



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 789**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

A23C 19/032 (2006.01)

A23C 19/068 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04738974 .7**

96 Fecha de presentación : **02.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1644481**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54

Título: **Uso de compuestos implicados en biosíntesis de ácidos nucleicos como agentes crioprotectores.**

30

Prioridad: **02.07.2003 EP 03077079**

73

Titular/es: **Chr. Hansen A/S**
Boge Alle 10-12
2970 Hørsholm, DK

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2010

72

Inventor/es: **Kringelum, Borge, Windel;**
Sørensen, Niels, Martin y
Sørensen, Peter

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2010

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 347 789 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 compuestos implicados en biosíntesis de ácidos nucleicos como agentes crioprotectores.

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea nº. EP 03077079.6, solicitada el 02 de Julio de 2003.

10 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de cultivos microbianos congelados y liofilizados y compuestos implicados en la biosíntesis de ácidos nucleicos como agentes crioprotectores. Más particularmente la invención se refiere a cultivos obtenidos por el uso de tales agentes, que además de la actividad crioprotectora, confieren una actividad de cultivo metabólico aumentada cuando se inocula en el medio para ser fermentado o convertido. Tales cultivos congelados o liofilizados son útiles en la fabricación de numerosos productos alimenticios y de pienso.

Antecedentes de la invención

Microorganismos están implicados en la producción de alimentos y piensos incluyendo la mayoría de productos lácteos. Cultivos bacterianos, en particular cultivos de bacterias generalmente clasificadas como bacterias ácido-lácticas, son esenciales en la fabricación de todos los productos lácteos fermentados, queso y mantequilla. No obstante, cultivos de determinados microorganismos no bacterianos, por ejemplo determinadas levaduras y hongos, se utilizan para procesar alimentos y piensos. Cultivos de estos microorganismos son frecuentemente referidos como cultivos iniciadores e imparten características específicas para varios productos lácteos mediante la realización de varias funciones. Cultivos iniciadores son muy usados en una variedad de industrias tales como, la industria de los lácteos al igual que en la industria de fabricación de vino, y la industria de fabricación de zumo, la industria de procesamiento de la carne.

Cultivos de microorganismos también encuentran usos importantes en la bioconservación de productos alimenticios (Andersen *et al.*, 1997).

Cultivos lácteos iniciadores comerciales se componen generalmente de lactosa y bacterias fermentadoras del ácido cítrico. Bacterias ácido-lácticas designan un grupo de bacterias gram positivas, no móviles microaerófilas o anaeróbicas que fermentan azúcar con la producción de ácidos incluyendo ácido láctico. Industrialmente algunas de las bacterias ácido-lácticas más útiles incluyen especies de *Lactococcus*, especies de *Streptococcus*, especies de *Enterococcus*, especies de *Lactobacillus*, especies de *Leuconostoc* y especies de *Pediococcus*.

Cepas de cultivos iniciadores lácteos comúnmente usadas de bacterias ácido-lácticas son generalmente divididas en organismos mesofílicos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo a aproximadamente 30°C y organismos termofílicos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo en la gama de aproximadamente 35°C a aproximadamente 45°C. Ejemplos de organismos del grupo mesofílico incluyen *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* biovar *diacetylactis* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Especies bacterianas de ácido láctico termofílico incluyen como ejemplos *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

Cultivos lácteos iniciadores son también clasificados según su composición de especies específicas y uso industrial preferido. Un cultivo iniciador puro comprende sólo una única especie mientras que un cultivo mezclado comprende dos o más especies diferentes. Cultivos iniciadores son frecuentemente categorizados según la temperatura en la que se exponen al crecimiento óptimo o actividad enzimática máxima. Cultivos iniciadores mesofílicos típicamente tienen una temperatura óptima de aproximadamente 30°C, mientras que cultivos termofílicos tienen una temperatura óptima de aproximadamente 35-45°C (Nielsen y Ullum, 1999). Ejemplos de cultivos comerciales mesofílicos mezclados incluyen:

55 “O-cultivo” comprendiendo *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*.

60 “D-cultivo” comprendiendo *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* biovar *diacetylactis*.

65 “L-cultivo” comprendiendo *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* y especies *Leuconostoc*.

“LD-cultivo” comprendiendo *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* y especies *Leuconostoc*.

Un O-cultivo se utiliza para hacer queso sin agujeros (Cheddar, Cheshire, Feta). Un D-cultivo se utiliza para hacer mantequilla. Un L-cultivo se utiliza para hacer queso con agujeros pequeños (p. ej., requesón) y productos lácteos

ES 2 347 789 T3

coagulados con baja producción de CO₂. Un *LD-cultivo* se utiliza para hacer queso con tamaños de agujero normales, de productos lácteos cuajados (cuajada) y mantequilla ácida. Comercialmente, *LD-cultivos* son habitualmente uno de los cultivos mezclados más usados.

5 Ejemplos de cultivos comerciales termofílicos mezclados incluyen:

“*Cultivo de yogur*” comprendiendo *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, y

10 “*Cultivo de queso termofílico*” comprendiendo *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus helveticus*.

Un *cultivo de yogur* se utiliza para hacer yogur y quesos italianos especiales, el *cultivo de queso termofílico* se utiliza para hacer queso Emmental y quesos italianos especiales.

15 Además, especies de *Propionibacterium* son frecuentemente usadas como cultivos lácteos iniciadores, particularmente en la producción de queso. También organismos del género *Brevibacterium* y del género *Bifidobacterium* son comúnmente usados como cultivos iniciadores alimenticios.

20 Otro grupo de cultivos iniciadores microbianos son los cultivos fúngicos, incluyendo cultivos de levadura y cultivos de hongos filamentosos, que son útiles en la producción de tipos determinados de queso y bebida. Ejemplos incluyen *Penicillium roqueforti*, *Penicillium candidum*, *Geotrichum candidum*, *Torula kefir*, *Saccharomyces kefir* y *Saccharomyces cerevisiae*.

25 Cultivos iniciadores son también muy usados en la industria de procesamiento de la carne, por ejemplo para la fabricación de varias salchichas y salamis.

Cultivos iniciadores comerciales son comúnmente distribuidos como cultivos congelados. A baja temperatura de los cultivos congelados, muchas actividades metabólicas en la célula cesan y las células se pueden mantener en este estado suspendido, aunque viable, durante largos períodos extensos.

30 Cultivos concentrados congelados son comercialmente muy interesantes puesto que los cultivos se pueden inocular directamente en el recipiente de producción. Usando cultivos concentrados congelados el usuario final evita la, de lo contrario obligatoria, fase de fermentación intermedia que requiere mucho tiempo durante la cual el cultivo iniciador es amplificado, y el usuario final reduce el riesgo de contaminación significativamente. Cultivos concentrados, pueden ser referidos como cultivos DVS - direct vat setTM.

35 Como una alternativa a los cultivos concentrados congelados, cultivos DVSTM concentrados liofilizados pueden ser preparados. Estos cultivos tienen una ventaja adicional en cuanto que pueden ser transportados sin refrigeración.

40 En general, posibles efectos perjudiciales de congelación y descongelación en la viabilidad de células vivas han sido asignados a la deshidratación de las células y la formación de cristales de hielo en el citosol durante la congelación.

45 Se han encontrado varios agentes crioprotectores que efectúan la concentración del citosol de una manera controlada y mínimamente injuriosa de modo que la cristalización de hielo en el citosol se excluye o minimiza durante la congelación.

50 Un artículo por F.J. Chavarri *et al.* (Biotechnology letters, vol 10, 1, 11-16 (1988), “Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus Lactis* strains”) describe que la viabilidad de almacenamiento de un cultivo puro congelado de *Streptococcus lactis* se puede mejorar por adición de un 5% de lactosa o 5% de sacarosa. La lactosa o sacarosa funcionaron como agentes crioprotectores. *Streptococcus lactis* es un nombre anterior de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*.

55 De forma similar, un artículo por R. Cárcoba *et al.* (Eur Food Res Technol (2000) 211, 433-437, “Influence of cryoprotectants on the viability and acidifying activity of frozen and freeze-dried cells of the novel starter strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 5180”) describe que la viabilidad de almacenamiento de un cultivo congelado puro de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* podría ser mejorado por adición de diferentes agentes crioprotectores tales como azúcares (lactosa, sacarosa y trehalosa), ácido glutámico y gelatina.

60 La viabilidad de cultivos liofilizados puede también ser mejorada usando agentes crioprotectores. Por ejemplo EP259739 describe varios agentes crioprotectores diferentes para cultivos liofilizados.

Han habido varios enfoques para proporcionar crioprotección tales como carbohidratos, proteínas y ciertos agentes activos de superficie.

65 En general, cantidades relativamente grandes de agentes crioprotectores se requieren para obtener el efecto crioprotector. Mientras que esto presenta un problema insignificante en algunos ajustes, presenta un problema significativo para industrias de procesamiento de alimentos donde incluso una pequeña desviación indeseada en el sabor del producto fermentado o procesado que es provocada por el agente crioprotector puede ser perjudicial. Nosotros no somos

conscientes de ningún cultivo comercial disponible concentrado congelado que contenga cantidades significantes de agentes crioprotectores.

5 Agentes aparte de carbohidratos, proteínas y agentes tensioactivos han sido usados para mejorar la estabilidad de cultivos a temperatura baja.

10 WO 00/39281 describe el uso de IMP y compuestos implicados en la biosíntesis de la síntesis de ADN para estabilizar la actividad metabólica de un cultivo iniciador líquido, mejor que la estabilidad de cultivos congelados o liofilizados.

15 WO 00/19817 describe una composición crioprotectora, en la que unos compuestos combinatorios mejor que cualquier componente individual se usa para crioprotección. La combinación incluye un bloqueador de canal de calcio, una matriz de nutriente celular, agua y adenosina. No obstante, el uso de compuestos farmacéuticos activos tales como bloqueadores del canal de calcio no son aceptables para aplicaciones de industria alimentaria.

20 JP 05 308956 describe un medio de cultivo para el cultivo de bacterias de nitrito que comprende un polisacárido de alto peso molecular en el que una unidad que consiste en 1 molécula de alfa-L-ramnosa, 1 molécula de ácido D-glucurónico y 2 moléculas de D-glucosa polimerizada linealmente y por ejemplo ATP. Bacterias de nitrato cultivadas en este medio se pueden congelar y almacenar. No hay ninguna indicación de que componentes del medio puedan funcionar como un agente crioprotector cuando se añaden a cultivos concentrados antes de la congelación.

La necesidad permanece para agentes crioprotectores eficaces que se pueden añadir a cultivos concentrados usados en la industria alimentaria.

25 **Resumen de la invención**

30 Se creía que no había problemas de estabilidad de almacenamiento significantes para cultivos de bacterias ácido-lácticas concentrados congelados comercialmente pertinentes. Aunque es bien conocido que la mayoría de células vivas sufren congelación y la descongelación posterior, la cuestión de la viabilidad no fue generalmente considerada significativa para cultivos de bacterias ácido-lácticas congelados concentrados comercialmente pertinentes. En consecuencia, cultivos concentrados congelados disponibles comercialmente no tienen cantidades significantes de agentes crioprotectores. Esto puede ser porque algunos cultivos iniciadores comerciales parecen ser muy resistentes a los efectos perjudiciales de la congelación y la descongelación.

35 Por ejemplo, varios estudios de estabilidad fueron realizados con cultivos de bacterias ácido-lácticas concentrados comerciales que han sido congelados durante 2-3 meses. Los cultivos de 2 a 3 meses de congelación no mostraron una degradación significativa de la actividad del cultivo durante un periodo de un año a temperatura inferior a -45°C. Consecuentemente, se creyó que cultivos comercialmente pertinentes no tuvieron problemas de estabilidad de almacenamiento significantes.

40 Los presentes inventores observaron por ejemplo que *LD-cultivos* congelados tienen una pérdida significativa de actividad en las primeras 1-3 semanas de almacenamiento congelado (como se ilustra en el ejemplo 1). Después de las primeras pocas semanas una pérdida de actividad adicional fue relativamente insignificante y en conformidad con los resultados conocidos previos anteriormente descritos.

45 Los inventores identificaron problemas de estabilidad no reconocidos referidos a la congelación y la fase inicial de almacenamiento para algunos tipos de cultivos de bacterias ácido-lácticas concentrados congelados comercialmente pertinentes, por ejemplo *LD-cultivos* congelados comerciales disponibles. Particularmente, cuando los cultivos se almacenan a la temperatura proporcionada por congeladores industriales modernos, típicamente alrededor de -50°C.

50 Los inventores han identificado una clase nueva de agentes crioprotectores dirigidos al problema de estabilidad y confieren una actividad aumentada metabólica del cultivo.

55 Una forma de realización de la invención se refiere a un cultivo concentrado congelado o liofilizado tal y como se define en la reivindicación 1, donde el cultivo comprende uno o más agente/s crioprotector/es seleccionado/s del grupo que consiste en uno o más compuesto/s implicado/s en la biosíntesis de ácidos nucleicos o uno o más derivado/s de cualquiera de tales compuestos, donde uno o más agente/s crioprotector/es es/son seleccionado/s del grupo que consiste en bases de purina, bases de pirimidina, nucleósidos y nucleótidos.

60 El agente crioprotector es preferiblemente añadido a las bacterias viables antes de que se congelen o liofilicen.

65 La presente invención también proporciona un método tal y como se define en reivindicaciones 17 o 18 para hacer un cultivo congelado o un cultivo liofilizado tal y como se define en la reivindicación 1 comprendiendo las fases siguientes: añadir uno o más agente(s) crioprotector/es tal y como se define en la reivindicación 1 a *organismos* viables tal y como se define en la reivindicación 1; congelar el material con una cantidad de agente crioprotector o una mezcla de agentes según la reivindicación 1 para obtener material congelado, y embalar el material congelado (o liofilizado) de una manera adecuada. En el caso de hacer un cultivo liofilizado el método comprende una fase donde la sublimación de agua del material congelado ocurre antes de la fase de embalaje.

ES 2 347 789 T3

Según la presente invención, se proporciona también un método de preparación de un producto alimenticio y de pienso, que comprende el uso de un cultivo según la invención. Preferiblemente el producto alimenticio se selecciona de un producto a base de leche, un producto cárnico, un producto vegetal y una bebida.

5 Otra ventaja de la nueva clase aquí descrita de agentes crioprotectores es que retienen la viabilidad al igual que la actividad metabólica de las células reconstruidas y no afectan al sabor del producto fermentado o procesado de ninguna manera adversa.

Definiciones

10

Antes de una discusión de las formas de realización detalladas de la invención está provista una definición de términos específicos relacionada con los distintos aspectos y formas de realización de la invención.

15 Como se utiliza en este caso el término “bacteria de ácido láctico” (LAB) designa una bacteria gram-positiva microaerofílica o anaeróbica, que fermenta los azúcares con la producción de ácidos incluido el ácido láctico (como el ácido producido predominantemente), ácido acético y ácido propiónico. Las bacterias ácido-lácticas industrialmente más útiles se encuentran entre especies *Lactococcus* (spp.), *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. y *Propionibacterium* spp. Adicionalmente, las bacterias pertenecientes al grupo de las bacterias estrictas anaeróbicas, bifidobacterias, es decir *Bifidobacterium* spp. que son
20 frecuentemente usadas como cultivos iniciadores de alimentos solos o en combinación con bacterias ácido-lácticas, son generalmente incluidas en el grupo de bacterias ácido-lácticas.

Mediante el término un cultivo “concentrado” se hace referencia a una composición que tiene un contenido de células viables (unidades formadoras de colonias, CFUs) que es al menos 10^8 CFU por ml, más preferiblemente al menos 10^9 CFU por ml, más preferiblemente al menos 10^{10} CFU por ml, más preferiblemente al menos 10^{11} CFU por ml, o más preferiblemente al menos 10^{12} CFU por ml. Como se puede observar en los ejemplos un cultivo concentrado puede por ejemplo ser obtenido por centrifugado.

30 El término “embalaje” debería ser entendido en sentido general. Denota que el cultivo congelado o liofilizado es embalado en cierto modo que se puede proporcionar al usuario. Se puede embalar en una botella, un tetra-pack[®], una bolsa, etc.

El término “un agente crioprotector” denota una sustancia que es capaz de mejorar la resistencia de los efectos perjudiciales inducidos por congelación y la fase inicial del almacenamiento de un cultivo congelado o liofilizado.
35 En el presente contexto éste puede ser un agente crioprotector individual específico o pueden ser dos o más agentes diferentes. Por consiguiente, el porcentaje p/p del/los agente/s crioprotector/es en el material de cultivo debería ser entendido como la suma de la cantidad de agente/s crioprotector/es. Un modo preferido de determinar si una sustancia es un agente crioprotector que es capaz de mejorar la resistencia del cultivo congelado hasta los efectos perjudiciales inducidos por congelación y la fase inicial del almacenamiento, es dividir un cultivo, como se describe en este caso,
40 en dos muestras, añadir una cantidad específica del agente crioprotector a una de éstas, congelarlas las dos y medir la actividad acidificante en los medios pertinentes (p. ej. leche) de los cultivos en el mismo día que la congelación y periódicamente (p. ej. hasta un año) cuando se conserva bajo almacenamiento congelado. Si el cultivo con agente crioprotector ha mejorado la actividad después del periodo de almacenamiento (tal como actividad mejorada acidificante de leche) la sustancia es un agente crioprotector. Un ensayo de actividad acidificante de leche adecuado se da en los
45 ejemplos de realización aquí.

Formas de realización de la presente invención son descritas abajo, a modo de ejemplos únicamente.

Descripción detallada de la invención

50

Como se ha discutido previamente, los cultivos concentrados congelados o liofilizados se consideran estables. No obstante a diferencia de la creencia general en el campo los inventores observaron problemas de estabilidad sorprendentemente no reconocidos hasta ahora relacionados con la congelación y la fase inicial del almacenamiento para algunos tipos de cultivos de bacterias ácido-lácticas concentrados congelados comercialmente pertinentes, tales como por ejemplo *LD-cultivos* congelados disponibles comercialmente, véase ejemplo 1 más debajo. Se contempla que tales problemas de estabilidad se encontrarán de forma muy amplia cuando los cultivos congelados o liofilizados comercialmente son evaluados apropiadamente.

60 Para superar este problema varios agentes posibles fueron evaluados para ver si podrían superar el problema. Entre los agentes evaluados fueron agente/s seleccionado/s del grupo que consiste en uno o más compuesto/s implicado/s en la biosíntesis de ácidos nucleicos que previamente fueron mostrados por los inventores para mejorar la estabilidad de cultivos iniciadores líquidos, no congelados.

65 WO 00/39281 describe el uso de IMP y compuestos implicados en la biosíntesis de la síntesis de ADN para estabilizar la actividad metabólica de unos cultivos iniciadores líquidos, pero a diferencia de cultivos, que permanecen líquidos durante el enfriamiento, los cultivos que se congelan se someten a varias salidas perjudiciales potenciales que se refieren directamente al proceso de congelación.

A la temperatura de congelación, los microorganismos se someten a muerte y daño cuando el cultivo empieza a congelarse y se forma hielo tanto extra como intracelularmente. La formación de hielo impone daño mecánico a células y además genera presiones osmóticas extracelulares altas que deshidratan las células. Cambios en la fuerza iónica y pH de la fase acuosa como resultado de la congelación también dañan la estructura y función de numerosos componentes celulares y macromoléculas que dependen de estos factores por su estabilidad (Adams, 2000).

La diferencia entre las salidas de estabilidad de cultivos líquidos contra congelados puede ser ilustrada adicionalmente por un experimento proporcionado por Mazur (1961). En este experimento células de levaduras fueron sumergidas en un baño a -15°C . El resultado fue que un 97% de las células sobrevivió cuando el sistema permaneció líquido, pero sólo un 27% de las células sobrevivió cuando este medio externo se congeló a -15°C (Mazur 1961).

Por lo tanto las medidas que deben ser proporcionadas por un agente crioprotector eficaz son muy diferentes dependiendo de si el agente crioprotector está diseñado para proteger cultivos líquidos o congelados, y consecuentemente, aditivos, que son agentes crioprotectores eficaces de cultivos líquidos, pueden no ser eficaces para cultivos congelados. Un ejemplo de tal aditivo es formato de sodio. Como se indica en WO 00/39281 un 3% de formato de sodio es eficaz para aumentar la estabilidad de almacenamiento de concentrados de cultivos iniciadores bacterianos del ácido láctico líquido. No obstante, como se ilustra en el ejemplo 15 más abajo, un 3% de formato de sodio reduce la estabilidad de almacenamiento de cultivo iniciador bacteriano del ácido láctico congelado.

Fue por lo tanto completamente sorprendente cuando los experimentos mostraron que IMP y cierto/s compuesto/s implicado/s en la biosíntesis de ácidos nucleicos mejoraban la estabilidad de ambos cultivos concentrados congelados y liofilizados.

Como se muestra en el ejemplo 2 más abajo, la adición de tal compuesto, inosina-5'-monofosfato (IMP), mejora significativamente la resistencia de los efectos perjudiciales inducidos por congelación y la fase inicial del almacenamiento. La adición de IMP también mejora significativamente la estabilidad de un cultivo liofilizado como se ilustra en el ejemplo 9 más abajo. Del ejemplo 10 más abajo está claro que IMP no sólo, sino una gama más amplia de agentes seleccionados del grupo que consiste en compuesto/s implicado/s en la biosíntesis de ácidos nucleicos son eficaces como agentes crioprotectores.

Como se ilustra en el ejemplo 10 ambos nucleótidos y nucleósidos pueden ser usados como agentes crioprotectores. Así, según la invención, el compuesto crioprotector que es útil para mejorar la resistencia de los efectos perjudiciales inducidos por congelación y la fase inicial del almacenamiento de un cultivo iniciador es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en bases de purina, bases de pirimidina, nucleósidos y nucleótidos. Tales compuestos se ejemplifican por inosina-5'-monofosfato (IMP), adenosina-5'-monofosfato (AMP), guanosina-5'-monofosfato (GMP), uranosina-5'-monofosfato (UMP), citidina-5'-monofosfato (CMP), adenina, guanina, uracilo, citosina, guanosina, uridina, citidina, hipoxantina, xantina, hipoxantina, orotidina, timidina, inosina y un derivado de cualquiera de tales compuestos o mezclas de los mismos.

Como se ha descrito anteriormente WO 00/19817 proporciona una combinación de un bloqueador del canal de calcio, una matriz de nutriente celular, agua y adenosina como una composición crioprotectora, no obstante, la posible actividad crioprotectora de componentes individuales, tales como por ejemplo adenosina no fue discutida. No obstante, la adenosina puede no ser eficaz como un agente crioprotector, como se ilustra en el ejemplo 12 y 15, donde la adenosina parece reducir la estabilidad de cultivos bacterianos. Además, Demetriou (WO 00/19817) usó cantidades de 2.7 a 3.6 mM de adenosina. Adicionalmente, nuestros experimentos muestran que la inosina es muy eficaz como un agente crioprotector y tanto adenosina como inosina son nucleótidos de purina. Esta observación se puede extender a los monofosfatos. Nuestros experimentos muestran que IMP, pero no AMP, es eficaz como un agente crioprotector. Esto es incluso más sorprendente puesto que, en el organismo, el ácido inosínico (IMP) se sintetiza a partir de ácido adelínico (AMP) por desaminación hidrolítica (White, 1973). Así en una forma de realización preferida de la invención uno o más agente/s crioprotector/es es/son seleccionado/s del grupo de nucleótidos de pirimidina e inosina.

En una adicional forma de realización preferida de la invención uno o más agente/s crioprotector/es es/son seleccionado/s del grupo de monofosfatos nucleósidos. En una forma de realización preferida al menos uno o el único agente crioprotector es IMP.

Carbohidrato o agentes crioprotectores de tipo proteínico no son en general descritos para aumentar la actividad metabólica de cultivos descongelados o reconstruidos. Los agentes crioprotectores de la invención tal como se ha definido anteriormente pueden también conferir además de su actividad crioprotectora una actividad aumentada metabólica (efecto impulsor) del cultivo cuando se inocula en el medio para ser fermentado, procesado o convertido.

Así una forma de realización de la invención es un cultivo congelado o liofilizado tal y como se define en reivindicación 1, donde el agente crioprotector es un agente o mezcla de agentes, que además de su crioprotectividad tiene un efecto impulsor.

La expresión "efecto impulsor" se utiliza para describir la situación donde el agente crioprotector confiere una actividad metabólica aumentada (efecto impulsor) en el cultivo descongelado o reconstruido cuando se inocula en el medio para ser fermentado o convertido. Viabilidad y actividad metabólica no son conceptos sinónimos. Los cultivos congelados o liofilizados comerciales pueden retener su viabilidad, aunque pueden haber perdido una parte significativa

ES 2 347 789 T3

de su actividad metabólica por ejemplo los cultivos pueden perder su actividad de producción de ácido (acidificación) cuando se mantienen almacenados incluso durante períodos de tiempo más cortos. Así la viabilidad y el efecto impulsor tienen que ser evaluados por ensayos diferentes. Mientras que la viabilidad se evalúa por ensayos de viabilidad tales como la determinación de unidades formadoras de colonias, el efecto impulsor se evalúa por la cuantificación de la actividad metabólica pertinente del cultivo descongelado o reconstruido relativamente a la viabilidad del cultivo. El ensayo de actividad acidificante descrito más abajo es un ejemplo de un ensayo que cuantifica la actividad metabólica pertinente del cultivo descongelado o reconstruido. El efecto impulsor es adicionalmente ilustrado en el ejemplo 3.

Aunque la actividad de producción de ácido está ejemplificada aquí, esta invención se destina a incluir la estabilización de cualquier tipo de actividad metabólica de un cultivo. Así, el término “actividad metabólica” se refiere a la actividad de eliminación de oxígeno de los cultivos, su actividad de producción de ácido, es decir, la producción de p. ej. ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y/o ácido propiónico, o su actividad de producción de metabolitos tal como la producción de compuestos de aroma tales como acetaldeído, (α -acetolactato, acetoína, diacetilo y 2,3-butilenglicol (butanodiol)).

Según la invención el cultivo congelado contiene o comprende de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 20% del agente crioprotector o mezcla de agentes medidos como % en peso del material congelado. Es, no obstante, preferible añadir el agente crioprotector o mezcla de agentes a una cantidad que está en la gama de 0.2% a 15%, más preferiblemente en la gama de 0.2% a 10%, más preferiblemente en la gama de 0.5% a 7%, y más preferiblemente en la gama de 1% a 6% en peso, incluso en la gama de 2% a 5% del agente crioprotector o mezcla de agentes medidos como % en peso del material congelado en peso. En una forma de realización preferida el cultivo comprende aproximadamente 3% del agente crioprotector o mezcla de agentes medidos como % en peso del material congelado en peso. La cantidad preferida de aproximadamente 3% del agente crioprotector corresponde a concentraciones en la gama de 100 mM. Debe ser reconocido que para cada aspecto de la forma de realización de la invención, las gamas pueden ser incrementos de las gamas descritas.

El término “material” del cultivo denota las sustancias pertinentes del cultivo incluyendo las bacterias viables y agente crioprotector. El posible embalaje no está incluido. Consecuentemente, el peso del material del cultivo no incluye el peso del posible embalaje.

En el caso de que el cultivo sea un cultivo liofilizado el agente crioprotector o mezcla de agentes está/están presente/s en una cantidad de 0.8% a 55% en peso, o en la gama de 1.3% a 40% en peso, o en la gama de 3% a 30% en peso, o en la gama de 6% a 25% en peso, incluida la gama de 10% a 24% en peso. En una forma de realización preferida el cultivo liofilizado comprende aproximadamente 16% del agente crioprotector o mezcla de agentes medidos como % en peso del material liofilizado en peso.

Adicionalmente, el cultivo congelado o liofilizado puede contener otros aditivos convencionales incluyendo nutrientes tales como extracto de levadura, azúcares, antioxidantes, gases inertes y vitaminas etc. También tensioactivos incluidos compuestos de Tween[®] pueden ser usados como aditivo adicional al cultivo según la invención.

Ejemplos adicionales de tales aditivos convencionales, que además se pueden añadir al cultivo según la invención, se pueden seleccionar de proteínas, hidrolizados de proteínas y aminoácidos. Ejemplos preferidos adecuados de estos incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en ácido glutámico, lisina, glutamato de sodio, caseinato de sodio, extracto de malta, polvo de leche desnatada, polvo de lactosuero, extracto de levadura, gluten, colágeno, gelatina, elastina, queratina, y albúminas o mezclas de los mismos.

Más preferiblemente los aditivos convencionales son un carbohidrato. Ejemplos adecuados de estos incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en pentosas (por ejemplo, ribosa, xilosa), hexosas (p. ej. fructosa, mañosa, sorbosa), disacáridos (p. ej. Sacarosa, trehalosa, Melibiosa, lactulosa), oligosacáridos (p. ej. rafinosa), Oligofruktosas (p. ej. Actilight, Fribrosas), polisacáridos (p. ej. maltodextrinas, goma xantano, pectina, alginato, celulosa microcristalina, dextrano, PEG), y polialcoholes (sorbitol, Manitol e Inositol).

La presente invención se refiere a cualquier concentrado congelado de cultivos liofilizados tal y como se define en reivindicación 1, y se dirige en particular a cultivos de microorganismos que se implican en la producción de alimentos y productos alimenticios incluyendo la mayoría de productos lácteos. Las formas de realización de la invención comprenden cultivos bacterianos tal y como se define en la reivindicación 1, en particular cultivos de bacterias que son generalmente clasificadas como bacterias ácido-lácticas y que son esenciales en la fabricación de todos los productos lácteos fermentados, queso y mantequilla. Cultivos de tales bacterias son frecuentemente referidos como cultivos iniciadores y estos imparten características específicas a varios productos lácteos mediante la realización de varias funciones. No obstante también cultivos que comprenden cultivos fúngicos que no forman parte de la presente invención, incluidos los cultivos de levadura y cultivos de hongos filamentosos, que son particularmente usados en la producción de tipos determinados de queso y bebida, son referidos en la técnica anterior como cultivos iniciadores. También cultivos, que se usan para procesar otros tipos de productos alimenticios o piensos, son referidos como cultivos iniciadores. Los cultivos usados en la fabricación de ensilaje son frecuentemente referidos como cultivos iniciadores también.

Conforme a la invención, cualquier organismo de cultivo iniciador tal y como se define en reivindicación 1 que se usa en la industria alimentaria o de piensos incluida la industria láctea puede ser usado. Así, el cultivo iniciador puede comprender uno o más organismos seleccionados del grupo que consiste en una *Bifidobacterium* spp., *Brevibacterium*

spp., *Propionibacterium* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. incluyendo *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Oenococcus* spp., *Lactococcus* spp. y incluyen el ampliamente usado *Lactococcus lactis*, incluido *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* que son comúnmente usados en la producción de quesos con una textura cerrada, p. ej. Cheddar, Feta y requesón.

5 Será apreciado, que el organismo de cultivo iniciador se puede seleccionar de una cepa genéticamente modificada de una o más de las cepas bacterianas del ácido láctico anteriores o cualquier otra cepa de cultivo iniciador tal y como se define en reivindicación 1. Como se utiliza en este caso la expresión “bacteria modificada genéticamente” se usa en el significado convencional de este término es decir se refiere a cepas obtenidas sometiendo una cepa bacteriana a cualquier tratamiento de mutagenización usado de forma convencional incluyendo tratamiento con un mutágeno 10 químico tal como etil metano sulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), a luz UV o a mutantes de origen espontáneo, incluida la mutagénesis tradicional. Además es posible proporcionar la bacteria genéticamente modificada por mutagénesis aleatoria seguida de selección de los mutantes de origen espontáneo, es decir sin el uso de la tecnología del ADN recombinante. Está además previsto que mutantes de bacterias ácido-lácticas y otros organismos 15 de cultivos iniciadores útiles potenciales se pueden proporcionar por tal tecnología incluyendo mutagénesis dirigida y técnicas de PCR y otras modificaciones *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN específicas una vez tales secuencias han sido identificadas y aisladas. Así está también contemplado que organismos de cultivos iniciadores útiles pueden ser obtenidos usando la tecnología del ADN recombinante. En particular la posibilidad de obtener organismos de cultivos iniciadores útiles por recombinación de secuencias de ADN que fueron inherentes al organismo particular, es 20 decir autoclonación, es atractivo desde un punto de vista de regulación de los alimentos.

Como es usual en la industria láctea, el cultivo iniciador puede comprender una mezcla de cepas incluyendo una mezcla de cepas de diferentes especies bacterianas del ácido láctico, tal como p. ej. una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*.

25 Cepas de cultivos iniciadores lácteos comúnmente usadas generalmente se dividen en “organismos mesofílicos”, que en el presente contexto son organismos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo a aproximadamente 30°C y “organismos termofílicos”, que en el presente contexto son organismos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo en la gama de aproximadamente 40 a aproximadamente 45°C.

30 La selección de cepas para el cultivo iniciador de la invención dependerá del tipo particular de producto alimenticio o de pienso fermentado por fabricar. P. ej. para la fabricación de queso y de mantequilla, cultivos mesofílicos de especies de *Lactococcus*, especies de *Leuconostoc* y especies de *Lactobacillus* son muy usadas. Así en una forma de realización el cultivo según la invención comprende uno o más organismos mesofílicos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo a aproximadamente 30°C. Organismos típicos de tales organismos mesofílicos incluyen *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei*.

40 En otra forma de realización adicional de la invención el cultivo según la invención comprende uno o más organismo/s termofílico/s que tiene/n temperaturas de crecimiento óptimo a aproximadamente 40°C hasta aproximadamente 45°C. Organismos termofílicos son frecuentemente usados para producir yogur y otros productos lácteos fermentados, pero también ciertos quesos son producidos usando cultivos termofílicos, por ejemplo queso Emmental y quesos italianos especiales. Organismos típicos de tales organismos termofílicos incluyen organismos seleccionados del grupo comprendiendo *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

45 En particular, cultivos de bacterias ácido-lácticas (cultivos LAB) han obtenido mucho uso comercial. Así una forma de realización preferida de la invención es un cultivo LAB que comprende uno o más organismos seleccionados del grupo que consisten en *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. y *Bifidobacterium* spp.

50 Cultivos iniciadores comerciales son frecuentemente categorizados según sus aplicaciones. Un *O-cultivo* se utiliza para hacer queso sin agujeros (Cheddar, Cheshire, Feta) y típicamente comprende uno o más organismos seleccionados del grupo comprendiendo *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*. Un *D-cultivo* se utiliza para hacer mantequilla y típicamente comprenden una o más especies de *Lactococcus* es decir *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Un *L-cultivo* puede convenientemente ser usado para producir queso con sólo agujeros pequeños (requesón) y productos lácteos cuajados con baja producción de CO₂. Típicamente organismos en un *L-cultivo* son *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* y *Leuconostoc* spp. Y finalmente, un *LD-cultivo* se utiliza para hacer queso con tamaños de agujero normales, productos lácteos cuajados (cuajada) y mantequilla agria. Comercialmente, un *LD-cultivo* es habitualmente uno de los cultivos mezclados más usados. Un *LD-cultivo* típicamente comprende uno o más organismos seleccionados del grupo comprendiendo *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* biovar *diacetylactis* y *Leuconostoc* spp.

65 Como es el caso de otros tipos de cultivos iniciadores mezclados la cantidad específica de las especies individuales bacterianas en un *LD-cultivo* pueden variar según el uso requerido específico. El experto en la materia es consciente de esto y capaz de determinar la composición de cultivo mezclado preferida según las necesidades requeridas.

ES 2 347 789 T3

Por ejemplo, si se requiere aroma se preferiría una composición óptima de las bacterias productoras de aroma *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* biovar *diacetylactis* y *Leuconostoc* spp.

Un *LD-cultivo* preferido comprende:

TABLA 1

Composición de *LD-cultivo*

<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>cremoris</i>	60 - 95%, preferiblemente 70 - 90%
<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp	5 - 40%, preferiblemente 0, 1 a 30%

En las gamas mencionadas, se prefiere tener de 0.25 a 6% de *Leuconostoc* spp y de 7 a 30% de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* biovar *diacetylactis*.

Por supuesto la suma en porcentaje total de las 4 especies de LAB diferentes no puede exceder 100%. No obstante, puede ser menos de 100% si otras bacterias aparte de las 4 mencionadas están presentes en el *LD-cultivo*. Ejemplo 2 aquí proporciona un ejemplo de un *LD-cultivo* estabilizado.

Una forma de realización particular preferida de la presente invención es *Lactobacillus acidophilus* comprendiendo el cultivo.

En otro aspecto la invención proporciona un método para hacer un cultivo congelado comprendiendo las fases siguientes: 1) añadir el agente crioprotector tal y como se define en reivindicación 1 a un cultivo concentrado de organismos viables tal y como se define en reivindicación 1, 2) congelar el material tal y como se define en reivindicación 17 para obtener material congelado, y 3) embalar el material congelado de una manera adecuada.

Será entendido que la congelación y fases de embalaje se pueden realizar en una multitud de vías.

La fase de congelación debería ser optimizada para asegurar la supervivencia de la célula. Algunas células (p. ej. la mayoría de LAB) pueden ser directamente congeladas, es decir, llevadas directamente en contacto con un agente ya a temperatura de criopreservación. Métodos directos incluyen goteo, pulverización, inyección o vertido células directamente en un fluido "de temperatura criogénica" tal como nitrógeno líquido, CO₂ líquido, o helio líquido. En el presente contexto temperaturas criogénicas se refieren a temperaturas inferiores a -50°C, preferentemente a temperaturas inferiores a -150°C (123°K). Las células pueden también ser directamente contactadas con un sólido enfriado, tal como un bloque de acero congelado con nitrógeno líquido. El fluido criogénico puede también ser vertido directamente sobre un recipiente de células. El método directo también comprende contactar las células con gases, incluyendo aire, a una temperatura criogénica. Una corriente de gas criogénico de nitrógeno o helio se puede disipar directamente o burbujear en una suspensión de células. Un método indirecto implicó colocar las células en un recipiente y contactar el recipiente con un sólido, líquido, o gas a temperatura criogénica. El recipiente para el método de congelación indirecta no tiene que ser impermeable al aire o líquido. Por ejemplo, una bolsa de plástico o un Tetra-Pak® son adecuados.

En una forma de realización preferida, el cultivo es concentrado, por ejemplo por centrifugado o ultrafiltración, el/los agente/s crioprotector/es es/son añadido/s al cultivo y el cultivo es posteriormente añadido gota a gota en N₂ líquido formando granulados de cultivo congelados. Los granulados de cultivo congelado son luego recogidos y embalados para poder ser provistos al usuario. Los granulados de cultivo congelado se pueden embalar en una botella, un tetra-pack®, una bolsa, o cualquier recipiente que es conveniente para el propósito. Los granulados de cultivo congelados y embalados son típicamente mantenidos y distribuidos a temperaturas asegurando que quedan congelados hasta que tienen que ser usados para inoculación de los medios para ser fermentados o procesados.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un método para hacer un cultivo liofilizado según la reivindicación 1 comprendiendo las fases siguientes: 1) añadir un agente crioprotector seleccionado de un agente tal y como se define en la reivindicación 1 a un cultivo concentrado de unos organismos viables tal y como se define en reivindicación 1, 2) congelar el material para obtener material congelado, 3) sublimar el agua del material congelado tal y como se define en reivindicación 18, y 4) embalar el material liofilizado de una manera adecuada. La adición de agente/s crioprotector/es, la fase de concentración opcional, la congelación (o liofilización) y las fases de embalaje pueden ser realizadas según se describe.

ES 2 347 789 T3

Mientras que cultivos congelados necesitan ser enviados y almacenados a temperaturas bajas los cultivos liofilizados se puede transportar y almacenar sin refrigeración durante períodos extendidos de tiempo, a condición de que se mantengan en condiciones secas. No obstante incluso en el caso de cultivos liofilizados, el almacenamiento debajo de 0°C es recomendado.

Típicamente ambos cultivos congelados y liofilizados según la invención se proveen como cultivos comerciales iniciadores DVS® o Redi-Set®. Una ventaja de los cultivos iniciadores DVS® es que se pueden añadir directamente al medio conteniendo fermentador o recipiente de producción en forma de células congeladas o liofilizadas. Esto resulta en una regeneración casi instantánea de células viables. Muchos de los cultivos iniciadores comercialmente distribuidos son cultivos de bacterias ácido-lácticas, así, una forma de realización preferida de la presente invención es el cultivo de bacterias ácido-lácticas (LAB) congeladas o liofilizadas obtenidas según se describe.

En otro aspecto, la invención pertenece a un método de preparación de un alimento o pienso dicho método comprendiendo el uso de un cultivo congelado o liofilizado según la invención.

En una forma de realización específica el producto alimenticio es un producto basado en leche tal como queso, yogur, mantequilla o un producto de leche fermentada líquido, tal como p. ej. leche de manteca, Ymer, mantequilla o yogur para beber. En otra forma de realización de la invención, el producto alimenticio es un queso incluyendo: tipos de queso blando, incluyendo pero no limitado a Camembert, Brie, Port Salut argentino, Crezenza, y Gorgonzola; tipos de queso Emmental, incluyendo pero no limitado a Emmental y Gruyère; tipos de queso Cottage, incluyendo pero no limitado a queso Cottage; tipos de queso Feta, incluyendo pero no limitado a Feta y queso blanco; tipos de queso Continental, incluyendo pero no limitado a Gouda, Edam, Maasdam, Samsøe, Saint Paulin, Raclette, Manchego, y Prato; tipos de queso Pasta Filata, incluyendo pero no limitado a Mozzarella, queso para Pizza, Provolone, y Kaskawal; tipos de queso Cheddar, incluyendo pero no limitado a Cheddar, territoriales, Cheddar americano, Monterey Jack, y Colby; y tipos de queso Grana, incluyendo pero no limitado a Grana, Parmesano, y Sbrinz.

Además, el producto alimenticio se puede seleccionar de un producto cárnico, un producto vegetal y una bebida tal como vino y cerveza.

Otra aplicación significativa del método según la presente invención es el uso de los cultivos iniciadores líquidos como los así llamados probióticos. Mediante el término “probiótico” se entiende en el presente contexto un cultivo microbiano que, ingerido en forma de células viables por seres humanos o animales, confiere una condición de salud mejorada, p. ej. por supresión de microorganismos nocivos en el tracto gastrointestinal, por aumento del sistema inmunológico o por contribución a la digestión de nutrientes. Un ejemplo típico de tal producto probióticamente activo es “leche acidophilus dulce”.

En otras formas de realización, el método según la invención se usa en la producción de un pienso tal como ensilaje, p. ej. césped, material de cereal, guisantes, alfalfa u hoja de remolacha dulce, donde los cultivos bacterianos se inoculan en la cosecha de pastos para ser ensilados para obtener una conservación de los mismos, o en residuos animales ricos en proteínas tales como residuos de matanza y residuos de pescado, también con los objetivos de conservar estos residuos para fines de alimentación animal.

La invención es posteriormente ilustrada en los siguientes ejemplos no limitativos y las figuras.

Fig 1. Muestra la estabilidad de un cultivo comercial congelado concentrado (F-DVS™ FI-Da N, Chr. Hansen A/S Artículo. N°. 501691) durante la fase inicial de almacenamiento a -50°C. La actividad del cultivo se determina por el ensayo de actividad acidificante usando una cantidad de material de inoculación, que es 0.01% p/v. El pH fue medido después 6 hrs. de incubación a 30°C en leche. Nota: un pH más alto es indicativo de actividad menos acidificante (es decir, menos actividad metabólica) del cultivo.

Fig 2. Muestra la estabilidad de almacenamiento expresada como la actividad acidificante de cultivo F-DVS™ congelado concentrado CH-N 14 (Chr. Hansen A/S Artículo. N°. 200118), con y sin el 3% p/p de IMP añadido. Nota: la ordenada muestra el pH medido después 6 hrs. de incubación a 30°C, cantidad de material de inoculación: 0.01% p/v. Un pH más alto es indicativo de actividad menos acidificante (es decir, menos actividad metabólica) del cultivo. Cuadrados abiertos indican cultivos con IMP, mientras que diamantes indican cultivos sin IMP.

Fig 3. Muestra la actividad acidificante de cultivos F-DVS™ CH-N 14 (Chr. Hansen A/S Artículo. N°. 200118) con y sin IMP añadido. La fermentación fue realizada con cultivos después de 2 meses de almacenamiento a -50°C. La fermentación fue evaluada en leche completa poco pasteurizada siguiendo el perfil de temperatura de Danbo de la Tabla 2. Las cantidades de cultivo añadidas se dan en % (p/v). Nota: la ordenada muestra el pH medido después de 6 hrs. de incubación a 30°C. Un pH más alto es indicativo de actividad menos acidificante (es decir, menos actividad metabólica) del cultivo.

Fig 4. Ilustra pérdida de actividad durante la congelación del cultivo F-DVS™ CH-N 19 (Chr. Hansen A/S Artículo. N°. 501593). El cultivo fue evaluado para actividad igual que el cultivo fue producido (en el día 0). Barras de error indican la desviación estándar. Nota: la ordenada muestra el pH medido después de 6 hrs. de incubación a 30°C, cantidad de material de inoculación: 0.01% p/v. Un pH más alto es indicativo de actividad menos acidificante (es decir, menos actividad metabólica) del cultivo.

ES 2 347 789 T3

Fig 5. Ilustra la pérdida de actividad acidificante de un F-DVS™ F1-Da N cultivo (Chr. Hansen A/S Artículo. N° 501691) como función de la cantidad de IMP añadido. Concentrados fueron almacenados como líquido a 8°C durante 5 h antes de la congelación. Barras de error indican la desviación estándar. Nota: la ordenada muestra el pH medido después de 6 hrs. de incubación a 30°C, cantidad de material de inoculación: 0.01% p/v. Un pH más alto es indicativo de actividad menos acidificante (es decir, menos actividad metabólica) del cultivo.

Fig 6. Muestra la estabilidad de almacenamiento expresada como la actividad acidificante de cultivo concentrado liofilizado de DVS™ F1-Da N con y sin 3% p/p de IMP añadido. El cultivo fue evaluado para actividad después de 7 días de almacenamiento a -50°C. Barras de error indican la desviación estándar. Nota: la ordenada muestra el pH medido después 6 hrs. de incubación a 30°C, la cantidad de material de inoculación: 0.01% p/v. Un pH más alto es indicativo de menos actividad acidificante (es decir, menos actividad metabólica) del cultivo.

Fig 7. muestra la estabilidad de almacenamiento expresada como la actividad acidificante de cultivo congelado concentrado (F-DVS™ F1-Da N, Chr. Hansen A/S Artículo. N° 501691) durante la fase inicial de almacenamiento con o sin 3% p/p de IMP, GMP, inosina o ningún añadido. Nota: la ordenada muestra el pH medido después de 6 hrs. de incubación a 30°C, cantidad de material de inoculación: 0.01% p/v. Un pH más alto es indicativo de actividad menos acidificante (es decir, menos actividad metabólica) del cultivo. Diamante sólido indica adición de 3% p/p de IMP, cuadrado gris indica adición de 3% p/p de GMP, triángulo sólido indica adición de 3% p/p Inosina y una esfera indica que ningún aditivo crioprotector fue añadido.

Ejemplos

Materiales y métodos

Cultivos

Los siguientes cultivos disponibles comercialmente fueron usados: F1 DaN, CH N 14 y CH N 19. Los tres cultivos son LD-cultivos congelados disponibles comercialmente en forma de LD-cultivos Frozen Direct Vat (F-DVS™), de Chr. Hansen A/S, Dinamarca como: F-DVS™ F1-Da N (Chr. Hansen A/S Artículo. N° 501691), F-DVS™ CH-N 14 (Chr. Hansen A/S Artículo. N° 200118), F-DVS™ CH-N 19 (Chr. Hansen A/S Artículo. N° 501593).

Medios de fermentación y condiciones de fermentación

Composición de medio para cultivo de LD-cultivos

Los LD-cultivos fueron cultivados en un medio que tiene la siguiente composición: hidrolizado de caseína (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido, código de producto L41), 30 g/l; Primatone RL (Quest, Naarden, Países Bajos, código de producto 5X59051), 30 g/l; peptona de soja (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido, código de producto L44), 30 g/l; extracto de levadura (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido, código de producto L21), 15 g/l; MgSO₄, 1.5 g/l; ascorbato de sodio, 3 g/l; y lactosa 50 g/l.

El medio fue esterilizado por tratamiento UHT (143°C durante 8 seg.). El medio final tuvo un pH de 6.5.

Condición de fermentación para LD-cultivos

La fermentación fue realizada en un tanque de fermentación de 100 l a 30°C usando 1% (p/p) del cultivo mencionado como inóculo. La fermentación anaeróbica fue realizada con nitrógeno en el espacio de aire y una presión de espacio de aire de aproximadamente 0.2 bar. Los cultivos fueron permitidos acidificar a pH 6.0. El pH fue posteriormente mantenido a 6.0 por adición controlada de 13.4 N NH₄ OH.

Cuando no se detectó más consumo de base, el cultivo respectivo fue enfriado hasta aproximadamente 10°C.

Tratamiento de postfermentación de LD-cultivos

Después del enfriamiento, las bacterias en caldos de fermentación fueron concentradas 10-20 veces por aditivos de centrifugado añadidos y posteriormente congelados como gránulos en nitrógeno líquido a una atmósfera de presión si no se indica lo contrario. La actividad acidificante de gránulos fue medida a varios tiempos después de la congelación del resto de los gránulos fueron almacenados a -50°C hasta un análisis posterior, a menos que se indique lo contrario.

Aditivos

Aditivos fueron obtenidos como se indica: inosina-5'-monofosfato (IMP) (Alsiano A/S, Birkerød, DK), adenosina-5'-monofosfato (AMP) (Sigma A2252), uranosina-5'-monofosfato (UMP) (Sigma U6375), citidina-5'-monofosfato (CMP) (Sigma C1006), formato de sodio (Kirsch Pharma, Salzgitter, DE), adenosina (Alsiano A/S, Birkerød, DK), guanosina (Alsiano A/S, Birkerød, DK) e inosina (Alsiano A/S, Birkerød, DK).

ES 2 347 789 T3

Ensayo de actividad acidificante y análisis de CFU

5 Cultivo congelado fue inoculado en un nivel de 0.01% (p/p) en 200 ml de leche desnatada reconstruida (RSM, por sus siglas en inglés) esterilizada por UHT conteniendo 9.5% (p/p) de materia sólida y calentada a 99°C durante 30 minutos (leche LAB). La RSM fue incubada a 30°C durante 6h para permitir la acidificación del material de sustrato. La actividad de acidificación fue medida como se describe en el Ejemplo 6: procedimiento analítico QAm-052, "actividad de acidificación - UHT", Chr. Hansen A/S (Dinamarca).

10 Producción de queso simulada después de un perfil de temperatura de DANBO

La acidificación se realiza conforme a un perfil de temperatura que refleja el transcurso de tiempo y temperatura que el cultivo típicamente encontró cuando se usó en la fabricación de la leche para la producción de un producto lácteo dado en este caso el queso DANBO.

15 El pH se mide a unos tiempos fijos como se indica en la tabla 2.

TABLA 2

El perfil de Danbo

20

Tiempo, minutos	Temperatura, °C	Variación
25 02:40	31. 0°C	±0.2 °C
00:15	Rampa 31.0°C a 38.0°C	±0.5 o
00:35	38. 0°C	±0.2 °C
30 04:24	Rampa 38.0°C a 16.0°C*	±0.5 °C
Hasta 16:00	16. 0°C	±0.2 °C

35

La actividad de acidificación fue medida como se describe en el ejemplo 7: Procedimiento analítico QAm-043, actividad de acidificación - "Perfil de temperatura programado" Chr. Hansen A/S (Dinamarca).

40 El análisis CFU fue medido y calculado como se describe en el ejemplo 8: procedimiento analítico Q-AM-071, "Enumeración de microorganismos" Chr-Hansen A/S (Dinamarca).

Ejemplo 1

45 Estudio de estabilidad de LD-cultivo congelado de FI-Da N

En este ejemplo la estabilidad medida mediante la actividad de acidificación de un LD-cultivo producido comercialmente: F DVS™ FI-Da N (Chr. Hansen A/S Artículo. N°. 501691) fue seguida durante un periodo de 6 meses. El cultivo fue producido y almacenado a -50°C como se describe en la sección materiales y métodos.

50

A diferencia de lo común, la primera medición de actividad en este ejemplo fue realizada inmediatamente después de que el cultivo fuera congelado como gránulos en nitrógeno líquido y seguido de mediciones después de 1, 2, 12, 20 y 188 días de almacenamiento a -50°C.

55

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 1.

La actividad de acidificación fue drásticamente disminuida durante los pocos primeros días de almacenamiento. Después de sólo una semana de almacenamiento la actividad de acidificación fue reducida con 0.26 unidades de pH. Esta reducción es equivalente a una reducción del 50% de la actividad de acidificación después de sólo una semana de almacenamiento. Después de dos semanas de almacenamiento una pérdida adicional de la actividad de acidificación de cultivos se volvió menos pronunciada y la actividad de acidificación del cultivo sólo disminuyó marginalmente durante el resto del periodo.

60

65 El resultado inesperado de este experimento hizo comprender a los inventores que había problemas de estabilidad significantes y no reconocidos hasta ahora que se relacionaban con la congelación y la fase inicial del almacenamiento de algunos tipos de cultivos de bacterias ácido-lácticas concentrados congelados pertinentes comerciales, tal como por ejemplo LD-cultivos congelados disponibles comercialmente.

ES 2 347 789 T3

Ejemplo 2

Estudio de estabilidad de LD-cultivo congelado de CH N14 usando IMP como agente crioprotector

5 Este ejemplo describe el estudio de estabilidad con cultivos de inoculación directa (frozen direct vat set, F-DVS™) de CH N14 formulado con IMP como agente crioprotector. En los experimentos la concentración de IMP fue mantenida a 3% p/p por gramo de biomasa concentrada. La IMP se añadió al concentrado como un 30% p/p de solución estéril.

10 Después de la fermentación, la biomasa fue cosechada y concentrada por centrifugado de caldo de fermentación de F-DVS™ CH N 14. El concentrado celular fue dividido en dos partes de 300 gramos cada y IMP se añadió a una de la partes. Los aditivos y concentrados fueron mezclados durante 30 minutos, congelados en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -50°C. El cultivo congelado tuvo un contenido de bacterias viables de al menos 10¹⁰ unidades formadoras de colonias (CFU) por g material congelado. La actividad del cultivo en leche (leche LAB) fue
15 medida después de 3 días de almacenamiento a -50°C y la actividad fue seguida periódicamente hasta 65 días.

Los perfiles de estabilidad para F-DVS™ de CH N14 dado como actividad de acidificación se resume en la figura 2.

20 Es evidente que F-DVS™ CH N14 libre de aditivos está perdiendo actividad. La reducción en estabilidad es igual a 0.25 unidades de pH para CH N 14 después del almacenamiento durante 65 días a -50°C. 0.25 unidades de pH es casi igual a una pérdida del 50% de la actividad de acidificación (es decir, el cultivo estabilizado es aproximadamente 2 veces tan activo como el cultivo no estabilizado).

25 Ejemplo 3

Estudio de estabilidad de LD-cultivo congelado de F-DVS™ CH N14 usando IMP como agentes crioprotectores evaluados después de un perfil de temperatura

30 En este experimento muestras del cultivo descrito en ejemplo 2 fueron evaluadas después del almacenamiento durante aproximadamente dos meses a -50°C. La actividad de acidificación fue medida en diferentes puntos temporales durante la incubación según un perfil de temperatura simulada "Danbo" - véase tabla 2. El medio de fermentación fue leche entera poco pasteurizada similar a la leche que normalmente se usa para la producción comercial de queso
35 Danbo.

La actividad acidificante de cultivos con y sin inosina-5'-monofosfato (IMP) añadida antes de la congelación fue comparada.

40 Un conjunto de botellas con leche entera poco pasteurizada fue inoculado con un cultivo congelado CH N14 sin IMP añadido. En este caso la cantidad de cultivo añadido fue 0.01%, 0.02% y 0.03%, respectivamente (p/p%).

Otro conjunto de botellas con leche entera poco pasteurizada fue inoculado con un cultivo congelado CH N14 con 3% (p/p%) de IMP añadida antes de la congelación. En este caso la cantidad de cultivo añadida fue 0.01% (p/p%).

45 Como se ha visto en el ejemplo 2 el cultivo sin IMP perdió aproximadamente un 50% de la actividad de acidificación que es equivalente a que un cultivo con IMP añadida tiene una actividad que es casi dos veces la actividad en comparación con una cantidad similar de un cultivo similar sin IMP añadida.

50 Para ilustrar el efecto impulsor de IMP la muestra sin IMP añadida fue inoculado usando tres cantidades diferentes de cultivo CH N 14. A juzgar por los resultados obtenidos en el ejemplo 1 (es decir, que poco menos del 50% de la actividad se pierde durante el almacenamiento de un cultivo sin IMP añadida) uno esperaría que la actividad de acidificación de un inóculo del 0.01% de un cultivo con IMP añadida estuviera en algún lugar entre la actividad de acidificación de un inóculo del 0.01% y 0.02% de un cultivo sin IMP añadida.

55 No obstante, como se ilustra en la figura 3, éste es no el caso. La actividad de acidificación de un inóculo del 0.01% de un cultivo con IMP añadida resultó estar en algún lugar entre la actividad de acidificación de un inóculo del 0.02% y 0.03% de un cultivo sin IMP añadida. Esta actividad extra la adscribimos al efecto impulsor de la IMP añadida.

60 Este experimento muestra que la adición de IMP a un cultivo resulta en una actividad más alta 2-2.5 X comparada con la adición de una cantidad similar de un cultivo similar sin IMP añadida.

El efecto impulsor no fue aparente en el Ejemplo 2, porque en el ejemplo 2 la leche ha sido sometida a un procedimiento de esterilización por calor más bien fuerte, es decir leche LAB. En nuestra experiencia, el efecto impulsor es
65 más pronunciado en la leche usada para fabricación de queso ya que esta leche es típicamente leche poco pasteurizada.

ES 2 347 789 T3

Ejemplo 4

Pérdida de actividad durante congelación de CH-N 19

5 Este ejemplo describe la pérdida de actividad durante la congelación de un cultivo de CH N19 formulado con IMP como agente crioprotector. En los experimentos la concentración de IMP fue mantenida al 3% p/p por gramo de biomasa concentrada (añadida como una solución estéril al 30% p/p).

10 Después de la fermentación, la biomasa fue cosechada y concentrada por medio de centrifugado del caldo de fermentación del cultivo de CH-N 19. El concentrado celular fue dividido en dos partes de 300 gramos e IMP se añadió a una de las partes. Los aditivos y concentrados fueron mezclados durante 30 minutos y posteriormente 150 g de las dos partes fueron congeladas en nitrógeno líquido. El cultivo tuvo un contenido de bacterias viables de al menos 10^{10} unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado. Cultivos congelados y no congelados con y sin IMP añadida fueron evaluados por sus actividades acidificantes inmediatamente después de que éstas fueran producidas. La actividad de cultivo fue medida en leche (leche LAB esterilizada por calor).

15 Los resultados mostrados en la figura 4 muestran una pérdida de actividad acidificante de 0.06 unidades de pH si el cultivo fue congelado sin IMP añadida. Una pérdida de 0.06 unidades de pH es equivalente a una pérdida del 5-10% de actividad acidificante. No obstante si IMP se añadió a este cultivo ninguna pérdida significativa de actividad fue observada. La diferencia de 0.01 unidades de pH es del mismo tamaño que el error estándar como se indica por las barras de error en la figura.

20 Se concluye que IMP también es capaz de actuar como un agente crioprotector y contrarrestar el impacto ejercido por la congelación de este tipo de cultivo.

25

Ejemplo 5

Respuesta de dosis para IMP usando el cultivo de F-DVS™ FI-Da N

30

Este ejemplo describe el estudio de respuesta de dosis con cultivos congelados (F-DVS™) de FI-Da-N formulado con IMP como agente crioprotector. En los experimentos la concentración de IMP fue 0%, 0.1%, 0.5%, 1%, 3% y 6% p/p por gramo de biomasa concentrada. El aditivo se añadió al concentrado como una solución estéril al 30%.

35 Después de la fermentación, la biomasa fue cosechada y concentrada por medio de centrifugado de caldo de fermentación de FI-Da N. El concentrado celular fue dividido en 6 partes de 300 gramos e IMP se añadió a cada una de las partes. Para simular una situación similar a la situación industrial durante el proceso de congelación los aditivos y concentrados fueron mezclados y almacenados durante 5 horas a 8°C y posteriormente congeladas en nitrógeno líquido y además almacenadas a -50°C. Así este ejemplo no se puede comparar con los ejemplos precedentes. El cultivo congelado tuvo un contenido de bacterias viables de al menos 10^{10} unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado. La actividad del cultivo en leche (leche LAB) fue medida el mismo día que los cultivos congelados fueron formulados.

40 Los resultados se muestran en la figura 5.

45

De estos resultados está claro que los cultivos concentrados, que fueron congelados sin, IMP añadida mostraron la pérdida más grande de actividad acidificante. El resultado óptimo (es decir, la más pequeña reducción de actividad acidificante) se obtuvo con adición de 3% (p/p%) de IMP.

50

Ejemplo 6

Procedimiento analítico QAm-052, "actividad de acidificación - UHT", Chr. Hansen A/S (Dinamarca)

Aplicación

Este método se usa para la determinación de la actividad de acidificación.

Principio

Para productos de F-DVS™ y FD-DVS:

65 El cultivo es diluido e inoculado en leche. Se incuba durante un tiempo dado a una temperatura dada. Después de la incubación el pH es medido.

Para productos de FD-RS Redi-Set® Congelado (F-RS) y Redi-Set® liofilizado:

ES 2 347 789 T3

Para estos productos, el análisis de actividad consiste en 2 fases de crecimiento. Un iniciador en masa es preparado creciendo el cultivo en leche durante un tiempo y temperatura dados. Después de esto el iniciador en masa se inocular en leche, y después un nuevo pH de la incubación es medido.

5

Parámetros de análisis

Balance de los parámetros de análisis de productos pueden ser leídos en un Sistema de Gestión de Información de Laboratorio (LIMS, por sus siglas en inglés). Ejemplos: tipo de leche, temperatura de leche en la 1ª y 2ª ponderación, período de incubación, temperatura de incubación, porcentaje de inoculación para las muestras y estándares de control.

Aparato y reactivos

15 pH-metro; electrodo de pH; tampones de calibración, pH 7.00 ± 0.01 y pH 4.01 ± 0.01 baño María con un termostato, precisión $\pm 0.2^\circ\text{C}$; sensor de temperatura; equilibrio, precisión 0.01 g con mínimo dos decimales; Aparato de rotación; Termómetro; Reloj; agitador magnético; Imanes; vasos de precipitación, 50 ml.

Procedimiento

Preparación de análisis

Nota: todos los matraces deberían originarse del mismo lote es decir con la misma fecha.

25

Al menos 16 horas antes del inicio de análisis todas las tapas son destapadas. Baño/s María es/son templado/s a temperatura de incubación. Las botellas durante la 1ª ponderación se templan a temperatura de inoculación (puede ser bien leche fría o caliente). Tampones a pH 4.01 y pH 7.00 se colocan en baño María a temperatura de incubación al menos 30 min antes de la calibración por el pH-metro.

30

Nota: para muestras, que se colocan en baño de hielo a 4°C antes de la incubación, el calentamiento al baño María es comenzado por un temporizador.

Preparación de muestras antes del análisis

Cultivos congelados: estándares de muestras/control congelados son colocados antes de la primera ponderación en una caja de espuma con hielo seco y son mantenidos aquí hasta que todos los pesajes son realizados.

40

Cultivos congelados, que son descongelados antes del uso

Para productos congelados, donde se usa una caja de cartón entera, el producto es descongelado conforme, véase instrucción local. Después de la descongelación, la muestra puede mantenerse a 4°C durante max. 30 min, antes del uso. Para cultivos congelados en tarros, una lata se coloca al baño maría a 22°C durante 20 min para descongelar el contenido. Después de la descongelación el cultivo puede mantenerse a 4°C durante max. 30 min. antes del uso.

Cultivos liofilizados

50

Estándares de muestras/control liofilizados se ambientan a temperatura ambiente durante al menos 15 min antes del inicio del análisis.

Procedimiento de inoculación

1ª ponderación/dilución

La botella para la 1ª ponderación se coloca en la balanza, que se fija a cero.

60

La ponderación de estándares de producto/control se realiza directamente en la leche.

El tiempo para la primera ponderación es siempre introducido cuando la inoculación se realiza en leche caliente. La cantidad real de inóculo (primera ponderación) es introducida con al menos dos decimales.

65

Productos congelados y descongelados se agitan cuidadosamente hasta que el producto se ha distribuido o máx. 10 veces, después de lo cual la botella se mantiene durante aprox 50 seg.

ES 2 347 789 T3

Para productos liofilizados el aparato de rotación (velocidad 2) se usa durante 5 min o hasta que los productos han sido distribuidos.

Nota: para productos liofilizados de *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* o *L. casei*, todas las inoculaciones se realizan en un banco limpio.

2ª Ponderación

La botella para la 2ª ponderación se coloca en la balanza, que se fija a cero.

Para productos congelados y descongelados, la botella de dilución se agita cuidadosamente antes de que se realice la 2ª ponderación. La 2ª ponderación se realiza conforme a los procedimientos de control de calidad (Qc, por sus siglas en inglés) actuales en el minuto de tiempo 1.

Para productos liofilizados la 2ª ponderación se realiza conforme el Qc actual.

El tiempo durante la 2ª ponderación se introduce cuando la inoculación es fría/caliente. La cantidad real de inóculo (2ª ponderación) es introducida con al menos 2 decimales.

La botella de actividad se gira y el procedimiento de inoculación se repite para las siguientes muestras/control.

Las botellas de actividad, que se inoculan desde la misma primera ponderación, son inoculadas una tras otra.

Nota: ponderación de productos mezclados:

Al principio una primera ponderación se obtiene a partir de cada estándar de control/cepa individual. A partir de cada una de estas las 2ª ponderaciones se realizan a la misma botella de actividad, de modo que contengan todos los estándares de control/cepas individuales.

Para productos congelados el tiempo desde la primera ponderación a la 2ª y última ponderación debe ser máx. 5 min. Para productos liofilizados el tiempo desde la primera ponderación a la ponderación de las últimas 2 debe ser máx. 10 min.

Por último colocar una botella de leche sin inocular al baño maría.

Para productos donde la primera ponderación se desarrolla en leche fría:

$$\text{Tiempo (medición)} = \text{Tiempo}_{2^{\text{a}} \text{ ponderación}} + \text{Tiempo}_{\text{incubación}}$$

o productos donde la primera ponderación se desarrolla en leche caliente:

$$\text{Tiempo (medición)} = \text{Tiempo}_{1^{\text{a}} \text{ ponderación}} + \text{Tiempo}_{\text{incubación}}$$

Nota: para productos, que además se analizan durante una larga acidificación, la inoculación para ello puede llevarse a cabo al mismo tiempo que la inoculación para la actividad de acidificación.

Desde la primera ponderación usada para actividad de acidificación, la segunda ponderación puede hacerse en leche de actividad fría, que se coloca a 4°C hasta la incubación al baño maría, que se calienta a temperatura de incubación. En este caso las botellas se incuban durante $\frac{1}{2}$ hora más que el período de incubación dado.

Nota: para productos donde tanto la inoculación como la medida de pH de muestras/estándares de control, debido a un tiempo de acidificación larga, es imposible dentro de horas de trabajo normales, la primera y segunda ponderaciones pueden llevarse a cabo en leche fría.

Después de la inoculación de la leche de actividad, las botellas se colocan al baño maría con enfriamiento. El sensor de temperatura de un reloj de contacto se coloca en una botella con leche no inoculada, que se coloca en el baño María. Un reloj de contacto se conecta para iniciar el calentamiento del agua a un tiempo dado, y primero cuando la temperatura para el producto de interés comienza el período de incubación.

Nota: si es preciso usar más de un baño María el estándar de control DEBE ser incubado junto con sus muestras conectadas en el mismo baño María.

Medición de electrodo de pH

La calibración se realiza según las instrucciones actuales con respecto a calibración de electrodo y mantenimiento.

ES 2 347 789 T3

Medición de pH-metro

El pH debe ser medido en los estándares de muestras/control al tiempo_{medición}. Si el tiempo excede más de un minuto, se anota. Si el tiempo excede más de dos minutos, la medición no es tomada en cuenta. Justo antes del tiempo de medición la botella es girada 180°.

La medición de pH se realiza en la botella o en una muestra, que se vierte en un vaso de precipitación de 50 ml con agitación imantada.

El pH es introducido con al menos 2 decimales.

Observaciones posibles en la medición son introducidas. El procedimiento de medición es continuo hasta que todos los estándares de muestras/control y la leche no inoculada son medidos. La temperatura del baño María se mide en una botella inoculada de leche y se introduce en el diario.

Finalmente, el pH en tampones de calibración es medido.

Ejemplo 7

Procedimiento analítico QAm-043, actividad de acidificación - "Perfil de temperatura programado" Chr. Hansen A/S (Dinamarca)

Aplicación

Este método se usa para la determinación de actividad de acidificación según la prueba de Pearce y en otras situaciones donde se realiza la acidificación según un perfil de temperatura, por ejemplo, el perfil de Danbo. Sólo la prueba de Pearce se incluye por el estándar IDF (estándar lácteo internacional).

Principio

La acidificación se realiza según un perfil de temperatura que refleja el curso de la temperatura, que el cultivo típicamente encuentra cuando se usa en la industria láctea para la producción de un producto lácteo dado.

Para la prueba de Pearce ésta es la temperatura de producción de queso durante la producción de Cheddar.

El pH se mide a un tiempo fijo.

Para cultivos donde el cuajo no se añade durante el análisis, una medida de pH continua puede ser aplicada.

Parámetros de análisis

Parámetros de análisis, que son específicos del producto, se dan en LIMS.

Definición de perfil de temperatura (para productos donde no se usa el perfil de Pearce).

Estándar de control para utilizar.

Tipo de medición de pH.

Porcentajes de inoculación para muestra y estándares de control.

Leche de dilución: 206.9 g de leche LAB fría (4°C) (es decir, leche desnatada reconstruida (RSM) esterilizada UHT conteniendo 9.5% (p/p) de materia sólida y calentada a 99°C durante 30 minutos).

Leche de actividad: 200 g de leche entera poco pasteurizada fría (4°C) con un 3.5% de grasa.

Cuajo: Naturén® estándar 190 diluido 1:40 con agua.

Aparato y reactivos

ph-metro/ph-metro para medición semi continuamente de pH eks. Radiometer® PHM92.

Electrodo de pH Radiometer® PFC2401.

ES 2 347 789 T3

Tampones: pH 7.00 ± 0.01 y pH 4.01 ± 0.01.

Baño María con un termostato programado para calentamiento según un perfil de temperatura predeterminado ± 0.2°C.

5

Sensor de temperatura.

Equilibrio, precisión 0.01 g con mínimo dos decimales

10

Reloj.

Agitador magnético.

Imanes

15

Vasos de precipitación, 50 ml.

Tazas de plástico pequeñas.

20

Aparato de rotación.

Procedimiento

25

Preparación de análisis

Todas las botellas deberían ser del mismo lote es decir con la misma fecha.

Baño/s de agua es/son templado/s a la temperatura inicial del perfil de temperatura para ser usado.

30

Botellas para dilución (=1ª ponderación) y para actividad (2ª ponderación) se colocan a 4°C hasta justo antes del uso.

35

Tampones a pH 4.01 y pH 7.00 se colocan al baño María a la temperatura de medición específica ± 0.2°C al menos 30 min antes de calibración con ph-metro.

Preparación de muestras antes del análisis.

40

Cultivos congelados

Estándares de muestras/control congeladas son colocados antes de la primera ponderación en una caja de espuma con hielo seco y son mantenidos aquí hasta que todas las ponderaciones son realizadas.

45

Cultivos congelados, que son descongelados antes del uso

Para productos congelados, donde una caja de cartón entera se usa, el producto se descongela según las instrucciones actuales.

50

Después de la descongelación de la muestra puede mantenerse a 4°C hasta máx. 30 min. antes del uso.

Cultivos liofilizados

55

Muestras liofilizadas y estándares de control se adaptan a la temperatura ambiente durante al menos 15 min antes del inicio del análisis.

60

A condición que la muestra vaya a ser usada para repetir la prueba al día siguiente, se puede almacenar a +8°C.

Procedimiento de inoculación

Ponderación de producto/estándar de control se realiza directamente en la leche.

65

La cantidad real de inóculo (primera ponderación) es introducida con al menos dos decimales.

ES 2 347 789 T3

Productos congelados y descongelados se giran cuidadosamente aproximadamente 4 veces, después de lo cual la botella se mantiene durante aprox. 50 seg.

5 Para productos liofilizados el aparato de rotación debe ser usado. Tiene que ser conducido con velocidad frecuente durante 5 minutos o hasta que el producto es completamente disuelto. Esto es controlado dejando la botella sobre la mesa durante un momento y luego controlando la solución mirando en el fondo de la botella.

10 Nota:

Si fuera conveniente para la rutina de trabajo una primera ponderación, en frío, puede mantenerse a temperatura ambiente durante max. 15 minutos antes de la 2ª ponderación.

15 *2ª Ponderación*

La botella de dilución es girada antes de que se realice la 2ª ponderación.

20 La cantidad real de inóculo (2ª ponderación) es introducida con al menos 2 decimales.

La botella de actividad se gira y el procedimiento de inoculación se repite para estándares de muestras/control.

Botellas de actividad, que se inoculan de la misma primera ponderación, son inoculadas una tras otra.

25 2 ml de cuajo se añade a cada botella bien antes o después de la 2ª ponderación. Después de esto, las botellas son giradas de modo que el cuajo sea distribuido.

El cuajo no se añade al perfil de Danbo.

30 (no estándar IDF)

Las botellas son posteriormente incubadas a un tiempo, como se describe en 6.

35 Al final 2 botellas de leche no inoculada se colocan al baño maría. Una para medir de la temperatura de baño maría y una para medir el pH en la leche ciega.

Incubación

40 Nota: cuando se requieren más baños maría son requeridos, el estándar de control con muestras correspondientes debe ser incubado en el mismo baño maría.

Todas las botellas de actividad se incuban al mismo tiempo en un baño maría precalentado a la temperatura inicial definida para el perfil de temperatura.

45 El perfil de temperatura comienza a medida que las botellas se colocan en el baño maría.

De aquí en adelante la temperatura de incubación se controla por un termostato programado para seguir un cierto perfil de temperatura. Para prueba de Pearce véase la tabla 3 y Tabla de Danbo 4.

50 El nivel de agua en el baño maría debería ser min. 2 cm superior al nivel de leche.

55

60

65

ES 2 347 789 T3

TABLA 3

Programa de Temperatura en perfil de Pearce (siguiendo el IDF)

Tiempo, minutos	Temperatura, °C	Variación
0	31.0	±0.2 °C
50	31.0	±0.2 °C
54	31.7	±0.5 °C
58	32.2	±0.5 °C
62	32.8	±0.5 °C
66	33.3	±0.5 °C
70	33.9	±0.5 °C
73	34.4	±0.5 °C
76	35.0	±0.5 °C
79	35.6	±0.5 °C
82	36.1	±0.5 °C
85	36.7	±0.5 °C
87.5	37.2	±0.5 °C
90	37.8	±0.2 °C
360	37.8	±0.2 °C

TABLA 4

Perfil de Danbo

Tiempo, minutos	Temperatura, °C	Variación
02:40	31.0°C	±0.2 °C
00:15	Rampa 31.0°C a 38.0°C	±0.5 °C
00:35	38.0°C	±0.2 °C
04:24	Rampa 38.0°C a 16.0°C*	±0.5 °C
Hasta 16:00	16.0°C	±0.2 °C

Nota: En el tiempo 3 horas y 30 minutos, activar el agua de refrigeración *medición de pH manualmente después 06:00 horas +/- 2 minutos corresponde a una temperatura en el baño maría de 25.5°C +/- 0.5°C.

ES 2 347 789 T3

Calibración de electrodo de pH

La calibración se realiza a la temperatura inicial según las instrucciones actuales con relación a la calibración del electrodo y mantenimiento.

5

Medición de pH

Tras la incubación las botellas son bien agitadas y se mide el pH.

10

La medición de pH se realiza en la botella o en una muestra, que se vierte en un vaso de precipitación de 50 ml con agitación imantada.

pH es introducido con al menos 2 decimales.

15

Observaciones posibles en la medición son introducidas.

El procedimiento de medición es continuo hasta que todas las muestras/estándares de control y la leche no inoculada son medidos.

20

Finalmente pH en los tampones se mide y se introduce.

Medición de pH continua

25

Se toman muestras de los valores de pH desde el momento en que el perfil de temperatura es comenzado. Después de que la incubación es completada, los valores de pH medidos en ambos tampones a la temperatura inicial son registrados.

30

Ejemplo 8

Procedimiento analítico Q-AM-071, "Enumeración de microorganismos" Chr-Hansen A/S (Dinamarca)

35

Área de aplicación

Este método se usa para enumeración de bacterias del ácido láctico en varios cultivos iniciadores y para recuento de contaminantes cruzados. El método es aplicable sólo con el programa analítico de cultivo concernido según procedimientos de control de calidad actual (Qc), porque referencia debe ser dada a los parámetros analíticos aquí.

40

Principio

El método es un método cuantitativo donde el resultado es proporcionado como CFU/g.

45

Una cantidad conocida de muestra se homogeniza con diluyente y diluciones decimales son preparadas. Diluciones apropiadas se mezclan con Leesment agar o extendidas en la superficie. Tras la incubación todas las colonias son contadas.

50

Muestreo

Tomar muestras según principios establecidos microbiológicos de modo que la muestra sea tan representativa como sea posible del producto a examinar.

55

Aparato y vidrio de laboratorio

Botellas de 250 ml

60

Tubos de 20 ml con tapas

Autoclave, funcionando a $\pm 1^\circ\text{C}$

65

pH-metro sensible a ± 0.2

Equilibrio, funcionando a ± 0.01 g

ES 2 347 789 T3

Whirlmixer

Stomacher

5 Bolsas estériles Stomacher, 400 ml

Incubadora, funcionando a $\pm 1^\circ\text{C}$

Baño María, funcionando a $\pm 1^\circ\text{C}$

10

Pipetas estériles

Platos Petri, 9 cm

15

Espátulas estériles Drigalski

Medios

20

TABLA 5

Diluyente, contenido

25

Peptona de caseína	15.0 g
NaCl	9.0 g
Antiespuma FG-10. 2%	1.14 ml

30

Preparación

Suspender los ingredientes en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta punto de ebullición bajo agitación frecuente. Dispensar el diluyente en botellas o tubos y someterá a autoclave a 121°C durante 15 minutos.

35

pH después de autoclave: 7.0 ± 0.2 .

Contenido en botellas después de autoclave: 99.0 ± 1.0 ml.

40

Contenido en tubos después de autoclave: 9.00 ± 0.05 ml.

Si el diluyente (tabla 5) debe ser usado inmediatamente entonces enfriar a 20°C o más bajo.

45

Almacenamiento

El diluyente preparado (tabla 5) se puede almacenar durante 6 meses a 5°C en un sitio oscuro.

50

TABLA 6

Leesment agar, contenido

55

Triptona (Oxoid L42)	20.0 g
Extracto de levadura (Oxoid L21)	5.0 g
Gelatina	2.5 g
Lactosa	10.0 g
NaCl	4.0 g
Tri-sodio-citrato, 2H ₂ O (Merck 6432)	2.0 g
Lactato de calcio, 5H ₂ O (Merck 2102)	8.0 g
65 Agar (So-Bi-Gel)	12.0 g

ES 2 347 789 T3

Preparación

Suspender los ingredientes en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta punto de ebullición bajo agitación frecuente hasta completar la solución. Distribuir el medio en botellas y someter a autoclave a 1214°C durante 15 min. pH después de autoclave: 6.8 ± 0.2 .

Si el medio es para ser usado inmediatamente, enfriar hasta aprox. 47°C al baño maría. Antes del uso 2 ml de solución de glucosa al 50% deben ser agregados a 200 ml de Leesment agar (tabla 6) para todos los CR-cultivos.

Es el medio usado para verter las placas extendidas de 12-15 ml de medio derretido en placas Petri y dejar el conjunto de medio y secar durante 30 min en un Clean Bench.

Solución de glucosa

2.0 g de glucosa se descongela en 100 ml de agua destilada. La solución es luego filtrada estéril usando un filtro de 0.20 µm.

Leesment-glucosa agar

Inmediatamente antes del uso 2 ml de solución de glucosa al 50% se añade a una de 200 ml. Elemento agar (tabla 6).

Almacenamiento

El preparado Leesment agar (tabla 6) se puede almacenar en oscuridad durante 6 meses a 5°C.

Placas vertidas embaladas en bolsas de plástico se pueden almacenar en la oscuridad durante 10 días a 5°C.

Procedimiento

NB - el periodo analítico de ponderación de la muestra hasta que la muestra es vertida en placas o extendida en placas no debe exceder 30 min.

Antes de comenzar el examen microbiológico, derretir el medio en un baño maría hirviendo o hervir en una autoclave, y luego enfriarlo a $47 \pm 1^\circ\text{C}$ al baño maría.

Nota - si placas prevertidas deben ser usadas la superficie del medio debe ser secado antes de ser colocado en placas.

En el programa analítico o Qc del producto concernido se da lo siguiente:

- a) la cantidad de gramos (X) para ser usada para la primera dilución (D1)
- b) Minutos en Stomacher (M)
- c) las diluciones apropiadas (D2)
- d) cantidad a sembrar (A ml)
- e) los parámetros de incubación
- f) método de colocación en placas

Preparación de diluciones

Pesar X gramos de producto en una bolsa estéril Stomacher y agregar pesando la cantidad suficiente de diluyente estéril para hacer la primera dilución (D1). Colocar la bolsa en el Stomacher y tratar durante (M) minutos. Si fuera conveniente, verter el contenido de la bolsa en una botella estéril vacía. Usando una pipeta estéril transferir 0.1 o 1.0 ml de la dilución mínima en una botella o tubo con diluyente estéril para hacer la siguiente dilución (que ahora es la más baja !).

El contenido en la botella se mezcla por agitación de la botella durante 7 seg 20-25 veces en un ángulo de 30°. El contenido en el tubo se mezcla en un Whirlmixer a velocidad máxima durante 3x1 seg.

Dejar que la espuma se disipe y repetir el punto 4 y 5 hasta que la/s dilución/es apropiada/s (D2) es/son alcanzada/s.

ES 2 347 789 T3

Verter en placas

5 Usando una pipeta estéril transferir un ml de la/s dilución/es apropiada/s (D2) en placas Petri. Verter 10-12 ml de medio derretido a no más de $47 \pm 1^\circ\text{C}$, en cada placa Petri y mezclar bien con la muestra. Verter 10-12 ml de medio derretido en una placa Petri vacía como un control de esterilidad. Dejar las placas en una superficie limpia horizontal hasta que el medio se haya establecido. Invertir las placas e incubar según los productos concernidos Qc.

Extender en placas

10 Usando una pipeta estéril transferir un ml de la/s dilución/es apropiada/s (D2) en la superficie del medio. Extender la muestra por todo el medio usando una espátula Drigalski estéril. Usar una placa Petri no inoculada con medio como un control de esterilidad. Dejar que la muestra sea absorbida por el medio antes de que los platos se inviertan e incuben según los productos concernidos Qc.

Recuento de colonias

20 Para recuentos de células viables totales platos petri conteniendo entre 30-300 colonias son elegidos. Todas las colonias son contadas.

Para el recuento de contaminantes cruzados, platos Petri no conteniendo más de 300 colonias son elegidos. Todas las colonias son contadas.

25 Nota - Por recuento de contaminantes cruzados el producto a analizar puede producir colonias señaladas, que formarán una nube en el fondo. Por lo tanto sólo colonias mayores que las colonias señaladas en la nube son contadas.

Cálculo

30 Después del recuento, una prueba χ^2 debe ser realizada en las cuentas de placa según procedimientos estadísticos estándar.

35 Nota - la prueba χ^2 no es realizada cuando el método se usa para contaminantes cruzados.

Si la prueba χ^2 no es aceptada los resultados deben ser rechazados y el análisis repetido.

Si la prueba χ^2 se acepta el número medio (N) de CFU/g se calcula según lo siguiente:

$$40 \quad N = (\sum c) / ((n1 + 0.1n2)d)$$

45 donde:

Σc es la suma de colonias contadas en todos platos Petri;

n1 es el número de platos Petri en la primera dilución;

50 n2 es el número de platos Petri en la segunda dilución;

d es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución.

Reporte de resultados

60 El recuento calculado puede ser proporcionado como en el ejemplo mencionado o como un número redondo con dos dígitos significantes.

Resultados, que son proporcionados externamente, deberían siempre ser redondos.

Ejemplo

65 19 184 se redondea a 19 000 y se proporciona como 1.9×10^4

294 x 10^8 se redondea a 290 x 108 y se proporciona como 2.9×10^{10} .

ES 2 347 789 T3

Para un número de tres dígitos, se redondea el tercer dígito al cero más próximo: - si el tercer dígito es 5 y el precedente dígito es un número par, se redondea al número de abajo. Si el precedente dígito es un número impar se redondea al número de arriba.

5 Ejemplo 28 500 se redondea a 28 000 y

11 500 se redondea a 12 000

10 Ejemplo 9

Estudio de estabilidad de un LD-cultivo liofilizado de FI-Da N

15 En este ejemplo, se hace una comparación entre el grado de alteración durante la fabricación de cultivos liofilizados (FD-DVS) de FI-Da-N formulado con y sin IMP como agente crioprotector. En los experimentos, la concentración de IMP fue 0% y 3% p/p por gramo de biomasa concentrada. El aditivo se añadió al concentrado como un 30% de solución estéril.

20 Después de la fermentación, biomasa fue cosechada y concentrada por medio de centrifugado de caldo de fermentación de FI-Da N. El concentrado celular fue dividido en 2 partes de 300 gramos e IMP se añadió a una de las partes. Para simular la situación encontrada en la situación industrial durante un proceso de congelación, los aditivos y concentrados fueron mezclados y almacenados durante 5 horas a 8°C y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido y además se almacenaron a -50°C durante un día antes de la liofilización. Después de que la liofilización se completara el cultivo fue almacenado a -50°C hasta el análisis. El cultivo congelado tuvo un contenido de bacterias
25 viables de al menos 10^{10} (CFU) de unidades formadoras de colonias por g de material congelado. Actividad de cultivo en leche (leche LAB) fue medida después 7 días de almacenamiento a -50°C.

Resultados se muestran en la figura 6.

30 Es evidente que DVS FI-Dn N liofilizado sin IMP añadida ha perdido más actividad. La reducción en estabilidad es igual a 0.25 unidades de pH para FI-Dn N después almacenamiento durante 7 días a -50°C. 0.25 unidades de pH es casi igual a una pérdida del 50% de actividad de acidificación.

35 Ejemplo 10

Estudio de estabilidad de LD-cultivo congelado de F-DVSTM FI-Da N usando compuestos diferentes implicados en la biosíntesis de ácidos nucleicos como agentes crioprotectores

40 Este ejemplo describe el estudio de estabilidad con cultivos de inoculación directa congelados F-DVSTM FI-Da N (Chr. Hansen A/S Artículo. N°. 501691) formulado con bien nucleótidos IMP o GMP (guanosina-5- monofosfato) o un nucleósido, inosina como agente crioprotector. En los experimentos la concentración de IMP, GMP o Inosina fue mantenida a 3% p/p por gramo de biomasa concentrada. La IMP y GMP fueron añadidas al concentrado como un 25% p/p de solución estéril acuosa, mientras que la Inosina fue añadida como polvo seco. En el caso de la inosina se añadió
45 agua al cultivo en una cantidad, que iguala a la cantidad añadida en el caso de adición de IMP o GMP.

Después de la fermentación, la biomasa fue cosechada y concentrada por medio de centrifugado de caldo de fermentación de F DVSTM FI-Da N. El concentrado celular fue dividido en cuatro partes de 300 gramos cada una e IMP, GMP, inosina o nada se añadió a una de las partes. Los aditivos y concentrados fueron mezclados durante
50 30 minutos, congelados en nitrógeno líquido y posteriormente almacenado a -50°C. El cultivo congelado tuvo un contenido de bacterias viables de al menos 10^{10} unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material congelado. Actividad de cultivo en leche (leche LAB) fue medida el mismo día que los cultivos fueron congelados y la actividad fue seguida periódicamente hasta 13 días.

55 Los perfiles de estabilidad para F-DVSTM FI-Da N dados como actividad de acidificación se resumen en la figura 7.

Es evidente que F-DVSTM FI-Da N libre de aditivos está perdiendo actividad. Relativamente al cultivo estabilizado por Inosina la reducción en estabilidad de un cultivo sin Inosina añadida es igual al 0.41 unidades de pH para F-DVSTM
60 FI-Da N después del almacenamiento durante 13 días a -50°C. 0.41 unidades de pH corresponde a una pérdida del 60% de actividad de acidificación. De forma similar la diferencia en estabilidad entre un cultivo F-DVSTM FI-Da N con o sin GMP añadida es igual a 0,31 unidades de pH, que corresponde a una pérdida del 50% de actividad de acidificación.

65

ES 2 347 789 T3

Ejemplo 11

Estudio de estabilidad prolongada de LD-cultivo congelado de F-DVS™ FI-Da N usando compuestos diferentes implicados en la biosíntesis de ácidos nucleicos como agentes crioprotectores

Este ejemplo describe el estudio de estabilidad prolongada con cultivos de inoculación directa congelados F-DVS™ FI-Da N (Chr. Hansen A/S Artículo. N°. 501691) formulado con bien IMP de nucleótidos o GMP (guanosina-5-monofosfato) o un nucleósido, inosina como agentes crioprotectores. Detalles experimentales fueron como se describe en el ejemplo 10, con la excepción de que la actividad fue vigilada durante un periodo temporal extendido.

Perfiles de estabilidad para F-DVS™ FI-Da N dados como actividad de acidificación fueron obtenidos.

Resulta que la tendencia que fue proporcionada durante el almacenamiento de fase inicial del F-DVS™ FI-Da N se puede extender a 21 o incluso 49 días. También durante el almacenamiento prolongado, la Inosina parece ser un mejor crioprotector de F-DVS™ FI-Da N que GMP que es también mejor que IMP. Además este experimento indica que la ventaja del uso de inosina como agente crioprotector durante la fase inicial de almacenamiento también se puede extender a la situación de almacenamiento prolongado. Así, se prevé que el uso de inosina como agente crioprotector supone un producto con un incremento superior a dos veces de la actividad de acidificación incluso después del almacenamiento prolongado.

Este es un resultado importante ya que el tiempo de conservación medio de cultivos comerciales congelados es de 1 año.

Ejemplo 12

El efecto de diferentes aditivos en la estabilidad en un LD-cultivo liofilizado de FI-Da N

Este ejemplo describe la estabilidad de LD-cultivos liofilizados (FD-DVS) de FI-Da-N formulado con y sin varios aditivos diferentes, que pueden actuar como agentes crioprotectores. En los experimentos la concentración de los varios aditivos fue del 3% p/p por gramo de biomasa concentrada a menos que se indique lo contrario.

Después de la fermentación, la biomasa fue cosechada y concentrada vía centrifugado de caldo de fermentación de FI-Da N como se describe en la sección materiales y métodos. El concentrado celular fue dividido en varias partes y se añadió a cada una de las partes. Para simular la situación encontrada en la situación industrial durante un proceso de congelación, los aditivos y concentrados fueron mezclados y almacenados durante 5 horas a 8°C y posteriormente congelados en nitrógeno líquido y además almacenados a -50°C durante un día antes de la liofilización. Después de que la liofilización fuera completada el cultivo fue almacenado a -50°C hasta el análisis. El cultivo liofilizado tuvo un contenido de bacterias viables de al menos 10¹⁰ unidades formadoras de colonias (CFU) por g de material liofilizado. Actividad de cultivo en leche (leche LAB) fue medida por el ensayo de actividad acidificante después de 1 día y después de 2 meses de almacenamiento a -50°C.

De este experimento resulta evidente que los aditivos diferentes tienen un efecto muy diferente en la estabilidad de un cultivo DVS FI-Dn N liofilizado. Además este experimento muestra que aditivos, que resultan óptimos en la fase inicial de almacenamiento, no necesariamente son óptimos durante el almacenamiento prolongado. Esto se ilustra por el efecto de adición 3% p/p de inosina o adenosina a cultivos. Evaluado después de sólo un día de almacenamiento a -50°C parece que tanto el 3% p/p de inosina y el 3% p/p de adenosina son altamente eficaces para asegurar la estabilidad del cultivo, pero después de 2 meses de almacenamiento a -50°C fue evidente que el 3% p/p de CMP, UMP o IMP es preferido. Sorprendentemente, el resultado del experimento de estabilidad de 2 meses a -50°C indica que la adenosina es nociva para el cultivo. MSG (glutamato monosódico), que es un agente crioprotector bien conocido, (Font de Valdez, 1983) se incluye en el experimento por cuestiones de comparación. Además, debe ser notado que la concentración de formato de sodio es % p/p, porque 3% p/p es perjudicial para cultivos congelados, véase ejemplo 15 más abajo.

Ejemplo 13

Efecto de una combinación de aditivos en la estabilidad de un cultivo de L. bulgaricus congelado con un índice de congelación de 1°C por min

Este ejemplo describe el efecto de una adición de una combinación de dos agentes crioprotectores potenciales (IMP e Inosina) en la actividad implicada por la fabricación de un cultivo de *L. bulgaris* congelado. En el ejemplo, las actividades de cultivos con y sin tal adición fueron comparadas.

El cultivo de *L. bulgaricus* fue cultivado en caldo MRS (Difco) durante 12 hrs a 40°C. El cultivo fue enfriado a 12°C y el pH del cultivo fue ajustado a 6,0. Después del enfriamiento; las bacterias en caldos de fermentación fueron concentradas 10-20 veces por centrifugado, los aditivos fueron añadidos y posteriormente lentamente congelados en un congelador con enfriamiento controlado asegurando que se alcanzara un índice de enfriamiento de aproximadamente

ES 2 347 789 T3

1°C por minuto hasta -50°C. Los cultivos fueron almacenados a -50°C hasta el día siguiente (aproximadamente 18 hrs) antes de que el ensayo de acidificación fuera realizado. El ensayo de acidificación fue realizado como se describe en la sección materiales y métodos excepto que el ensayo se basó en un inóculo de 0.02% p/p y se realizó a 40°C durante un periodo de 5 horas.

5

En el experimento el 3% p/p de IMP y 2% p/p de inosina fueron añadidas como crioprotectores, p/p se refiere a peso de aditivo por gramo de biomasa concentrada. La IMP e inosina fueron añadidas al concentrado como una solución acuosa dando como resultado un aumento del 13% del volumen del cultivo.

10 Este experimento muestra que una combinación de dos aditivos según la presente invención, en caso que 3% p/p de IMP y 2% p/p de Inosina, vuelva el cultivo considerablemente más estable. La diferencia en estabilidad iguala 0.26 unidades de pH para el cultivo de *L. bulgaricus* después del almacenamiento durante 1 día a -50°C. 0.26 unidades de pH es casi igual a una diferencia del 50% en actividad de acidificación (es decir, el cultivo estabilizado es aproximadamente 2 veces tan activo como el cultivo no estabilizado). Este experimento además muestra que el efecto
15 crioprotector de IMP e inosina puede ser extendido también para comprender cultivos que son lentamente congelados.

Ejemplo 14

20 *Efecto de una combinación de aditivos en viabilidad de B. infantis congelado*

Este ejemplo explora el efecto de una combinación de 3% p/p de IMP y 2% p/p de Inosina en la estabilidad de *Bifidobacteria infantis* lentamente congelada.

25 El cultivo de *Bifidobacteria infantis* fue cultivado en caldo MRS (Difco). El cultivo fue enfriado a 12°C y el pH del cultivo fue ajustado a 6,0. Después del enfriamiento, las bacterias en caldos de fermentación fueron concentrados 10-20 veces por centrifugado, aditivos fueron añadidos y posteriormente los cultivos fueron congelados sea rápidamente por goteo del cultivo concentrado en nitrógeno líquido (cultivo A) o lentamente por enfriamiento del cultivo en un congelador con enfriamiento controlado asegurando un Índice de enfriamiento de aproximadamente 1°C por minuto hasta
30 que alcanzó -50°C (cultivo B y C). Los cultivos fueron almacenados a -50°C hasta el día siguiente (aproximadamente 18 hrs) antes del ensayo de viabilidad (ensayo CFU) fue realizado como se describe en Materiales y métodos.

Este experimento mostró que en comparación con un cultivo rápidamente congelado de bifidobacteria infantis (cultivo A) la viabilidad de un cultivo lentamente congelado (b) se reduce considerablemente. De manera importante,
35 este experimento además indica que si una combinación de dos aditivos según la presente invención, en el caso que 3% p/p de IMP y 2% p/p de Inosina, fuera añadido antes de la congelación (cultivo C), entonces el número de CFU del cultivo lentamente congelado fue casi idéntico al cultivo rápidamente congelado.

40 Concluimos que una combinación de 3% p/p de IMP y 2% p/p de Inosina es eficaz como un aditivo crioprotector para *B. infantis* que son lentamente congeladas.

Ejemplo 15

45 *Efecto de diferentes aditivos en la estabilidad en un cultivo F-DVS™ de CH-N 19 congelado*

Este ejemplo describe la estabilidad de cultivos de inoculación directa congelados (F-DVS™) del cultivo CH-N 19 formulado con y sin varios aditivos diferentes, que pueden actuar como agentes crioprotectores.

50 Después de la fermentación, la biomasa fue cosechada y concentrada vía centrifugado de caldo de fermentación de F-DVS™ CH-N 19. El concentrado celular fue dividido en varias partes y los distintos aditivos fueron añadidos.

Los aditivos y concentrados fueron mezclados durante 30 minutos, gota a gota congelados en nitrógeno líquido y
55 posteriormente almacenados a -50°C.

La actividad de cultivo en leche (leche LAB) fue medida como actividad de acidificación después de 1 día y 6 días de almacenamiento a -50°C. El ensayo de actividad se basa en un inóculo de 0,005% p/v y 6 hrs de incubación a 30°C.

60 Como se ha visto en el ejemplo 12 también este experimento mostró que los distintos aditivos tienen un efecto muy diferente en la estabilidad de un cultivo congelado. De manera interesante, este experimento muestra que tanto la adenosina como la adenosina-5'-monofosfato son nocivas para la actividad del cultivo. El experimento también proporcionó evidencias de que 3% p/p de Na-formato es perjudicial para la actividad de cultivos congelados.

65

ES 2 347 789 T3

Ejemplo 16

Ensayo con adición de IMP e Inosina (del Ejemplo 15) con CH-N 19™ añadido para la producción de queso Gouda 45+ Producción de Gouda 45+ en tinas de queso de 150 kg

1. Leche

Leche cruda fue entregada del Borup Dairy, Dinamarca, que ha sido pasteurizada a ~72°C durante 15 seg (leche orgánica, 76-78°C durante 15 seg) y luego enfriada a 5°C. El contenido de proteína normalmente variará de 3.4-3.7% de proteína. La leche recibida fue analizada en el Milkoscaner (Foss Electric A/S, Hillerod, Dinamarca) para grasa y proteína %. La temperatura de la leche fue tomada y una muestra fue tomada para análisis bacteriológico. La leche fue almacenada en una cámara de refrigeración hasta el uso.

2. Estandarización

La leche para producción de Gouda 45+ debería tener un contenido de grasa de 3.00% (con un contenido de proteína de 3.4%), que en el queso final supondrá en ~45% de grasa en materia seca. La proporción de grasa-a-proteína fue calculada usando los métodos estándares de la técnica. La leche de queso fue estandarizada añadiendo las cantidades calculadas de leche entera o desnatada. Después de la estandarización, la leche fue precalentada en el intercambiador térmico a la temperatura de maduración de 32°C y bombeada en las tinas de queso. Una agitación lenta (235 r.p.m.) fue continuada hasta que el cuajo se dispersa en la leche.

3. CaCl₂ y Nitrato sódico

Nitrato sódico fue añadido en una concentración de 0.020%, siendo 30 g por 150 kg de leche. CaCl₂ se añadió a la leche en una cantidad de 0-20 g por 150 kg de leche de una solución al 34% si se necesita.

4. Cultivo

En este experimento, 4 lotes fueron producidos y comparados. En el primer conjunto de lotes, un lote fue inoculado con 0.005% F-DVS CH-N 19 con IMP e Inosina añadida antes de la congelación (lote 1B). Un cultivo discontinuo de referencia fue inoculado con 0.01% F-DVS CH-N 19 sin IMP ni Inosina añadidas (lote 1A). Un segundo conjunto de lotes fue inoculado con 0.005% F-DVS CH-N 19 con IMP e Inosina añadidas antes de la congelación (lote 2B). Un lote de referencia fue inoculado con 0.01% F-DVS CH-N 19 sin IMP ni Inosina añadidas (lote 2A). Antes de la adición de cuajo el cultivo se deja crecer durante 35 min a 32°C.

5. Cuajo

Cuajo CHY-MAX Plus (200 IMCU/ml) fue añadido en la cantidad de 0.022% p/p (30.0 g por 150 kg). El cuajo fue diluido en 3 veces su volumen en agua corriente fría limpia antes del uso. La agitación (235 r.p.m.) fue continuada durante no más de 1 min después de la adición de cuajo y el agitador fue eliminado de la tina. Resulta que la leche se ha coagulado después de 35 min. después de la adición de cuajo.

Producción de Gouda 45+

La coagulación de la leche necesita normalmente 30-45 min. El coágulo fue cortado por la cortadora de marco con 5 mm entre las cuerdas. La cortadora de marco fue primero ejecutada horizontalmente de extremo a extremo seguido de una ejecución verticalmente de extremo a extremo en la tina para queso. Luego el coágulo fue cortado verticalmente de un lado a otras tres veces hacia abajo de los lados de la tina hasta obtener cubos de 5 mm. La cuajada fue tratada muy cuidadosamente en esta fase para minimizar pérdidas de lactosuero. El agitador fue sustituido en la tina y la cuajada fue preagitada lentamente (350 r.p.m.) durante 15-20 min. después 15-20 min 45 kg de lactosuero fueron drenados y el agitador fue luego ajustado a un nivel de agitación más rápido durante 20 min (415 r.p.m.). La escaldadura fue luego comenzada aumentando la temperatura a 38°C en el primer conjunto de lotes y 40°C para el segundo conjunto de lotes dentro de 20 min. Un aumento de temperatura lento, estable y controlado fue requerido. Después de alcanzar 38°C o 40°C, la agitación fue soportada con una agitación total de 85 min (significado 35-45 min. a 38°C o 40°C).

6. Prensado

Después de 95 min de agitación el agitador fue eliminado y la cuajada fue dejada cuajar en la tina. La cuajada fue luego inclinada y prepresada usando las placas de pre-prensado y los cilindros hidráulicos para aplicar una presión de 2.5 bar a la cuajada durante 30 min. Después del pre-prensado la cuajada fue cortada en dos bloques. Los

ES 2 347 789 T3

bloques de queso fueron colocados en moldes apropiados (30 x 30 cm) con el mismo lado hacia abajo como durante el preensado. Los moldes fueron luego colocados en la unidad de prensado y prensados durante 20 min a 2 bar y posteriormente durante 1-2 hora a 4-6 bar. Después del final del prensado, la altura de los quesos fue medida, los quesos, fueron pesados, identificados, y el pH fue analizado. Finalmente, los quesos fueron almacenados en los moldes hasta que alcanzaron pH 5.7, y después que fueron salados directamente en solución salina.

7. Salado

El salado se efectuó durante 20-24 horas en una solución salina de 20% NaCl + 0.25% CaCl₂, a una temperatura de 10-12°C hasta alcanzar un contenido de sal de aproximadamente 1.7% en los quesos finales. Fue importante que los quesos fueran separados adecuadamente y sumergidos durante el salado en solución salina hasta obtener el contenido de sal deseado. Después del salado los quesos fueron secados durante 1-2 horas antes del embalaje.

8. Embalaje

Antes del embalaje los quesos fueron pulverizados con Natamycin (300 ppm en agua), luego embalados al vacío en bolsas de plástico Cryovac® (BK1L) y puestos en cajas de plástico duro (30 x 30 cm). Después del embalaje, las cajas fueron almacenadas a 14C durante 4 semanas, y después fueron almacenadas a 5-8C.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 347 789 T3

Condiciones de cultivo

Lote 1:

5 A.) Cultivo experimental F-DVS CH-N 19 con IMP e Inosina añadidas.

Temperatura de escaldado de 38°C. Inoculación 0.005%

Tratamiento	CH-N19 con IMP e Inosina							
Lote nº	1B							
	Tiempo		Temperatura		Agitación	Velocidad	pH	Titulación
	Ajustar a	Actual	Ajustar a	Actual	Ajustar a	Actual		
Añadir leche	09:30			32,0	235		6,64	
Añadir nitrato sódico	09:35							
Añadir cultivo	09:45							
Añadir suplementos	10:15							
Añadir cuajo	10:20						6,55	
Cortar	10:55							
Preagitar	11:00				350			
Quitar suero	11:20			32,0			6,53	0,14
Agitar a medias	11:25				390			
Empezar escaldado/agitar	11:35						6,52	0,14
Terminar escaldado	11:50			38,0	390		6,51	0,15
Final de agitación	12:30						6,48	0,16
Pre-prensar	12:35							
Terminar preensado	13:05						6,34	0,17
Rellenar moldes	13:10							
Prensar 1	13:15							
Prensar 2	13:45							
Prensar 3	15:15							
Fin de prensado	15:15							
pH después de 6 horas	15:45						5,75	
En agua	16:00							

En solución salina 17:15, Solución salina: 21% NaCl, pH 5,2, temp.: 11,5°C 5,48

Fuera de solución salina 15:45 22,5h

Preensado 2,5 bar 30 min

pH después de 30 horas 5,21

ES 2 347 789 T3

B.) Cultivo de referencia F-DVS CH-N 19 sin IMP ni Inosina añadidas.

Temperatura de escaldado de 38°C. Inoculación 0.01%

5	Tratamiento	Referencia CH-N19							
	Lote nº	1A							
		Tempo		Temperatura		Agitación	Velocidad	pH	Titulación
10		Ajustar a	Actual	Ajustar a	Actual	Ajustar a	Actual		
	Añadir leche	09:00			32,0	235		6,63	
15	Añadir nitrato sódico	09:05							
	Añadir cultivo	09:15							
20	Añadir suplementos	09:45							
	Añadir cuajo	09:50						6,57	
25	Cortar	10:25							
	Preagitar	10:30				350			
	Quitar suero	10:50			32,0			6,53	0,15
30	Agitar a medias	10:55				390			
	Empezar escaldado/agitar	11:05						6,52	0,15
35	Terminar escaldado	11:20			38,0	390		6,52	0,15
	Final de agitación	12:00						6,51	0,16
40	Pre-prensar	12:05							
	Terminar preensado	12:35						6,41	0,17
45	Rellenar moldes	12:40							
	Prensar 1	12:45							
50	Prensar 2	13:15							
	Prensar 3	14:45							
	Fin de prensado	14:45							
55	pH después de 6 horas	15:15						5,92	
	En agua	15:30							

60 En solución salina 16:45, Solución salina: 21% NaCl, pH 5,2, temp.: 11,5°C 5,70
Fuera de solución salina 15:15 22,5h
65 Preensado 2,5 bar 30 min
pH después de 30 horas 5,20

ES 2 347 789 T3

Lote 2:

A.)*** Cultivo experimental F-DVS CH-N 19 con IMP e Inosina añadidas.

5 Temperatura de escaldado de 40°C. Inoculación 0.005%

Tratamiento	CH-N19 con IMP e Inosina							
Lote nº	2B							
	Tiempo		Temperatura		Agitación	Velocidad	pH	Titulación
	Ajustar a	Actual	Ajustar a	Actual	Ajustar a	Actual		
15	Añadir leche	08:30		32,0	235		6,63	
20	Añadir nitrato sódico	08:35						
25	Añadir cultivo	08:45						
30	Añadir suplementos	09:15						
35	Añadir cuajo	09:20					6,54	
40	Cortar	09:55						
45	Preagitar	10:00			350			
50	Quitar suero	10:20		32,0			6,52	0,14
55	Agitar a medias	10:25			390			
60	Empezar escaldado/agitar	10:35					6,52	0,15
65	Terminar escaldado	10:50		40,0	390		6,52	0,15
70	Final de agitación	11:30					6,47	0,16
75	Pre-prensar	11:35						
80	Terminar prepresado	12:05					6,36	0,16
85	Rellenar moldes	12:10						
90	Prensar 1	12:15						
95	Prensar 2	12:45						
100	Prensar 3	14:15						
105	Fin de prensado	14:15						
110	pH después de 6 horas	14:45						6,02
115	En agua	16:00						

En solución salina 19:00 5,60

Fuera de solución salina 17:30 22,5h

Prepresado 2,5 bar 30 min

pH después de 30 horas 5,22

ES 2 347 789 T3

B.) Cultivo de referencia F-DVS CH-N 19 sin IMP ni Inosina añadidas.

Temperatura de escaldado de 40°C. Inoculación 0.01%

Tratamiento	Referencia CH-N19							
Lote nº	2A							
	Tiempo		Temperatura		Agitación	Velocidad	pH	Titulación
	Ajustar a	Actual	Ajustar a	Actual	Ajustar a	Actual		
Añadir leche	08:00			32,0	235		6,60	
Añadir nitrato sódico	08:05							
Añadir cultivo	08:15							
Añadir suplementos	08:45							
Añadir cuajo	08:50						6,54	
Cortar	09:25							
Preagitar	09:30				350			
Quitar suero	09:50			32,0			6,54	0,14
Agitar a medias	09:55				390			
Empezar escaldado/agitar	10:05						6,53	0,14
Terminar escaldado	10:20			40,0	390		6,51	0,14
Final de agitación	11:00						6,49	0,15
Pre-prensar	11:05							
Terminar preensado	11:35						6,41	0,16
Rellenar moldes	11:40							
Prensar 1	11:45							
Prensar 2	12:15							
Prensar 3	13:45							
Fin de prensado	13:45							
pH después de 6 horas	14:15						6,24	
En agua	15:30							

En solución salina 19:00 Solución salina: 21% NaCl, pH 5,2, temp: 11,5°C 5,84

Fuera de solución salina 17:30 22,5h

Preensado 2,5 bar 30 min

pH después de 30 horas 5,32

ES 2 347 789 T3

Resultados

Los quesos fueron evaluados después de 8 semanas. El análisis químico fue determinado para asegurar que el queso estaba incluido en los requisitos de esta clase de queso (humedad, sal, grasa) de 4 semanas. Una evaluación sensorial de los quesos fue también conducida para asegurar que tenía la formación de agujero adecuada, textura y sabor.

Los productos de queso fueron además analizados para los siguientes defectos:

- 1.) Defectos en exterior (forma, cáscara, color, olor).
- 2.) Defectos en interior (color, estructura, consistencia).
- 3.) Defectos en olor y sabor.

Los lotes fueron luego marcados usando uno de los números: 0, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 o 13. La puntuación de 13 es la mejor.

Lotes 1

1A.) Referencia. Tina 406 F-DVS CHN-19 temperatura de escaldado de 38C

- La formación de agujero fue buena, 11.
- El olor fue bueno, agradable y limpio, carácter 11.
- El sabor fue como el deseado de Gouda, muy bueno, 11 (mantecoso, un poco agrio, salado y con sabor a nuez).

1B.) Tina 407 F-DVS CHN-19 IMP e Inosina añadidas. Temperatura de escaldado de 38C

- La formación de agujero fue buena, 11.
- El olor fue bueno, agradable y limpio, carácter 11.
- El sabor fue como el deseado de Gouda, muy bueno, 11 (mantecoso, un poco agrio, salado y con sabor a nuez).
- Ninguna diferencia en los quesos del cultivo existente ni en el cultivo evaluado fue detectada.

Lotes 2

2A.) Referencia tina 404 F-DVS CH-N 19. Temperatura de escaldado de 40C

- No tiene la suficiente formación de agujero deseada; los ojos fueron demasiado pequeños, carácter 9.
- El olor fue bueno, agradable y limpio, carácter 11.
- El sabor fue el deseado de Gouda, quizá poco demasiado salado pero muy bueno, 11.

2B.) Tina 405. F-DVS CH-N 19 con IMP e Inosina. Temperatura caliente de 38C

- La formación de agujero un poco mejor que el otro pero todavía deseamos agujeros mayores, 10.
- El olor fue bueno, agradable y limpio, carácter 11.
- El sabor fue el deseado de Gouda, quizá poco demasiado salado pero muy bueno, 11.
- Ninguna diferencia en los quesos del cultivo existente y el cultivo evaluado fue detectada.

ES 2 347 789 T3

Ejemplo 17

Ensayo con adición de IMP e Inosina a F-DVS R-604 para la producción de queso Cheddar

5 *Instrucción estándar para la producción de queso Cheddar en tinas de queso de 150 kg*

Cheddar es uno de los quesos más producidos. Originalmente sólo se fabricaba en el Reino Unido pero ahora es fabricado por todo el mundo, predominantemente en Australia, Canadá, Irlanda, Nueva Zelanda y EEUU. Los principios básicos de fabricación del queso Cheddar continúan siendo los mismos en todos los países con sólo algunas modificaciones.

El color puede variar de crema pálida a amarillo intenso. Achiote se añade en algunos casos para dar un color naranja/rojo. La textura es firme y cercana, y el queso no se desmorona cuando se corta. La mayoría de los Cheddar se vende cuando ha madurado durante 3-5 meses, y es muy suave. Cheddar bien maduro tiene un sabor a nuez con un bocado distintivo y es mejor madurado después de 9-12 meses.

Este procedimiento describe el procedimiento de producción de Cheddar tradicional, y sirve para determinar los efectos de crioconservación con IMP e Inosina en el inóculo de cultivo.

20 *3. Leche*

Leche se encarga a Borup Dairy (Dinamarca) y se entrega como leche cruda, que se pasteuriza a aproximadamente 72°C (162°F) durante 15 seg, y luego se enfría a aproximadamente 30-32°C. 475-600 ml de achiote de Chr. Hansen A320WS se añade por 5000 de leche cuando se desee Cheddar coloreado. Lotes paralelos de cultivo se preparan para comparar los efectos de crioconservación en presencia de IMP e Inosina en F-DVS R-604.

4. Cultivo

Un cultivo de control de F-DVS R-604 crioconservado sin IMP e Inosina (lote 1) se añade como inóculo a una concentración de aproximadamente 750 g/5000 litros de cultivo. Un cultivo de prueba de F-DVS R-604 crioconservado con IMP e Inosina (lote 2) se añade como inóculo a una concentración de aproximadamente 500 g/5000 litros de cultivo.

35 *5. Cuajo*

Cuajo CHY-MAX Powder Extra se añade a cada uno de los lotes en la cantidad de 2.5-3 g por 100l de leche. Después de la adición de cuajo, un gel se formará dentro de 30-45 minutos.

6. Producción de queso Cheddar

El procedimiento siguiente es seguido tan cercanamente como posible para cada uno de los lotes evaluados. La cuajada es cortada en cubos pequeños de 5 x 5 mm. La temperatura es luego aumentada a aproximadamente 38-40°C sobre un periodo de 40-50 min. La cuajada y el lactosuero se agitan durante 30-50 minutos dependiendo del contenido de humedad requerido.

50 *7. Fabricación de Cheddar*

La cuajada y lactosuero se separan y la cuajada se deja mezclar. La cuajada es luego "convertida en cheddar". La cuajada mezclada es cortada en bloques, que son girados cada 10-15 minutos. Cuando la acidez del lactosuero de los bloques alcanza pH 5.5-5.6, la cuajada es molida. La molienda implica cortar los grandes bloques de cuajada en pedazos del tamaño de un dedo.

8. Salado

Aproximadamente 2% de sal se añade a la cuajada, dando una concentración de sal final en el queso de 1.6-1.8% (sal en humedad 4.5-5%).

9. Embalaje

Moldeo y prensado se desarrollan en una torre bajo vacío parcial, con una presión mecánica afilada. El queso se forma en bloques de 20 kg y vacío embalado en bolsas de plástico. El queso se madura a 7-10°C durante 3-12 meses, dependiendo de la resistencia de sabor requerida (es decir, blando o maduro).

ES 2 347 789 T3

Conclusión

El queso Cheddar producido a partir de cada uno de los lotes será comparado en cuanto a sabor, textura y otras cualidades para determinar si el uso de inóculo crioconservado con IMP e inosina influye en el producto de queso Cheddar final. Inóculo conteniendo una mezcla de IMP e Inosina producirá prácticamente la misma calidad de queso como un inóculo que carece de una mezcla de IMP e Inosina. Otra ventaja de la invención es que una cantidad reducida de inóculo concentrado puede ser utilizada si el inóculo contiene un aditivo de IMP e Inosina.

10 Ejemplo 18

Prueba con adición de IMP e Inosina a F-DVS ST-M3 para la producción de queso Cottage

Instrucción estándar para la producción de queso Cottage en tinas de queso de 150 kg

Queso Cottage es un queso blando bajo en grasa muy popular en Reino Unido y EEUU, concienziados en el peso. El queso Cottage común es muy blando de modo que es popular dar sabor al producto añadiendo cebollinos, cebollas, etc. Dos métodos de fabricación de queso Cottage son usados: un método de cuajado corto y un método de cuajado largo. Detalles de ambos se proveen. El método de cuajado corto es descrito inmediatamente, seguido del método de conjunto largo que es descrito en la sección cinco.

1. Leche

Se encarga leche de Borup Dairy (Dinamarca) y se entrega como leche cruda, que se pasteuriza a aproximadamente 72°C (162°F) durante 15 seg, y luego se enfría a aproximadamente 34°C.

2. Cultivo

Para el método de conjunto corto, un cultivo de control de F-DVS ST-M3 crioconservado sin IMP e Inosina (lote 1) se añade como inóculo a una concentración de aproximadamente 2500 g/5000 litros de cultivo. Un cultivo de prueba de F-DVS ST-M3 crioconservada con IMP e Inosina (lote 2) se añade como inóculo a una concentración de aproximadamente 2000 g/5000 litros de cultivo.

3. Cuajo

Cuajo CHY-MAX Powder Extra se añade a cada uno de los lotes en la cantidad de 0.2-0.5 g por 50001 de leche.

4. Producción de queso Cottage

El siguiente procedimiento es seguido tan cercanamente como sea posible para cada uno de los lotes evaluados. La leche se incuba durante 4.5-5 horas hasta que un pH de 4.65-4.8 es alcanzado. La cuajada es cortada en cubos iguales de aproximadamente 12 mm. La cuajada reposa durante 10-15 minutos. La cuajada es agitada muy suavemente, y el escaldado comienza a una temperatura de 55-58°C que se consigue en 60-75 minutos. Cuando la cuajada es suficientemente firme, el lactosuero es drenado. La cuajada es luego lavada y drenada tres veces de la siguiente manera:

Primero, lavado con agua (13-15°C) para bajar la temperatura de cuajada a 29-32°C. Segundo, lavado con agua (13-154°C) para bajar la temperatura de cuajada a 18°C. Finalmente, lavado con agua (2-5°C) para bajar la temperatura de cuajada a 2-5°C. Después del drenaje final, la cuajada está lista para mezclarse con un aderezo dulce o cultivado.. Aderezos pueden ser hechos de varias combinaciones de crema, leche y leche desnatada en polvo.

5. Método de cuajado Largo

El proceso es similar a aquel que se puede usar en el método de cuajado corto, salvo para la concentración de inoculación del cultivo, la temperatura de incubación y período de incubación. Para el método de cuajado largo, un cultivo de control de F-DVS ST-M3 crioconservado sin IMP ni Inosina (lote 1) se añade como inóculo a una concentración de aproximadamente 500 g/5000 litros de cultivo. Un cultivo de prueba de F-DVS ST-M3 crioconservada con IMP e Inosina (lote 2) se añade como inóculo a una concentración de aproximadamente 300 g/5000 litros de cultivo. La concentración de inoculación inferior y temperatura de incubación de 20-22°C resultará en un período de incubación más largo necesario para conseguir el pH final deseado, que normalmente tardará 14-18 horas.

ES 2 347 789 T3

Conclusión

El queso Cottage producido de cada uno de los lotes será comparado para sabor, textura y otras calidades para determinar si el uso de inóculo criopreservado con IMP e inosina influye el producto de queso Cottage final. Inóculo conteniendo una mezcla de IMP e Inosina producirá prácticamente la misma calidad de queso como un inóculo que carece de una mezcla de IMP e Inosina. Otra ventaja de la invención es que una cantidad reducida de inóculo concentrado puede ser utilizada si el inóculo contiene un aditivo de IMP e Inosina.

10 Ejemplo 19

Prueba con adición de IMP e Inosina a F-DVS ST-M3 para la producción de Mozzarella/queso para pizza

Instrucción estándar para la producción de Mozzarella/queso para pizza en tinas de queso de 150 kg

Este tipo de Mozzarella es principalmente usado como queso para pizza. Como la Mozzarella es más firme que el queso blando es más fácil de rallar. Hay varios tipos de Mozzarella que tienen contenido diferente de agua y grasa en la materia seca. Mozzarella parcialmente descremada de humedad baja es normalmente usada como queso para pizza. Muy a menudo la cuajada se fermenta a pH 5.0-5.2 antes de que la cuajada se mezcle con agua caliente y se expanda. La elección de cultivo tiene una influencia más importante en las características de queso para pizza (es decir, expansión, dorado, derretimiento y eliminación del aceite).

1. Leche

La leche se encarga a Borup Dairy (Dinamarca) y se entrega como leche cruda, que se pasteuriza a aproximadamente 72°C (162°F) durante 15 seg, y luego se enfría a aproximadamente 36-38°C.

2. Cultivo

Un cultivo de control de F-DVS ST-M3 criopreservado sin IMP e Inosina (lote 1) se añade como inóculo a una concentración de aproximadamente 750 g/5000 litros de cultivo. Un cultivo de prueba de F-DVS ST-M3 criopreservado con IMP e Inosina (lote 2) se añade como inóculo a una concentración de aproximadamente 500 g/5000 litros de cultivo. El cultivo se incuba durante 30-45 minutos a 35-38°C.

3. Cuajo

Cuajo CHY-MAX Powder Extra se añade a cada uno los lotes en la cantidad de 1-3 g por 100l de leche.

4. Producción de queso Mozzarella

El siguiente procedimiento es seguido tan cercanamente como posible para cada uno de los lotes evaluados. El coágulo es cortado en cubos de 5-8 mm, y se deja curar durante 5 minutos. La temperatura es luego aumentada a 40-43°C durante 15-20 minutos con agitación. El queso es luego manejado usando el método de cuajada de Cheddar, donde todo el lactosuero es drenado, la cuajada es cortada en bloques y los bloques se giran durante la fermentación. La trituración de la cuajada ocurre a pH 5-5.25. Cuando el pH deseado se obtiene, el queso se coloca en una máquina de estirado y se mezcla con agua caliente, 75-80°C. El proceso tardará aproximadamente 10-15 minutos, y la temperatura del curado alcanza aproximadamente 58-65°C. El queso estirado se moldea e inmediatamente se enfría en agua enfriada a 5-10°C, que detendrá una acidificación adicional. Salar el queso en una solución salina de sal saturada a una temperatura de 10°C o inferior.

La Mozzarella/queso para pizza producido a partir de cada uno de los lotes será comparado en cuanto a sabor, textura y otras cualidades para determinar si el uso de inóculo criopreservado con IMP e inosina influye el producto final de Mozzarella/queso para pizza. Inóculo conteniendo una mezcla de IMP e Inosina producirá prácticamente la misma calidad de queso como un inóculo que carece de una mezcla de IMP e Inosina. Otra ventaja de la invención es que una cantidad reducida de inóculo concentrado puede ser utilizada si el inóculo contiene un aditivo de IMP e Inosina.

ES 2 347 789 T3

Ejemplo 20

Prueba con adición de IMP e Inosina a F-DVS CH-N 11 para la producción de queso Maasdammer

5 *Instrucción estándar para la producción de queso Maasdammer en tinas de queso de 150 kg*

Maasdammer es un tipo de queso suizo, llamado así por el río Maas en los Países Bajos. El queso tiene una formación de agujero relativamente grande al igual que un sabor suave y a nuez debido a las bacterias de ácido propiónico agregadas.

10

1. *Leche*

15 Leche se encarga a Borup Dairy (Dinamarca) y se entrega como leche cruda, que se pasteuriza a aproximadamente 72°C (162°F) durante 15 seg o termotratada a 65-70°C durante 20 segundos, y luego se enfría a aproximadamente 30-32°C.

20

2. *Cultivo*

Un cultivo de control de F-DVS CH-N 11 crioconservado sin IMP e Inosina (lote 1) se añade como inóculo a una concentración de aproximadamente 750 g/5000 litros de cultivo. Un cultivo de prueba de F-DVS CH-N 11 crioconservado con IMP e Inosina (lote 2) se añade como inóculo a una concentración de aproximadamente 500 g/5000 litros de cultivo. El cultivo se incuba durante 10-40 minutos a 32°C.

25

3. *Cuajo*

Cuajo CHY-MAX Powder Extra se añade a cada uno los lotes en la cantidad de 1-3 g por 100 l de leche.

30

4. *Producción de queso Maasdammer*

35 Un gel se formará en aproximadamente 30-45 minutos. El coágulo se corta en cubos de 5-7 mm, y la cuajada es lentamente agitada durante 15-25 minutos. Aproximadamente 35-45% del lactosuero es drenado y la cuajada es suavemente agitada durante 15 minutos. Aproximadamente 15-20% (del volumen inicial) de agua caliente a aproximadamente 60°C se añade. La temperatura de la cuajada es aproximadamente 35-38°C, y se agita durante aproximadamente 30-45 minutos. La mayor parte del lactosuero es drenado, y la cuajada es ligeramente prensada a 2-4 kg/cm² bajo el lactosuero restante durante 15-30 minutos. La cuajada es cortada en bloques adecuadamente dimensionados que se ajustan en moldes. Los moldes son ligeramente prensados durante 20 minutos, seguido de prensado a 4-6 kg/cm² durante 1-2 horas. Los bloques de cuajada se vuelcan directamente en solución salina fría a un pH de 5.6-5.7, y la concentración objetivo de sal del queso es 1-1.5%.

40

45 El queso Maasdammer producido de cada uno de los lotes será comparado en cuanto a sabor, textura y otras cualidades para determinar si el uso de inóculo crioconservado con IMP e inosina influencia el producto de queso de Maasdammer final. Inóculo conteniendo una mezcla de IMP e Inosina producirá prácticamente la misma calidad de queso como un inóculo que carece de una mezcla de IMP e Inosina. Otra ventaja de la invención es que una cantidad reducida de inóculo concentrado puede ser utilizada si el inóculo contiene un aditivo de IMP e Inosina.

50

Ejemplo 21

Prueba con adición de IMP e Inosina a F-DVS CHN-12 para la producción de queso Brie/Camembert

55 *Instrucción estándar para la producción de queso Brie/Camembert en tinas de queso de 150 kg*

Brie/Camembert estabilizado difiere de Brie/Camembert tradicional en que el reblandecimiento del núcleo del queso no es tan dependiente del tiempo como el pH min, al final de la producción de cuajada, es 4.9-5.4 en comparación con 4.6-4.8 para Brie/Camembert tradicional. Se usan moldes blancos para dar al queso su característica, superficie blanca y su sabor. Hay dos vías primarias de estabilizar el pH de queso:

60

1.) Estabilizado- Lavado de la cuajada, es decir, eliminando la lactosa y así reduciendo la cantidad de azúcar disponible para conversión a ácido láctico. Esto ayuda a conseguir el pH alto deseado. Para Brie/Camembert estabilizado se usan ambos cultivos mesofílicos y termofílicos, normalmente a un 30% mesofílico y 70% termofílico.

65

2.) Solubilizado- Inhibición de iniciador cuando pH está cerca del nivel deseado, por ejemplo, por salado o enfriamiento. Este tipo es sólo hecho con cultivos termofílicos, puesto que son más sensibles a las temperaturas inferiores que los cultivos mesofílicos.

ES 2 347 789 T3

1. Leche

La leche se encarga a Borup Dairy (Dinamarca) y se entrega como leche cruda, que se pasteuriza a aproximadamente 72°C (162°F) durante 15 seg, y luego se enfría a aproximadamente 35-37°C.

2. Cultivo

[0414] Un cultivo de control de F-DVS CHN-12 crioconservado sin IMP ni Inosina (lote 1) se añade como inóculo a una concentración de aproximadamente 250 g/5000 litros de cultivo. Un cultivo de prueba de F-DVS CHN-12 crioconservado con IMP e Inosina (lote 2) se añade como inóculo a una concentración de aproximadamente 200 g/5000 litros de cultivo. En el molde es introducido 3-5 U de líquido PCa 1, PCa 3 o PCa FD por 1000 litros, al igual que 0.5-1 u de GEO CD1.

3. Cuajo

Cuajo CHY-MAX Powder Extra se añade a cada uno los lotes en la cantidad de 2.5-3 g por 100l de leche.

4. Producción de queso Brie/Camembert

Un gel se formará en aproximadamente 30-45 minutos. El coágulo se corta en cubos de 10 mm, y 40% del lactosuero se drena. El mismo volumen de agua se añade a aproximadamente 40-45°C. El cultivo se deja reposar durante 30-50 minutos con agitación ocasional suave. La cuajada se vierte desde la tina en el molde, y el molde se gira primero después de una hora, se gira una segunda vez después de tres horas, y se gira una tercera vez después de ocho horas. La cuajada se quita del molde y se sumerge en una solución salina al 18%. El queso se pulveriza con 1-2 u de PCa 1, PCa 3 o PCa FD por 100 kilogramos de queso. El queso madura a 14-15°C y un 85% de humedad relativa durante un día, luego a 12°C y 95% de humedad relativa durante 8-10 días. Cuando el crecimiento del molde es satisfactorio, la superficie del queso se seca, se embala y se almacena a 4°C. Cada queso se embala en papel a prueba de grasa y se coloca en un cartón o caja de chip.

El queso Brie/Camembert producido de cada uno de los lotes será comparado en cuanto a sabor, textura y otras cualidades para determinar si el uso de inóculo crioconservado con IMP e inosina influencia el producto de queso Brie/Camembert final. Inóculo conteniendo una mezcla de IMP e Inosina producirá prácticamente la misma calidad de queso que un inóculo que carece de una mezcla de IMP e Inosina. Otra ventaja de la invención es que una cantidad reducida de inóculo concentrado puede ser utilizada si el inóculo contiene un aditivo de IMP e Inosina.

Ejemplo 22

Prueba con adición de IMP e Inosina a DVSTM FD-N para la producción de suero de manteca cultivado en una escala de 3 litros

Suero de manteca cultivado

Receta sugerida

Pretratamiento

Leche estandarizada homogenizada de alta calidad, con 0.5% grasa fue pretratada por pasteurización a 90°C durante 20 min en una tina.

3% IMP p/p y 2% Inosina fueron añadidas como estabilizadores a cultivos concentrados de DVS FD-N, cuya mezcla fue luego congelada. El nombre del producto congelado es ahora F-DVSTM FD-N.

Cultivos de F-DVSTM FD-N fueron congelados sin IMP ni Inosina para control. Todos los cultivos de F-DVSTM fueron almacenados durante dos meses a -50°C antes del uso.

Cultivos concentrados de (DVS FD-N) conteniendo IMP e Inosina fueron usados para inocular la leche a una concentración de 0.005% y la leche fue cultivada a una temperatura de 25°C a un pH de aproximadamente 4.5 en una fermentadora de 3 litros. Cultivos de control de DVSTM FD-N, congelado sin IMP ni Inosina, fueron usados para inocular la leche a una concentración de 0.01% y la leche fue cultivada a una temperatura de 25°C a un pH de aproximadamente 4.5 en una fermentadora de 3 litros.

ES 2 347 789 T3

Prueba no.	Cultivo	Cantidad de inoculante	Tiempo de fermentación	A pH
1	FD-N con IMP e Inosina	0.005%	151/2	4.51
2	FD-N sin IMP ni Inosina	0.01%	151/2	4.51

Post tratamiento

Quando el pH alcanzó 4.51, el producto fue agitado en un cubo con un agitador manual primero y luego durante 1 min a voltaje 55 con mezclador Ystral. Después de la agitación, el cubo fue colocado en baño de enfriamiento y enfriado hasta 18°C bajo agitación periódica con un mezclador manual. El producto fue luego vertido en botellas y almacenado a 8°C.

Resultados

El suero de manteca cultivado fue evaluado para sabor apropiado en los días 1 y 8:

Día 1:

FD-N con IMP e Inosina: Fresco, bajo CO₂, buen aroma

FD-N sin IMP ni Inosina: Fresco, bajo CO₂, buen aroma

Día 8:

FD-N con IMP e Inosina: Fresco, bajo CO₂, buen aroma

FD-N sin IMP ni Inosina: Sensación en la boca elevada, fresco, bajo CO₂, buen aroma

Los mismos tiempos de fermentación y pH fueron usados para un inoculo de 0.005% de F-DVS FD-N con IMP e Inosina añadida, comparado con un inoculo de 0.01% F-DVS sin IMP ni Inosina. La adición de IMP e Inosina no produjo ningún cambio en la viscosidad o el aroma/sabor del suero de manteca cultivado.

Resulta que la cantidad de material de inoculación puede ser la mitad si una mezcla de IMP e Inosina ha sido añadida al material de inoculación en comparación con un material de inoculación sin IMP ni Inosina. Una calidad similar de queso en cuanto a sabor y textura fue producida usando bien el inoculo experimental o el inoculo de control.

Referencias

■ M.R. Adams and M.O. Moss (2000) Food Microbiology, second edition, The Royal Society of Chemistry, UK, pp. 480, ISBN: 0-85404-611-9.

■ J. K. Andersen, B. Fabech, B. L. Jacobsen, H. Mejborn y L. Rasmussen (1997) Biokontaminering, Veterinaer- og fodevaredirektoratet, Kobenhavn, Denmark.

■ P. Mazur. (1961) Physical and temporal factors involved in the death of yeast at subzero temperatures. Biophys J. (1): 247-64.

■ E. W. Nielsen and J. A. Ullum (1999). Mejerilaere 1, Erhvervsskolemes Forlag, Odense, Denmark.

■ G. Font de Valdez *et al.* (1983) Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology*; 20(5):560-6.

5 ■ A. White, P. Handler and E. L. Smith (1973) Principles of Biochemistry, 5th ed., McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo.

■ R. Scott, (1986), Cheesemaking process, second ed., Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.

10 ■ G. Bylund, (1995), Dairy processing handbook, Tetra Pak Processing Systems, Lund, Sweden.

■ F. Kosikowski, (1982), Cheese and fermented milk foods, second ed., Kosikowski & Associates, New York.

15 ■ R. Scott (1986), Cheesemaking Practice, Second edition, Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.

■ Gösta Bylund, MSc (1995), Dairy Processing Handbook, Tetra Pak Processing Systems, S-221 86 Lund, Sweden.

20 ■ Frank Kosikowski (1982), Cheese and Fermented Milk Foods (2nd Ed), Published by Kosikowski & Associates, New York.

Referencias citadas en la descripción

25 *Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.*

30 Patentes citadas en la descripción

■ EP 03077079 A, 2003 [0001]

■ EP 259739 A [0021]

35 ■ WO 0039281 A [0025] [0047] [0050]

■ WO 0019817 A [0026] [0054] [0054]

40 ■ JP 5308956 A [0027]

Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

45 ■ F.J. Chavarri *et al.* *Biotechnology letters*, 1988, vol. 10, no. 1. 11-16 [0019]

■ R. Cárcoba *et al.* *Eur Food Res Technol*, 2000, vol. 211, 433-437 [0020]

■ M.R. Adams M.O. Moss *Food Microbiology The Royal Society of Chemistry* 2000. 480- [0426]

50 ■ J. K. Andersen B. Fabech B. L. Jacobsen H. Mejborn L. Rasmussen *Biokontaminering, Veterinaer- og føde-varedirektoratet, København, 1997*, [0426]

■ P. Mazur Physical and temporal factors involved in the death of yeast at subzero temperatures *Biophys J.*, 1961, 247-64 [0426]

55 ■ E. W. Nielsen J. A. Ullum *Mejerilaere 1, Erhvervsskolemes Forlag, Odense, 1999*, [0426]

■ G. Font de Valdez *et al.* Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying *Cryobiology*, 1983, vol. 20, no. 5. 560-6 [0426]

60 ■ A. White P. Handler E. L. Smith Principles of Biochemistry *McGraw-Hill* 1973. [0426]

■ R. Scott Cheesemaking process Elsevier Applied Science Publishers 1986. [0426]

65 ■ G. Bylund Dairy processing handbook Tetra Pak Processing Systems 1995. [0426]

■ F. Kosikowski Cheese and fermented milk foods Kosikowski & Associates 1982. [0426]

ES 2 347 789 T3

- **R. Scott** Cheesemaking Practice Elsevier Applied Science Publishers 1986. [0426]
- **Gösta Bylund**, MSc Dairy Processing Handbook Tetra Pak Processing Systems 1995. 221 86- [0426]
- 5 ■ **Frank Kosikowski** Cheese and Fermented Milk Foods Kosikowski & Associates 1982. [0426]

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Cultivo congelado o liofilizado, que comprende uno o más agente/s crioprotector/es seleccionado/s del grupo que consiste en uno o más compuesto/s implicado/s en la biosíntesis de ácidos nucleicos o uno o más derivado/s de cualquiera de tales compuestos; y

donde uno o varios agente/s crioprotector/es es/son seleccionado/s del grupo que consiste en bases de purina, bases de pirimidina, nucleósidos y nucleótidos; y

10 donde el cultivo comprende de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 20% del agente crioprotector o una mezcla de agentes medidos como % p/p del material congelado; o en el caso de que el cultivo sea un cultivo liofilizado el agente crioprotector o mezcla de agentes está/n presente/s en una cantidad de 0.8% a 55% en peso; y

15 donde el cultivo comprende uno o más organismos seleccionados del grupo que consisten en *Bifidobacterium* spp., *Brevibacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp.; *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., o *Oenococcus* spp.

20 2. Cultivo según la reivindicación 1, donde uno o varios agente/s crioprotector/es es un nucleótido.

3. Cultivo según la reivindicación 1, donde uno o varios agente/s crioprotector/es es/son seleccionado/s del grupo de nucleótidos de pirimidina e inosina.

25 4. Cultivo según la reivindicación 3, donde uno o varios agente/s crioprotector/es es/son seleccionado/s del grupo que consiste en IMP, UMPy CMP.

5. Cultivo según la reivindicación 3, donde el agente crioprotector comprende inosina-5'-monofosfato (IMP) e inosina.

30 6. Cultivo según la reivindicación 4, donde el agente crioprotector es inosina-5'-monofosfato (IMP).

7. Cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde uno o varios agente/s crioprotector/es es un agente o una mezcla de agentes, que, además de su crioprotectividad, tiene un efecto impulsor.

35 8. Cultivo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el cultivo comprende de aproximadamente 2% a aproximadamente 5% del agente crioprotector o mezcla de agentes medidos como % p/p de material congelado.

9. Cultivo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es liofilizado.

40 10. Cultivo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el cultivo es un cultivo iniciador.

11. Cultivo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende uno o más organismos mesofílicos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo a aproximadamente 30°C.

45 12. Cultivo según la reivindicación 11, donde el cultivo comprende uno o más organismos mesofílicos seleccionados del grupo comprendiendo *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

50 13. Cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 9-10, que comprende uno o más organismos termofílicos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo a aproximadamente 35°C a aproximadamente 45°C.

55 14. Cultivo según la reivindicación 13, donde el cultivo comprende uno o más organismos termofílicos seleccionados del grupo comprendiendo *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

15. Cultivo según la reivindicación 1, donde el organismo es un *Lactococcus* spp. que incluye uno o más de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

60 16. Cultivo según la reivindicación 1, donde el organismo es un *Lactobacillus* spp. que incluye *Lactobacillus acidophilus*.

17. Método para hacer un cultivo congelado según la reivindicación 1 comprendiendo las fases siguientes:

65 1) añadir un agente crioprotector seleccionado de un agente tal y como se define en la reivindicación 1 a un cultivo concentrado de organismos viables como se define en la reivindicación 1,

ES 2 347 789 T3

- 2) congelar el material para obtener material congelado con una cantidad del agente crioprotector o una mezcla de agentes tal y como se define en la reivindicación 1, y
- 3) embalar el material congelado de una manera adecuada.

5

18. Método para hacer un cultivo liofilizado según la reivindicación 1 comprendiendo las fases siguientes:

- 1) añadir un agente crioprotector seleccionado de un agente tal y como se define en la reivindicación 1 a un cultivo concentrado de organismos viables tal y como se define en la reivindicación 1,
- 2) congelar el material para obtener material congelado,
- 3) sublimar agua del material congelado para obtener material liofilizado con una cantidad de agente crioprotector o una mezcla de agentes tal y como se define en la reivindicación 1, y
- 4) embalar el material liofilizado de una manera adecuada.

10

15

20

19. Método según la reivindicación 17, donde el organismo es un *Lactococcus* spp. que incluye uno o más de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*.

25

20. Método según la reivindicación 17, donde el organismo es un *Lactobacillus* spp. que incluye *Lactobacillus acidophilus*.

21. Método según la reivindicación 18, donde el organismo es un *Lactococcus* spp. que incluye uno o más de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*.

30

22. Método según la reivindicación 18, donde el organismo es un *Lactobacillus* spp. que incluye *Lactobacillus acidophilus*.

23. Método para producir un producto alimenticio cultivado comprendiendo cultivar un material precursor con el cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, y obteniendo un producto alimenticio cultivado.

35

24. Método según la reivindicación 23, donde el producto alimenticio cultivado se produce a partir de un material precursor lácteo.

25. Método según la reivindicación 24, donde el producto alimenticio cultivado es suero de manteca.

40

26. Método según la reivindicación 24, donde el producto alimenticio cultivado es un queso seleccionado de Cheddar, Gouda, cabaña, Emmental, Grana, Mozzarella/pizza, Maasdammer, y Brie estabilizado o Camembert.

45

50

55

60

65

Estabilidad de FDVS FI-Da N

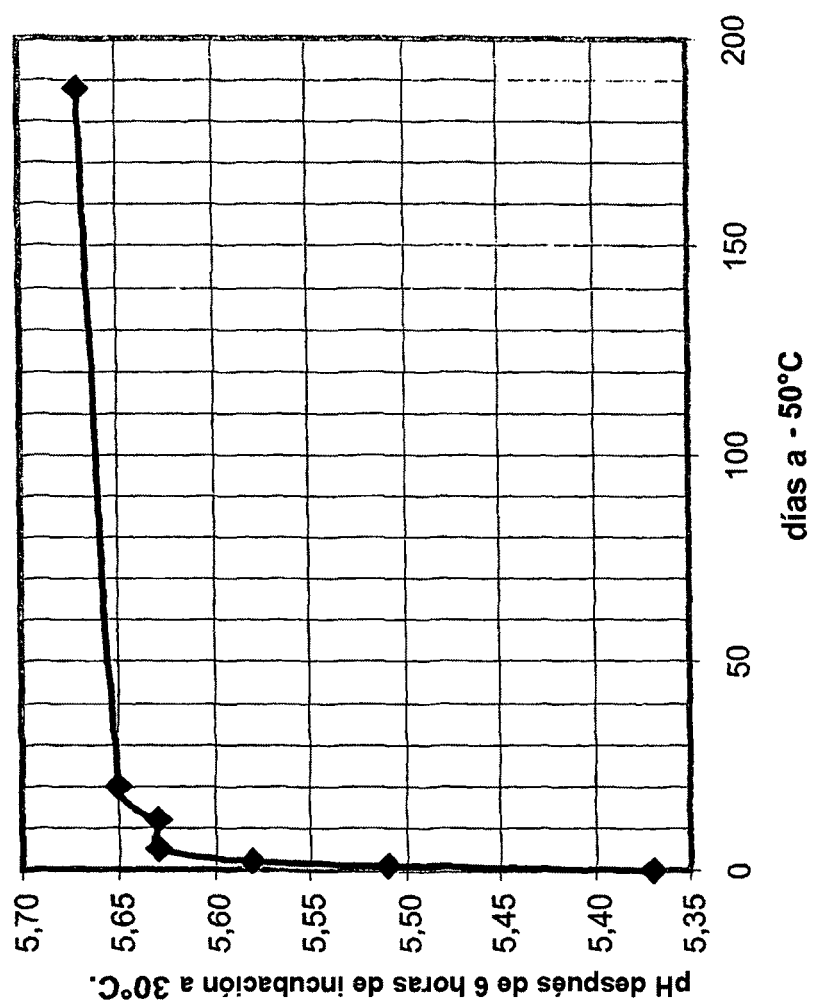


Fig. 1

Estabilidad de almacenamiento de cultivo concentrado congelado de CH-N 14. Con y sin 3% de IMP añadido

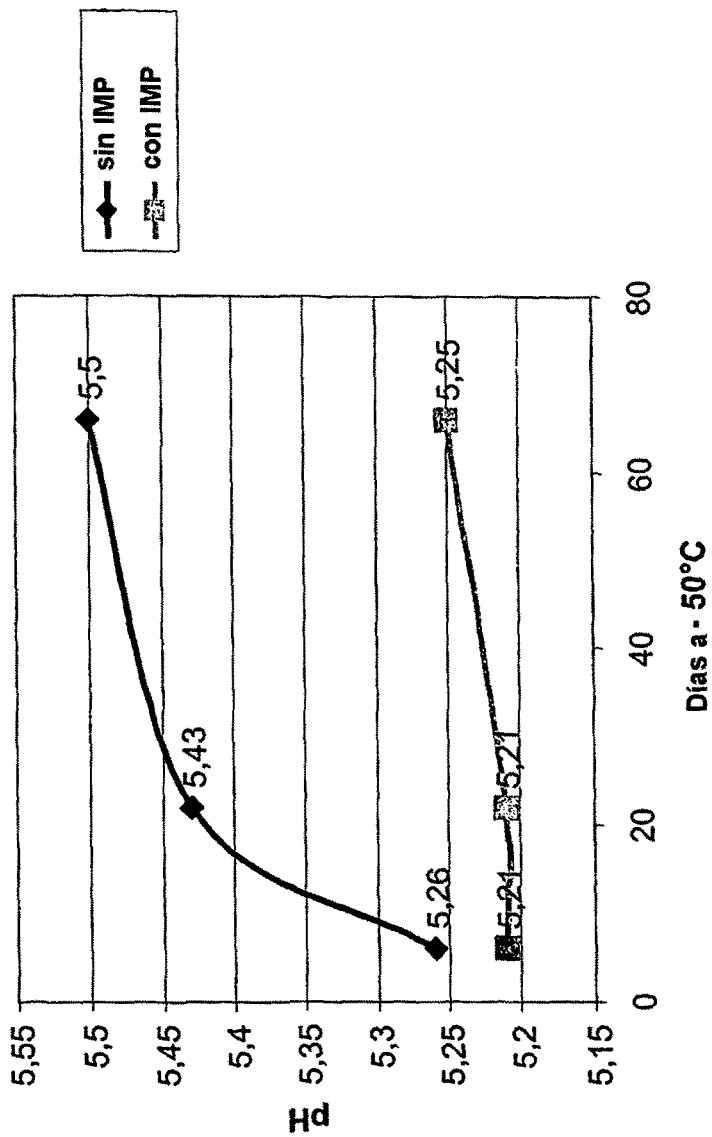


Fig. 2

F-DVS CH-N 14 con y sin IMP añadido. 2 meses de almacenamiento a - 60°C.
 Evaluado en NFSM (leche/queso) poco past. después de un perfil de Danbo

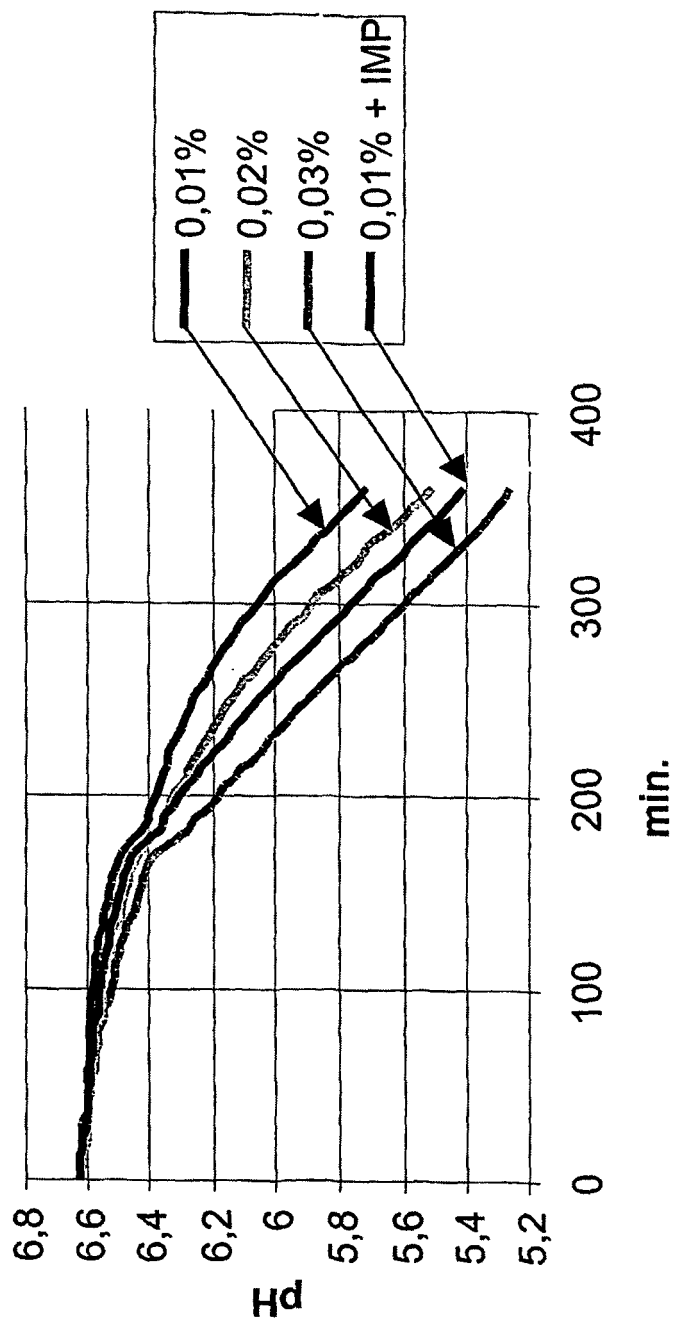


Fig. 3

Pérdida de actividad durante congelación de CH-N 19.
Evaluado para actividad en día 0.

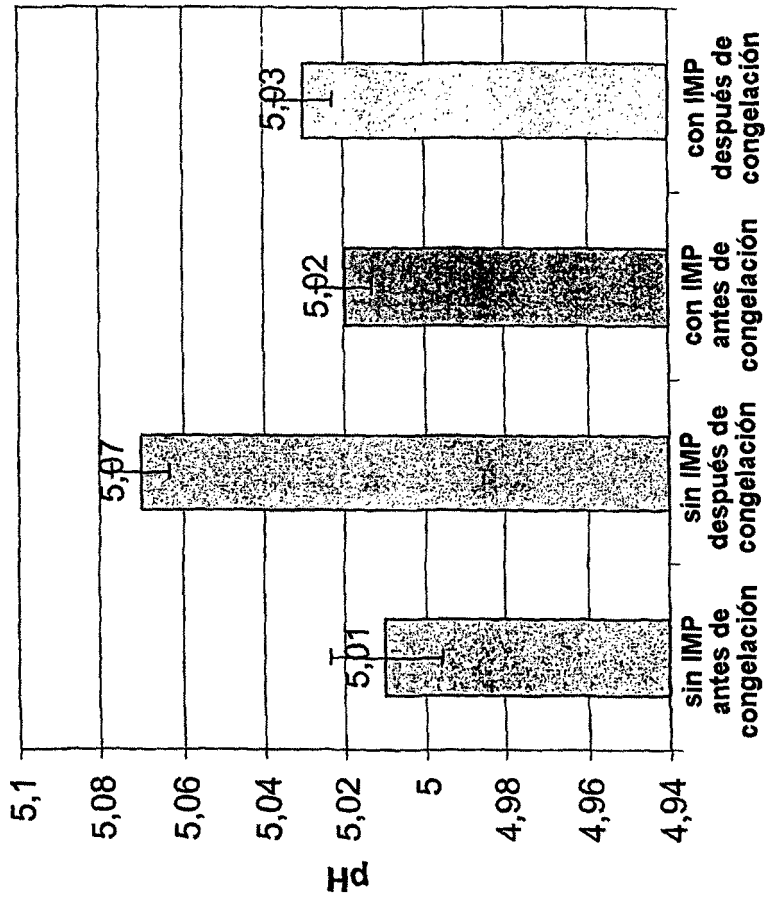


Fig. 4

Pérdida de actividad de acidificación de un cultivo de F-DVS Fl-Da N como una función de la cantidad de IMP añadida. Concentrado almacenado como líquido a 8°C durante 5 h antes de la congelación.

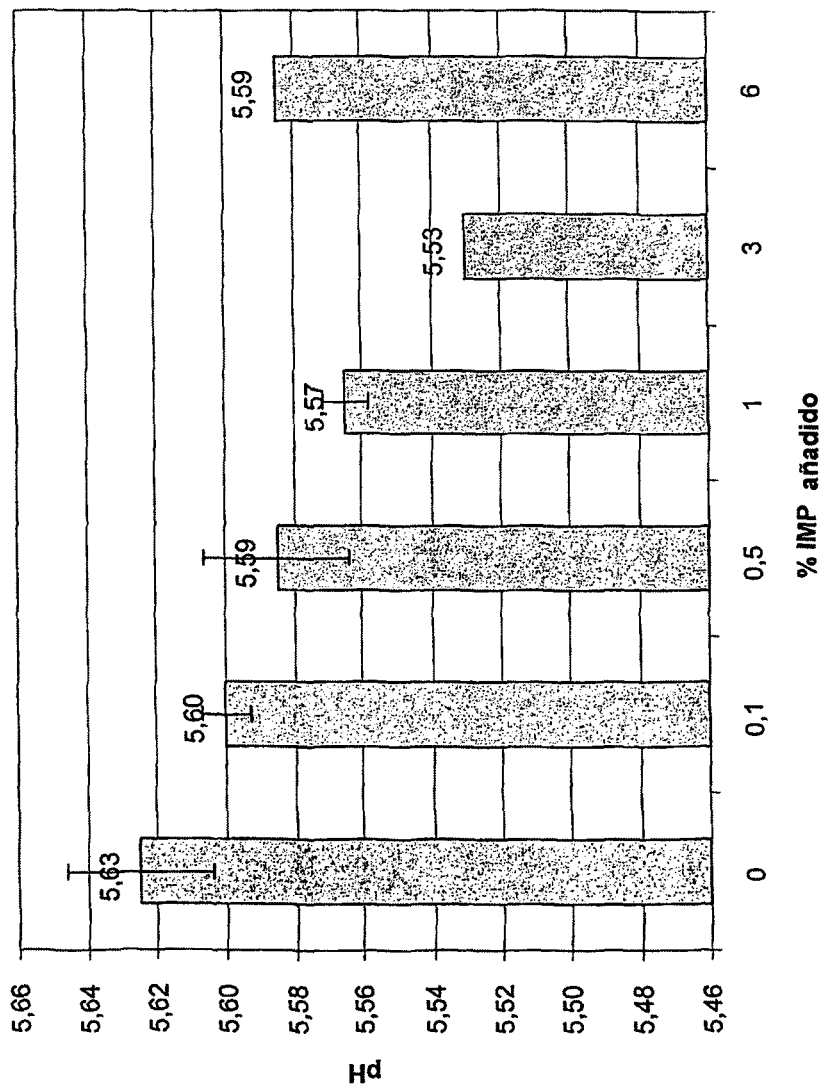


Fig. 5

DVS FI-Da N liofilizado.
Almacenado durante 7 días a -50°C

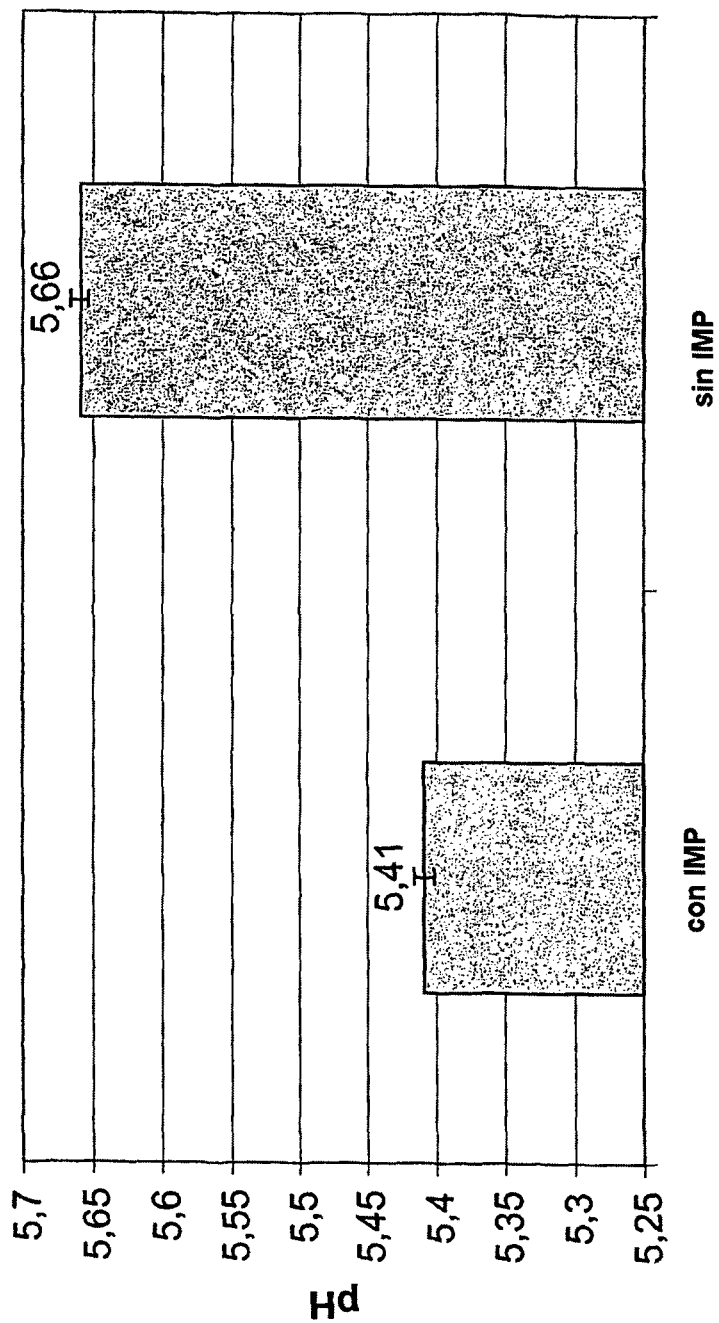


Fig. 6

Estabilidad de almacenamiento de F-DVS FI-Da N con o sin 3% de crioprotector añadido

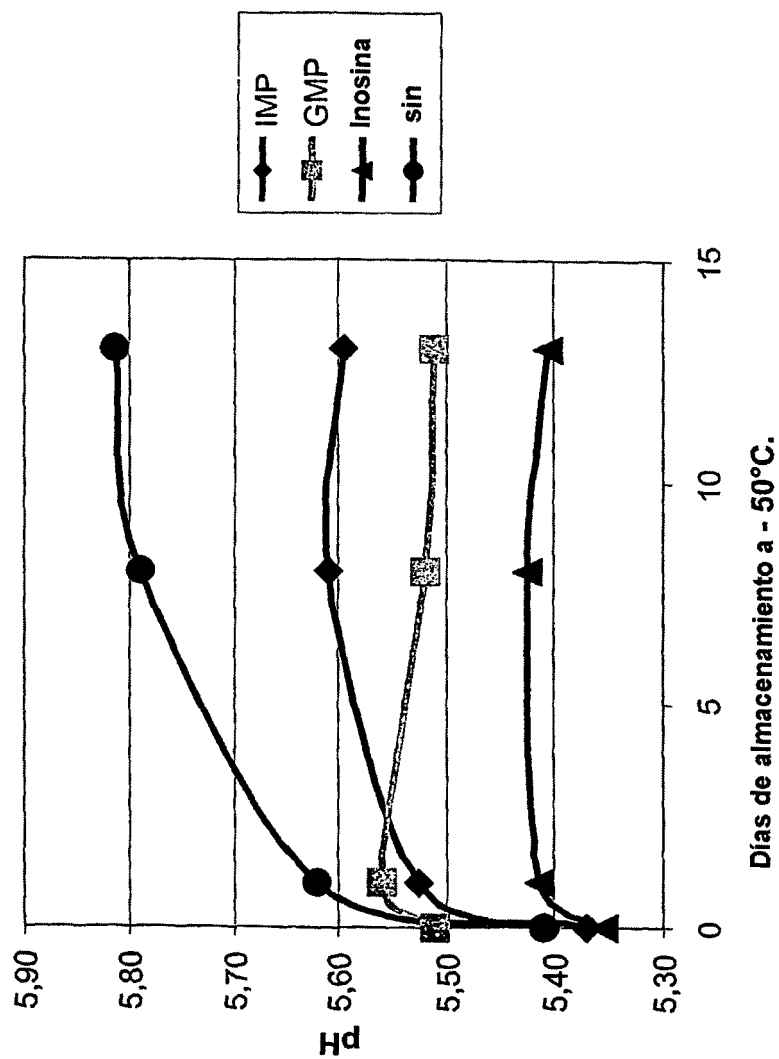


Fig. 7