De hecho, se ha demostrado que las bacterias pertenecientes a la especie *Lactobacillus sakei* producen bacteriocinas, que ayudan a inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables, como la *Listeria monocytogenes*.

En otro aspecto, la solicitud divulga un producto de leche fermentado, preferiblemente un queso, preferiblemente un queso duro o semiduro, preferiblemente un queso semiduro, incluso más preferiblemente un queso semiduro, madurado con lámina obtenible por el método como se describe anteriormente.

La solicitud también divulga un producto lácteo fermentado, preferiblemente un queso, preferiblemente un queso duro o semiduro, preferiblemente un queso semiduro, incluso más preferiblemente un queso semiduro, madurado por lámina, que comprende al menos una cepa de *Lactobacillus sakei*.

Ejemplos de quesos duros o semiduros de acuerdo con la invención son quesos semiduros Tilsit, Danbo, Hohlenkase, Raclette, Munster, Tomme, Tommette, Ossau-Iraty, Manchego, Gouda, Edam y quesos duros Cheddar, Cantal, Cheshire, Emmental, Gruyère, Beaufort, Parmesano, Romano.

La invención se relaciona con un queso duro o semiduro, incluso más preferiblemente un queso semiduro, incluso más preferiblemente un queso semiduro madurado por lámina, que comprende al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* que se selecciona del grupo que consiste en:

-cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la CNCM por Danisco France SAS el 25 de abril de 2007 con el número CNCM 1-3750;

-cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la CNCM por Rhodia Food SAS el 23 de mayo de 2000 con el número CNCM 1-2479;

y mezclas de estos.

Preferiblemente, *Lactobacillus sakei* es una cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la CNCM por Danisco France SAS el 25 de abril de 2007 con el número CNCM 1-3750.

En una realización preferida, dicho queso duro o semiduro se selecciona del grupo que consiste en quesos semiduros de Tilsit, Danbo, Hohlenkase, Raclette, Munster, Tomme, Ossau-Iraty, Manchego, Gouda, Edam y quesos duros Cheddar, Cantal, Cheshire, Emmental, Gruyère, Beaufort, Parmesano, Romano.

En una realización particular de un queso como se describe aquí (como se obtiene por el método de la invención o descrito como tal), un queso comprende o se obtiene usando, al menos, una cepa de *Lactobacillus sakei* y al menos una cepa de estafilococo, como *Staphylococcus vitulinus* y/o una cepa de brevibacteria como *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens* o/y *Brevibacterium aurantiacum*. En una realización particular, un queso comprende o se obtiene usando, al menos, una cepa de *Lactobacillus sakei*, al menos una cepa de estafilococo como *Staphylococcus vitulinus* y/o una cepa de brevibacteria como *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens* o/y *Brevibacterium aurantiacum* y al menos un LAB, preferiblemente al menos una bacteria acidificante de ácido láctico, como se describe aquí.

Es de destacar que de acuerdo con las enseñanzas de la invención, dicha cepa de *Lactobacillus sakei*, y si está presente, dicha al menos una cepa de estafilococo y/o dicha al menos una cepa de brevibacteria se inoculan en la leche, antes de la fermentación y maduración, de manera que esta o estas cepas se encuentran al menos dentro del cuerpo o el núcleo del queso o exclusivamente dentro del cuerpo o núcleo del queso, o en otras palabras, esta o estas cepas no se encuentran en la superficie del queso o no se encuentra solo en la superficie del queso. En particular, esto significa que, para los quesos madurados por expansión, esta o estas cepas se encuentran al menos dentro del cuerpo o núcleo del queso madurado por expansión, o exclusivamente dentro del cuerpo o núcleo del queso madurado por expansión, en otras palabras, esta o estas cepas no se encuentran en la corteza de este queso o no solo en la corteza de este queso.

Otras características y ventajas de la invención surgirán al leer los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

1.1 introducción

- 5 Doce combinaciones de cepas se probaron en asociación con Choozit™ Classic 111 FRO (200g de quesos tipo Gouda en modelo "VIP" cuba en paralelo. El sistema VIP es un equipo para la fabricación de queso. Permite ejecutar 12 cubas de leche simultáneamente y para probar 12 combinaciones (o mezclas) de cepas al mismo tiempo. El VIP se ha adaptado especialmente a la tecnología de Gouda. Con el VIP se obtienen resultados del proceso exactos, reproducibles y medibles. Esos quesos y dos quesos estándar con solo Choozit™ Classic 111 FRO se maduraron en
- 10 condiciones laminadas a 12 °C durante 6 semanas.

Choozit™ Classic 111 FRO es un cultivo iniciador que comprende bacterias acidificantes de ácido láctico. Comprende una mezcla de varias cepas de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*.

- 15 Para evaluar el potencial aromático de cada combinación en los quesos del modelo VIP, se realizó un análisis sensorial mediante un análisis cuantitativo descriptivo.

1.2. Condiciones experimentales

20 1.2.1. Composición de las cubas

Se utilizó Choozit™ Classic 111 FRO para inocular las doce cubas de quesos, a 7 DCU por 100L. Se produjeron dos quesos de control con solo Choozit™ Classic 111 FRO: cuba 1 y cuba 2.

- 25 Se estudiaron dos cepas de *Lactobacillus sakei* industriales y depositadas (CNCM 1-3750 y CNCM I-2479) solas a una rata de inoculación de 1,10E6 cfu/ml (cuba 3 y cuba 4 respectivamente) o en combinación (cuba 8). También se estudiaron en asociación con una cepa de *Brevibacterium casei* (cuba 6 y cuba 7 respectivamente). Este *Brevibacterium casei* también se probó solo en la cuba 5.

- 30 La cuba 10 se inoculó con una mezcla de una cepa de *Staphylococcus vitulinus* (*Staphylococcus vitulinus* CNCM I-3751), una cepa de *Lactobacillus paracasei*, una cepa de *Lactobacillus acidophilus* (*Lactobacillus acidophilus* CNCM 1-3784) y *Lactobacillus sakei* CNCM I-3750.

- 35 La cuba 11 se inoculó con una mezcla de una cepa de *Staphylococcus vitulinus* (*Staphylococcus vitulinus* CNCM 1-3751) y *Lactobacillus sakei* CNCM 1-3750. Finalmente, en la cuba 12, se agregó una mezcla de una cepa de *Lactobacillus paracasei* y una cepa de *Lactobacillus acidophilus* (*Lactobacillus acidophilus* CNCM I-3784).

1.2.2. Producción de queso y condiciones de maduración.

- 40 Los quesos Gouda fueron producidos utilizando el equipo VIP. Este último permite hacer doce quesos de 200 g usando cubas de 2 litros colocadas en paralelo.

Las mezclas se probaron en asociación con un cultivo acidificante, Choozit™ Classic 111 FRO.

- 45 Se agregó Choozit™ Classic 111 FRO a la leche de producción a una rata de inoculación nominal; y las mezclas se inocularon de acuerdo con el objetivo de la formulación (con productos semiacabados). Se fabricaron dos quesos de control sin mezcla añadida. Después de la fabricación, los quesos se envolvieron en láminas y se mantuvieron a + 12 °C durante 6 semanas.

- 50 Las combinaciones de cepas utilizadas para inocular las cubas de queso se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Combinaciones de cepas utilizadas para inocular las cubas de queso

Especies	cfu/mL											
	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Cuba 4	Cuba 5	Cuba 6	Cuba 7	Cuba 8	Cuba 9	Cuba 10	Cuba 11	Cuba 12
<i>Staphylococcus vitulinus</i> CNCM I-3751										1E+06	1E+06	
<i>Lactobacillus paracasei</i>										1E+06		1E+06
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CNCM I-3784										1E+06		1E+06
<i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-3750			1E+06			1E+06		1E+06	1E+06	1E+06	1E+06	
<i>Brevibacterium casei</i>					1E+06	1E+06	1E+06		1E+06			
<i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-2479				1E+06			1E+06	1E+06	1E+06			
Choozit™ Classic 111 FRO a 7 DCU por 100L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

1.3. método de análisis sensorial

La sesión de cata se organizó con 10 asesores bien entrenados.

- 5 Evaluaron la intensidad de 23 descriptores de apariencia, textura y sabor utilizando una escala de siete puntos. Las muestras fueron homogéneas (la misma cantidad, la misma presentación) y se codificaron con números de 3 dígitos seleccionados al azar. El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), que permite la evaluación de diferencias significativas (con $\alpha=5\%$) entre los productos para cada descriptor.

10 1.4. resultados

Se ha verificado que los dos perfiles organolépticos de los quesos estándar de la cuba 1 y cuba 2 son similares, sin diferencias significativas (de ANOVA) para todos los 23 descriptores.

- 15 La principal diferencia significativa entre todos los quesos VIP fue observable para la nota de huevo sulfuroso, como se describe en la Tabla 2 a continuación.

La última columna de la Tabla representa los grupos (A, AB, ABC, BC y C) que se identificaron mediante la prueba de comparación de medias ANOVA de una vía de Newman-Keuls. Esta prueba estadística permite clasificar productos con características similares (es decir, sin diferencias significativas). El grupo C está compuesto por VI, V2, V5 y V12 y es el grupo que presenta las puntuaciones más bajas de aroma sulfuroso a huevo. Este grupo contiene quesos VIP de control y quesos sin la cepa de *Lactobacillus sakei*. Los grupos A y AB son los que tienen el aroma sulfuroso a huevo más intenso. Esos grupos incluyen quesos inoculados con la cepa *Lactobacillus sakei* CNCM I-3750 solo o en asociación. Finalmente, los grupos ABC y BC son grupos intermedios, que contienen la cepa de *Lactobacillus sakei* CNCM 1-2479.

Se muestra claramente que la especie *Lactobacillus sakei* desempeña un papel importante en el desarrollo del aroma sulfuroso, en particular el aroma sulfuroso a huevo. También se puede observar cierta variación en la intensidad entre las dos cepas de *Lactobacillus sakei*. La cepa de *Lactobacillus sakei* CNCM 1-3750 tiende a producir más aroma sulfuroso a huevo que la *Lactobacillus sakei* CNCM 1-2479

Tabla 2: Aroma sulfuroso a huevo desarrollado por diferentes mezclas de cepas

Número de cuba	Combinación de cepa	Aroma sulfuroso a huevo (media de 10 asesores)	Grupos ANOVA
Cuba 5	<i>Brevibacterium casei</i>	0,4	C
Cuba 2	control	0,5	C
Cuba 1	control	0,5	C
Cuba 12	<i>Lactobacillus paracasei</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i> CNCM I-3784	0,6	C
Cuba 7	<i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-2479+ <i>Brevibacterium casei</i>	1,1	BC
Cuba 4	<i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-2479	1,9	ABC
Cuba 8	<i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-3750+ <i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-2479	2,3	AB
Cuba 6	<i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-3750+ <i>Brevibacterium casei</i>	2,6	A
Cuba 9	<i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-3750+ <i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-2479+ <i>Brevibacterium casei</i>	2,6	A
Cuba 10	<i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-3750+ <i>Staphylococcus vitulinus</i> CNCM I-3751 + <i>Lactobacillus paracasei</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i> CNCM I-3784	2,7	A
Cuba 3	<i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-3750	3,0	A
Cuba 11	<i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-3750+ <i>Staphylococcus vitulinus</i> CNCM I-3751	3,2	A

Ejemplo 2

2.1. Composición de los quesos

- 5 Dos quesos Gouda fueron producidos utilizando el equipo VIP.

Choozit™ Classic 111 FRO se utilizó para inocular las dos cubas VIP de quesos, a 7 DCU por 100L. Los quesos de control que solo contienen Choozit™ Classic 111 FRO se produjeron en la cuba 21.

- 10 Las cepas depositadas de *Lactobacillus sakei* CNCM 1-3750 y *Staphylococcus vitulinus* CNCM I-2479 se estudiaron a una rata de inoculación de 1,10E6 cfu/ml en combinación en la cuba 22.

Después de la fabricación, ambos quesos se envolvieron en láminas y se mantuvieron 2 semanas a +12 °C, luego 2 semanas a +9 °C y finalmente 3 semanas a +12 °C (un total de 7 semanas).

- 15 2.2. método de análisis sensorial

La sesión de cata se organizó con 12 asesores bien entrenados.

- 20 Evaluaron la intensidad de 23 descriptores de apariencia, textura y sabor utilizando una escala de siete puntos. Las muestras fueron homogéneas (la misma cantidad, la misma presentación) y se codificaron con números de 3 dígitos seleccionados al azar. El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), que permite la evaluación de diferencias significativas (con $\alpha=5\%$) entre los productos para cada descriptor.

- 25 2.3. método de análisis de cromatografía

Los compuestos volátiles de azufre, por ejemplo, sulfuro de hidrógeno, metanotiol y sulfuro de dimetilo se determinaron mediante una cromatografía de gases acoplada con un detector de espectrómetro de masas.

- 30 La técnica SPME (microextracción en fase sólida) se utilizó para extraer los compuestos de azufre de los quesos. Los compuestos volátiles se inyectaron luego en la cromatografía de gases, se separaron en una columna capilar y se detectaron mediante el espectrómetro de masas. El método fue calibrado para cada uno de los tres compuestos.

2.4. resultados

- 35 Una diferencia significativa entre los dos quesos VIP fue observable para la nota sulfuroso a huevo. Por lo tanto, la cuba 22 tenía significativamente más aroma sulfuroso a huevo que la cuba 21 de control.

Número de cuba	Combinación de cepa	Aroma sulfuroso a huevo (media de 12 asesores)	Grupos ANOVA
Cuba 21	Control	0,75	B
Cuba 22	<i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-3750+ <i>Staphylococcus vitulinus</i> CNCM I-3751	1,92	A

- 40 La cuba 22 también tenía cuantitativamente más compuestos volátiles de azufre que la cuba 21 de control: el contenido de sulfuro de hidrógeno fue mayor en la cuba 22 (aumento de 16,9 veces), en comparación con el metanotiol y el sulfuro de dimetilo, en comparación con la cuba 21.

Número de cuba	Combinación de cepa	sulfuro de hidrógeno (µg/kg)	metanotiol (µg/kg)	Dimetilsulfuro (µg/kg)
Cuba 21	Control	6,3	5,7	3,7
Cuba 22	<i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-3750 + <i>Staphylococcus vitulinus</i> CNCM I-3751	107,0	8,3	6,7

- 45 Ejemplo 3

3.1. composición de los quesos

Se produjeron dos quesos, semiduros, tipo Tilsit.

Un queso de control llamado 31 se produjo con un iniciador acidificante mesofílico (diferente del Choozit™ Classic 111 FRO). Se produjo un queso de prueba llamado 32 con el mismo iniciador acidificante agregado con ambas cepas depositadas de *Lactobacillus sakei* CNCM 1-3750 y *Staphylococcus vitulinus* CNCM 1-2479 (cada una a una rata de inoculación de 5,10E6 cfu/ml). Después de la fabricación, ambos quesos se envolvieron en láminas y se mantuvieron 3 meses a +12 °C.

3.2. método de análisis sensorial

La sesión de cata se organizó con 14 asesores bien entrenados.

Evaluaron la intensidad de 23 descriptores de apariencia, textura y sabor utilizando una escala de siete puntos. Las muestras fueron homogéneas (la misma cantidad, la misma presentación) y se codificaron con números de 3 dígitos seleccionados al azar. El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), que permite la evaluación de diferencias significativas (con $\alpha=5\%$) entre los productos para cada descriptor.

3.3. método de análisis de cromatografía

Los compuestos volátiles de azufre, por ejemplo, sulfuro de hidrógeno, metanotiol y sulfuro de dimetilo se determinaron mediante una cromatografía de gases acoplada con un detector de espectrómetro de masas.

La técnica SPME (microextracción en fase sólida) se utilizó para extraer los compuestos de azufre de los quesos. Los compuestos volátiles se inyectaron luego en la cromatografía de gases, se separaron en una columna capilar y se detectaron mediante el espectrómetro de masas. El método fue calibrado para cada uno de los tres compuestos.

3.4. resultados

Una diferencia significativa entre los dos quesos tipo Tilsit fue observable para la nota sulfurosa a huevo. El queso control 31 tenía significativamente menos aroma sulfuroso a huevo que el queso de prueba 32 con la combinación de cepas.

Nombres de productos	Combinación de cepa	Aroma sulfuroso a huevo (media de 14 asesores)	Grupos ANOVA
Queso control 31	Control	0,76	B
Queso prueba 32	<i>Lactobacillus sakei</i> CNCMI-3750 + <i>Staphylococcus vitulinus</i> CNCM I-3751	2,32	A

El queso de prueba 32 tenía cuantitativamente más compuestos volátiles de azufre que el queso de control 31. El contenido de sulfuro de hidrógeno fue más alto en el queso de prueba 32 (aumento de 3,9 veces), al igual que para el metanotiol y el sulfuro de dimetilo, en comparación con el queso 31.

Número de cuba	Combinación de cepa	sulfuro de hidrógeno (µg/kg)	metanotiol (µg/kg)	Dimetilsulfuro (µg/kg)
Queso control 31	Control	75,5	6,2	2,8
Queso prueba 32	<i>Lactobacillus sakei</i> CNCM I-3750 + <i>Staphylococcus vitulinus</i> CNCM I-3751	300,0	10,0	3,5

Ejemplo 4

4.1. composición de los quesos

Se producen dos quesos tipo Cheddar duros. Un queso de control llamado 41 se produce con una combinación de iniciador mesofílico y un iniciador termofílico. Se produce un queso de prueba llamado 42 con el mismo iniciador acidificante agregado con las cepas depositadas de *Lactobacillus sakei* CNCM 1-3750 y *Staphylococcus vitulinus* CNCM 1-2479 (cada una a una rata de inoculación de 5,10E6 cfu/ml). Después de la fabricación, ambos quesos se envuelven en lámina y se mantienen 3 meses a +12 °C.

4.2. método de análisis sensorial

La sesión de cata se organiza con asesores bien entrenados. Evalúan la intensidad de 20 descriptores para la evaluación sensorial, textura y sabor del queso Cheddar, utilizando una escala de siete puntos. Las muestras son homogéneas (la misma cantidad, la misma presentación) y se codifican con números de 3 dígitos seleccionados al azar. El tratamiento estadístico de los datos se realiza mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), que permite la evaluación de diferencias significativas (con $\alpha=5\%$) entre los productos para cada descriptor.

4.3. método de análisis de cromatografía

Los compuestos volátiles de azufre, por ejemplo, el sulfuro de hidrógeno, el metanotiol y el sulfuro de dimetilo se determinan mediante una cromatografía de gases acoplada con un detector de espectrómetro de masas. La técnica SPME (microextracción en fase sólida) se utiliza para extraer los compuestos de azufre de los quesos. Los compuestos volátiles se inyectan luego en la cromatografía de gases, se separan en una columna capilar y se detectan mediante el espectrómetro de masas. El método se calibra para cada uno de los tres compuestos.

Ejemplo 5

5.1. composición de los quesos

Se producen dos quesos Munster (madurados por extensión). Un queso de control llamado 51 se produce con un iniciador acidificante mesofílico. Se produce un queso de prueba llamado 52 con el mismo iniciador acidificante agregado con las cepas depositadas de *Lactobacillus sakei* CNCM 1-3750 y *Staphylococcus vitulinus* CNCM 1-2479 (cada una a una rata de inoculación de $5,10E6$ cfu/ml). Después de la fabricación, ambos quesos se mantienen 2 semanas a un mínimo de $+12^\circ\text{C}$.

5.2. método de análisis sensorial

La sesión de cata se organiza con asesores bien entrenados. Evalúan la intensidad de 23 descriptores de apariencia, textura y sabor utilizando una escala de siete puntos. Las muestras son homogéneas (la misma cantidad, la misma presentación) y se codifican con números de 3 dígitos seleccionados al azar. El tratamiento estadístico de los datos se realiza mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), que permite la evaluación de diferencias significativas (con $\alpha=5\%$) entre los productos para cada descriptor.

5.3. método de análisis de cromatografía

Los compuestos volátiles de azufre, por ejemplo, sulfuro de hidrógeno, metanotiol y sulfuro de dimetilo se determinan mediante una cromatografía de gases acoplada con un detector de espectrómetro de masas. La técnica SPME (microextracción en fase sólida) se utiliza para extraer los compuestos de azufre de los quesos. Los compuestos volátiles se inyectan luego en la cromatografía de gases, se separan en una columna capilar y se detectan mediante el espectrómetro de masas. El método se calibra para cada uno de los tres compuestos.

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* para desarrollar aroma de azufre, preferiblemente aroma sulfuroso a huevo, en quesos duros o semiduros, en donde dicha al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* se inocula en leche en combinación con al menos una cepa de bacteria acidificante de ácido láctico.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la concentración de sulfuro de hidrógeno producida en dicho queso aumenta en un factor de al menos 3, en comparación con queso similar obtenido en las mismas condiciones en ausencia de *Lactobacillus sakei*.
3. Método para hacer un queso duro o semiduro que tenga un aroma de azufre, preferiblemente un aroma sulfuroso a huevo, que comprende la etapa de inocular la leche con al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* en combinación con al menos una cepa de bacteria acidificante de ácido láctico, en donde dicha al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* se inocula como concentrados secos, liofilizados o congelados secos.
4. Uso o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho queso es un queso semiduro, preferiblemente un queso semiduro, madurado por lámina.
5. Uso o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho queso tiene un nivel de humedad inferior al 45% de agua por peso.
6. Uso o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cepa de *Lactobacillus sakei* se selecciona del grupo que consiste en:
 - cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la CNCM por Danisco France SAS el 25 de abril de 2007 con el número CNCM 1-3750;
 - cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la CNCM por Rhodia Food SAS el 23 de mayo de 2000 con el número CNCM 1-2479; y mezclas de estos.
7. Uso o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha cepa de *Lactobacillus sakei* se usa en combinación con un microorganismo o varios otros microorganismos.
8. Uso o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho otro microorganismo o microorganismos comprenden una cepa de estafilococo, tal como una cepa de *Staphylococcus vitulinus* y/o una cepa de brevibacteria, como una cepa de *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens* o *Brevibacterium aurantiacum*.
9. Uso o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha bacteria láctica acidificante es una cepa que pertenece a la especie *Lactococcus lactis*, preferiblemente *Lactococcus lactis* subsp *lactis* y/o *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*.
10. Uso o método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cepa de *Lactobacillus sakei* se usa en combinación con un cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador mesofílico, más preferiblemente el cultivo iniciador Choozit™ Classic 111 FRO.
11. Composición bacteriana que comprende al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* y al menos otra cepa seleccionada del grupo que consiste en:
 - una cepa de *Staphylococcus vitulinus*, preferiblemente la cepa *Staphylococcus vitulinus* depositada en la CNCM por Danisco France SAS el 25 de abril de 2007 con el número CNCM 1-3751,
 - una cepa de brevibacteria, como una cepa de *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens* o *Brevibacterium aurantiacum*.
12. Composición bacteriana de acuerdo con la reivindicación 11, que se encuentra en forma de concentrados secos, liofilizados o congelados secos.
13. Queso duro o semiduro, preferiblemente un queso semiduro, madurado por láminas, obtenible por el método descrito anteriormente, en donde dicho queso comprende al menos uno de *Lactobacillus sakei* seleccionado del grupo que consiste en:
 - cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la CNCM por Danisco France SAS el 25 de abril de 2007 con el número CNCM 1-3750;
 - cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la CNCM por Rhodia Food SAS el 23 de mayo de 2000 con el número CNCM 1-2479; y mezclas de estos.

14. Queso duro o semiduro, preferiblemente un queso semiduro, madurado por láminas, que comprende al menos una cepa de *Lactobacillus sakei* y al menos una cepa de *Staphylococcus vitulinus*.

5 15. Queso duro o semiduro de acuerdo con la reivindicación 14, en donde *Lactobacillus sakei* se selecciona del grupo que consiste en:

-cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la CNCM por Danisco France SAS el 25 de abril de 2007 con el número CNCM 1-3750;

10 -cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la CNCM por Rhodia Food SAS el 23 de mayo de 2000 con el número CNCM 1-2479;

y mezclas de estos.