

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 118**

51 Int. Cl.:

**A23C 9/123** (2006.01)

**A23C 9/127** (2006.01)

**A23C 13/16** (2006.01)

**A23C 17/02** (2006.01)

**A23C 19/032** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2018 PCT/EP2018/073382**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2019 WO19043115**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2018 E 18759640 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2024 EP 3675642**

54 Título: **Proceso de producción de un producto lácteo fermentado mesófilo**

30 Prioridad:

**30.08.2017 EP 17188549**

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

**01.04.2025**

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.00%)**

**Boege Allé 10-12**

**2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

**BLOC, VIRGINIE;**

**JANZEN, THOMAS;**

**BIRKELUND, MIMI;**

**JIMENEZ, LUCIANA;**

**ODINOT, JEAN-MARIE;**

**PIROIS-BLIN, SABRINA y**

**GULDAGER, HELLE SKOV**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 3 010 118 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**

Proceso de producción de un producto lácteo fermentado mesófilo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso de producción de un producto lácteo fermentado.

**Antecedentes de la invención**

10 Los productos lácteos fermentados mesófilos se producen a una temperatura de entre aproximadamente 22 °C y aproximadamente 35 °C, y normalmente se usan las bacterias acidolácticas mesófilas de los géneros *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. Entre los productos lácteos fermentados mesófilos se incluye suero de mantequilla, leche agria, leche cultivada, smetana, nata agria, Kéfir y queso fresco, tal como quark, tvarog y queso crema.

15 En el documento EP-A1-2 957 180 se desvela un método de producción de un producto lácteo fermentado utilizando bacterias lácticas deficientes en lactosa, en particular cepas de *Streptococcus thermophilus* deficientes en lactosa y cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. En el documento US-A1-2017/135360 se hace referencia a métodos de producción de productos lácteos fermentados que proporcionan un mejor control de la acidificación posterior, eliminando de este modo la necesidad de enfriar rápidamente el producto lácteo fermentado a un valor de pH predeterminado para finalizar la fermentación.

**Sumario de la invención**

25 El objeto de la presente invención es proporcionar un proceso de producción mejorado de un producto lácteo fermentado mesófilo.

El objeto de la presente invención se obtiene mediante un proceso de producción de un producto lácteo fermentado que comprende las etapas de

- 30
- 1) añadir un cultivo iniciador de bacterias acidolácticas que comprende al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa, que es capaz de metabolizar un hidrato de carbono sin lactosa, y al menos una cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa, que es capaz de metabolizar el hidrato de carbono sin lactosa, a una base láctea, y
  - 35 2) fermentar la leche durante un periodo de tiempo hasta alcanzar un pH específico para obtener un producto lácteo fermentado,

en donde al inicio de la etapa de fermentación, a la base láctea se le añade el hidrato de carbono sin lactosa.

40 Las bacterias acidolácticas deficientes en lactosa crecen normalmente en una fuente de hidratos de carbono sin lactosa, tal como sacarosa, galactosa y glucosa, que se añaden a la leche en una cantidad medida para detener el proceso de fermentación y el crecimiento de las bacterias acidolácticas por agotamiento de la fuente de hidratos de carbono añadida. Por la presente, la post-acidificación durante el almacenamiento posterior se reduce considerablemente o incluso se impide totalmente.

45 La presente invención se basa en el reconocimiento de que es posible reducir o evitar la post-acidificación durante el almacenamiento en un producto lácteo fermentado mesófilo utilizando una combinación de una cepa de *Lactococcus lactis* mesófila deficiente en lactosa, y una cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa.

50 La presente invención se basa además en el hallazgo experimental de que el uso de dicha combinación de cepas también tiene diversas ventajas en la producción del producto lácteo fermentado mesófilo. En primer lugar, en el proceso de producción de un producto lácteo fermentado mesófilo, el uso de dicha combinación de cepas permite omitir la etapa de enfriamiento del producto lácteo fermentado después de la fermentación y antes de introducirlo en vasos para el consumidor final. Por tanto, dado que la post-acidificación es nula o escasa tras la finalización de la fermentación debido al agotamiento de la fuente de crecimiento de hidratos de carbono, no es necesario el enfriamiento para reducir la post-acidificación. En segundo lugar, sorprendentemente se ha descubierto que dicha combinación de cepas produce una mejor textura del producto lácteo fermentado mesófilo en comparación con una mezcla de cultivos correspondiente que comprende cepas positivas a la lactosa.

60 **Figuras**

La Fig. 1 muestra los perfiles de acidificación de los cultivos C1-C4 a 34 °C.

La Fig. 2 muestra los perfiles de acidificación de los cultivos C1-C4 a 30 °C.

La Fig. 3 muestra el perfil de acidificación del cultivo C5 a 34 °C.

65 La Fig. 4 muestra el perfil de acidificación del cultivo C6 a 34 °C.

La Fig. 5 muestra los perfiles de acidificación de las mezclas de cultivo LC5 + ST1 y LC7 + ST1 a 30 °C.

La Fig. 6 muestra los perfiles de acidificación de las mezclas de cultivo LACcr1 + ST1 y LACcr2 + ST1 a 30 °C.  
 La Fig. 7 muestra los perfiles de acidificación de las mezclas de cultivo C1- C4 y la referencia a 30 °C.  
 La Fig. 8 muestra los perfiles de acidificación de las mezclas de cultivo C1- C4 y la referencia a 35 °C.  
 La Fig. 9 muestra los perfiles de acidificación de C1-C3 y de la referencia a 30 °C.  
 La Fig. 10 muestra los perfiles de acidificación de C1-C3 y de la referencia a 35 °C

**Divulgación detallada de la invención**

**Bacterias acidolácticas deficientes en lactosa**

Las expresiones "deficiencia en el metabolismo de la lactosa" y "deficiente en lactosa" se utilizan en el contexto de la presente invención para caracterizar a las BAL (bacterias acidolácticas) que han perdido parcial o totalmente la capacidad de usar la lactosa como fuente para el crecimiento celular o el mantenimiento de la viabilidad celular. Las respectivas BAL son capaces de metabolizar uno o varios hidratos de carbono seleccionados de sacarosa, galactosa y/o glucosa u otro hidrato de carbono fermentable. Dado que estos hidratos de carbono no están presentes de forma natural en la leche en cantidades suficientes para favorecer la fermentación por parte de los mutantes deficientes en lactosa, es necesario añadir estos hidratos de carbono a la leche. Las BAL deficientes y parcialmente deficientes en lactosa pueden caracterizarse como colonias blancas en un medio que contiene lactosa y X-Gal.

En una realización particular de la invención, la cepa deficiente en lactosa es capaz de metabolizar un hidrato de carbono sin lactosa seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, galactosa y glucosa, preferentemente sacarosa. En una realización particular de la invención, la cepa deficiente en lactosa es capaz de metabolizar la galactosa.

En una realización particular de la invención, la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* deficiente en lactosa es positiva a la sacarosa.

En una realización particular de la invención, la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* deficiente en lactosa es positiva a la glucosa.

En una realización particular de la invención, la cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) la cepa depositada en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (colección alemana de microorganismos y cultivos celulares GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el número de registro DSM 28952;
- (b) la cepa depositada en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el número de registro DSM 28953;
- (c) la cepa depositada en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 22-08-2017 con el número de registro DSM 32599; y
- (d) la cepa depositada en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 22-08-2017 con el número de registro DSM 32600.

En una realización particular de la invención, la cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) la cepa depositada en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el número de registro DSM 28952; y
- (b) la cepa depositada en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el número de registro DSM 28953.

En una realización particular de la invención, la cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa se selecciona del grupo que consiste en:

- (c) la cepa depositada en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 22-08-2017 con el número de registro DSM 32599; y
- (d) la cepa depositada en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 22-08-2017 con el número de registro DSM 32600; y.

En una realización particular de la invención, la cepa de *Lactococcus lactis* se selecciona del grupo que consiste en una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

En una realización particular de la invención, la cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa se selecciona del grupo que consiste en

- 1) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32398,
- 2) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 18882,

## ES 3 010 118 T3

- 3) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32399,  
4) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 18893,  
5) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32601,  
6) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32602,  
5 7) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32603,  
8) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32604,  
9) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32605,  
10) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32829,  
11) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32830, y  
10 12) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32832.

En una realización particular de la invención, la cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa se selecciona del grupo que consiste en

- 15 1) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32398,  
2) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 18882,  
3) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32399,  
4) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 18893,  
5) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32829, y  
20 6) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32830.

Las cepas 1) a 6) anteriores son positivas a la glucosa y negativas a la sacarosa.

En una realización particular de la invención, la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* deficiente en lactosa se selecciona del grupo que consiste en

- 25 1) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32398,  
2) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 18882,  
3) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 18893,  
30 4) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32829, y  
5) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32830.

En una realización particular de la invención, la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* deficiente en lactosa se selecciona del grupo que consiste en

- 35 1) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32399.

En una realización particular de la invención, la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* deficiente en lactosa se selecciona del grupo que consiste en

- 40 1) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32601,  
2) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32602,  
3) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32603,  
4) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32604,  
45 5) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32605, y  
6) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32832.

Las cepas 1) a 6) anteriores son negativas a la glucosa y positivas a la sacarosa. Dichas cepas 1) a 6) se prefieren porque cuando se utilizan en el proceso de la invención producen productos lácteos fermentados con mayor suavidad.

### 50 **Etapas del proceso de la invención**

En una realización particular de la invención, las cepas deficientes en lactosa son capaces de metabolizar un hidrato de carbono sin lactosa seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, galactosa y glucosa, preferentemente sacarosa.

En una realización particular de la invención, el hidrato de carbono sin lactosa se añade a la base láctea al inicio de la fase de fermentación.

60 En una realización particular de la invención, la etapa de fermentación finaliza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en 1) acidificación de la leche fermentada que hace que al menos una cepa del cultivo iniciador no pueda crecer, 2) tratamiento de enfriamiento y 3) agotamiento del hidrato de carbono sin lactosa.

65 Preferentemente, el hidrato de carbono sin lactosa se añade a la base láctea en una cantidad medida para que se agote y, por tanto, detenga el crecimiento de las bacterias acidolácticas y la fermentación. Preferentemente, el hidrato de carbono sin lactosa se añade a la base láctea en una cantidad medida para que se agote al pH específico y, por

tanto, detenga el crecimiento de las bacterias acidolácticas y la fermentación.

La cantidad de hidratos de carbono sin lactosa que debe añadirse a la base láctea depende de diversos parámetros, entre los que se incluyen, las cepas de bacterias acidolácticas utilizadas en el cultivo iniciador, la composición de la base láctea, la temperatura de fermentación y el pH específico deseado. La cantidad de hidratos de carbono sin lactosa que debe añadirse a la base láctea puede determinarse experimentalmente, y un experto en la materia puede realizar este tipo de experimentos.

En una realización en particular de la invención, el pH específico está comprendido entre 3,2 y 4,8, más preferentemente entre 4,0 y 5,2, más preferentemente entre 4,2 y 5,0 y lo más preferentemente entre 4,4 y 4,8.

En una realización particular de la invención, la temperatura de fermentación está comprendida entre 15 °C y 35 °C, preferentemente entre 24 °C y 35 °C, más preferentemente entre 26 °C y 35 °C, más preferentemente entre 28 °C y 35 °C, y más preferentemente entre 30 °C y 34 °C.

En una realización en particular de la invención, el producto lácteo fermentado no se somete a una etapa de enfriamiento después de finalizar la etapa de fermentación y antes del envasado.

En una realización particular de la invención, el producto lácteo fermentado se envasa a una temperatura comprendida entre 15 y 45 °C.

En una realización particular de la invención, el valor del pH del producto lácteo fermentado se mantiene dentro de un intervalo de 0,3 unidades de pH, preferentemente dentro de un intervalo de 0,2 unidades de pH y lo más preferentemente dentro de un intervalo de 0,1 unidades de pH, cuando se almacena después de finalizar la fermentación a la temperatura utilizada para la fermentación durante un período de 20 horas.

En una realización particular de la invención, la cantidad de hidrato de carbono sin lactosa añadida es de 1 mg/g a 30 mg/g, preferentemente de 2 mg/g a 20 mg/g, y más preferentemente de 3 mg/g a 10 mg/g de base láctea.

En una realización particular de la invención, la cantidad de hidrato de carbono sin lactosa añadida es del 0,1 % al 10 %, preferentemente del 0,2 % al 8 %, preferentemente del 0,3 % al 2 %, preferentemente del 0,4 % al 1,5 %, y más preferentemente del 0,5 % al 1,2 %, en donde el % es (p/p) sobre la base láctea.

En una realización particular de la invención, el cultivo iniciador contiene, además, una o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc spp.* y *Bifidobacterium spp.* Además, el cultivo iniciador puede contener una levadura. En una realización particular de la invención, la *Leuconostoc spp.* se selecciona del grupo que consiste en *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*. En una realización particular de la invención, la *Bifidobacterium spp.* se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium infantis*.

En una realización preferida de la invención, la base láctea al inicio de la etapa de fermentación tiene un contenido de lactosa de entre 30,0 mg/ml y 70 mg/ml, preferentemente entre 35 mg/ml y 65 mg/ml, más preferentemente entre 40 mg/ml y 60 mg/ml, y lo más preferentemente entre 50 mg/ml y 60 mg/ml.

### **Producto lácteo fermentado**

La presente invención se refiere además a un producto lácteo fermentado producido mediante el proceso de la presente invención.

En la invención, el producto lácteo fermentado es un producto elaborado mediante el proceso de la invención, que se produce utilizando un cultivo iniciador de una cepa de bacteria acidoláctica que comprende al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa y al menos una cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa.

En una realización particular de la invención, el producto lácteo fermentado se selecciona del grupo que consiste en suero de mantequilla, leche agria, leche cultivada, Smetana, nata agria, nata espesa, nata cultivada, ymer, lactosuero fermentado, Kéfir y queso fresco, tal como Quark, tvarog y queso crema. En particular, el producto lácteo fermentado se selecciona del grupo que consiste en Quark, nata agria y Kéfir.

En una realización preferida de la invención, el producto lácteo fermentado contiene un producto alimenticio adicional seleccionado del grupo que consiste en una bebida de fruta, productos de cereales, productos de cereales fermentados, productos cereales acidificados químicamente, productos lácteos de soja, productos de leche de soja fermentada y cualquier mezcla de los mismos.

El producto lácteo fermentado contiene normalmente proteínas en un nivel comprendido entre el 1,0 % en peso y el

12,0 % en peso, preferentemente entre el 2,0 % en peso y el 10,0 % en peso. En una realización particular, la nata agria contiene proteínas en un nivel comprendido entre el 1,0 % en peso y el 5,0 % en peso, preferentemente entre el 2,0 % en peso y el 4,0 % en peso. En una realización particular, el Quark contiene proteínas en un nivel comprendido entre el 4,0 % en peso y el 12,0 % en peso, preferentemente entre el 5,0 % en peso y el 10,0 % en peso.

5

**Composición de la invención**

La presente invención se refiere además a una composición de bacterias acidolácticas que comprende al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa y al menos una cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa.

10

En una realización particular, la composición contiene al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa y una cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa. En una realización particular, la composición contiene una cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa y al menos una cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa.

15

En una realización particular, la composición contiene dos o más cepas de *Streptococcus thermophilus* deficientes en lactosa y al menos una cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa. En una realización particular, la composición contiene al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa y dos o más cepas de *Lactococcus lactis* deficientes en lactosa.

20

En una realización particular, la composición contiene dos o más cepas de *Streptococcus thermophilus* deficientes en lactosa y una cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa. En una realización particular, la composición contiene una cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa y dos o más cepas de *Lactococcus lactis* deficientes en lactosa.

25

En una realización particular, la composición contiene dos cepas de *Streptococcus thermophilus* deficientes en lactosa y una cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa. En una realización particular, la composición contiene una cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa y dos cepas de *Lactococcus lactis* deficientes en lactosa.

30

En una realización particular de la invención, la composición contiene la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32398, y la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 18882.

35

En una realización particular de la invención, la composición contiene la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32398, y la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 18893.

40

**Uso de la invención**

La presente invención se refiere además a su uso en un proceso de producción de un producto lácteo fermentado que comprende las etapas de

40

- 1) añadir un cultivo iniciador de una cepa de bacterias acidolácticas a una base láctea, y
- 2) fermentar la leche durante un periodo de tiempo hasta alcanzar un pH específico para obtener un producto lácteo fermentado,

45

de un cultivo iniciador que comprenda al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa, que es capaz de metabolizar un hidrato de carbono sin lactosa, y al menos una cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa, que es capaz de metabolizar un hidrato de carbono sin lactosa.

50

Una realización particular del uso de la invención está dirigida al uso para aumentar la textura medida como tensión de cizallamiento o firmeza (consistencia) del gel del producto lácteo fermentado en comparación con el uso de un cultivo iniciador que comprende al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* positiva a la lactosa, capaz de metabolizar la lactosa, y al menos una cepa de *Lactococcus lactis* positiva a la lactosa, que es capaz de metabolizar la lactosa.

55

**Definiciones**

En relación con la presente invención se aplican las siguientes definiciones:

60

La expresión "bacteria acidoláctica" ("BAL") designa una bacteria grampositiva, microaerófila o anaerobia, que fermenta azúcares con producción de ácidos, incluido el ácido láctico como ácido predominantemente producido, ácido acético y ácido propiónico. Las bacterias acidolácticas de mayor utilidad industrial incluyen se encuentran en el orden "*Lactobacillales*", que incluye *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pseudoleuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Enterococcus spp.* y *Propionibacterium spp.* Se utilizan frecuentemente como cultivos alimentarios solos o junto con otras bacterias acidolácticas.

65

- Las bacterias acidolácticas, incluidas la bacterias de las especies *Lactobacillus sp.* y *Lactococcus sp.*, se suministran normalmente a la industria láctea en forma de cultivos congelados o liofilizados para la propagación de iniciadores a granel o como cultivos denominados de adición directa (DVS, iniciales de *direct vat set*), destinados a la inoculación directa en un recipiente o cuba de fermentación para la producción de un producto lácteo, tal como un producto lácteo fermentado o un queso. Dichos cultivos de bacterias acidolácticas se denominan en general "cultivos iniciadores" o "iniciadores". Normalmente, un cultivo iniciador para yogur comprende *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, y en la mayoría de los países un yogur se define por la legislación como un producto lácteo fermentado producido utilizando un cultivo iniciador que comprende las dos cepas mencionadas.
- 5
- 10 El término "leche" debe entenderse como la secreción láctea obtenida mediante el ordeño de cualquier mamífero, tal como una vaca, oveja, cabra, búfala o camella. En una realización preferida, la leche es de vaca. El término leche también incluye soluciones de proteínas/grasas de origen vegetal, p. ej. leche de soja.
- 15 La expresión "base láctea" puede ser cualquier material lácteo crudo y/o procesado que pueda someterse a fermentación de acuerdo con el método de la invención. Por tanto, como bases lácteas útiles se incluyen, pero sin limitación, soluciones/suspensiones de cualquier producto lácteo o similar que comprenda proteínas, tal como leche entera o baja en grasa, leche desnatada, suero de mantequilla, leche en polvo reconstituida, leche condensada, leche en polvo, lactosuero, filtrado de lactosuero, lactosa, licor madre procedente de la cristalización de la lactosa, concentrado de proteína de lactosuero, o nata. Evidentemente, la base láctea puede proceder de cualquier mamífero, siendo, p. ej., leche de mamífero sustancialmente pura, o leche en polvo reconstituida.
- 20 Antes de la fermentación, la base láctea puede homogeneizarse y pasteurizarse de acuerdo con métodos conocidos en la materia.
- 25 "Homogeneización", como se utiliza en el presente documento, significa mezclar intensamente para obtener una suspensión o emulsión soluble. Si la homogeneización se realiza antes de la fermentación, ésta puede realizarse para romper la grasa de la leche en tamaños más pequeños, de modo que ya no se separe de la leche. Esto puede lograrse haciendo pasar la leche a alta presión a través de pequeños orificios.
- 30 "Pasteurización", como se utiliza en el presente documento, significa el tratamiento de la base láctea para reducir o eliminar la presencia de organismos vivos, tales como microorganismos. Preferentemente, la pasteurización se consigue manteniendo una temperatura específica durante un periodo de tiempo específico. La temperatura específica suele alcanzarse por calentamiento. La temperatura y la duración pueden seleccionarse para destruir o inactivar determinadas bacterias, tales como bacterias dañinas. Puede seguir una fase de enfriamiento rápido.
- 35 En los métodos de la presente invención, "fermentación" significa la conversión de hidratos de carbono en alcoholes o ácidos mediante la acción de un microorganismo. Preferentemente, en los métodos de la invención, la fermentación comprende la conversión de lactosa en ácido láctico.
- 40 Los procesos de fermentación que se utilizan en la producción de productos lácteos son muy conocidos y el experto en la materia sabrá cómo seleccionar las condiciones del proceso adecuadas, tales como temperatura, oxígeno, cantidad y características del microorganismo o microorganismos y tiempo del proceso. Evidentemente, las condiciones de fermentación se seleccionan de modo que favorezcan la consecución de la presente invención, es decir, obtener un producto lácteo en forma sólida (tal como un queso) o líquida (tal como un producto lácteo fermentado).
- 45 La expresión "producto lácteo fermentado" significa un producto alimenticio o un pienso en donde la preparación del producto alimenticio o del pienso implica la fermentación de una base láctea con una bacteria acidoláctica. "Producto lácteo fermentado", como se utiliza en el presente documento, incluye, pero sin limitación, productos tales como productos lácteos fermentados termófilos, p. ej., yogur, productos lácteos fermentados mesófilos, p. ej., nata agria y suero de mantequilla, así como lactosuero fermentado.
- 50 En el presente documento, el término "termófilo" se refiere a microorganismos que prosperan mejor a temperaturas superiores a 35 °C. Las bacterias termófilas de mayor utilidad industrial incluyen *Streptococcus spp.* y *Lactobacillus spp.* En el presente documento, la expresión "fermentación termófila" se refiere a la fermentación a una temperatura superior a aproximadamente 35 °C, tal como entre aproximadamente 35 °C a aproximadamente 45 °C. La expresión "producto lácteo fermentado termófilo" se refiere a productos lácteos fermentados preparados por fermentación termófila de un cultivo iniciador termófilo e incluye productos lácteos fermentados tales como yogur cuajado, yogur batido y yogur para beber, p. ej., Yakult.
- 60 En el presente documento, el término "mesófilo" se refiere a microorganismos que prosperan mejor a temperaturas moderadas (15 °C-35 °C). Las bacterias mesófilas de mayor utilidad industrial incluyen *Lactococcus spp.* y *Leuconostoc spp.* En el presente documento, la expresión "fermentación mesófila" se refiere a la fermentación a una temperatura entre aproximadamente 22 °C y aproximadamente 35 °C. La expresión "producto lácteo fermentado mesófilo" se refiere a productos lácteos fermentados preparados por fermentación mesófila de un cultivo iniciador mesófilo e incluye productos lácteos fermentados tales como suero de mantequilla, leche agria, leche cultivada,
- 65

Smetana, nata agria, nata espesa, nata cultivada, ymer, lactosuero fermentado, Kéfir, Yakult y queso fresco, tal como Quark, tvarog y queso crema.

En relación con la presente invención, la "tensión de cizallamiento" puede medirse con el siguiente método:

5 Siete días después de la producción, el producto lácteo fermentado se llevó a 13 °C y se agitó cuidadosamente a mano con una cuchara (5 veces) hasta la homogeneidad de la muestra. Las propiedades reológicas de la muestra se evaluaron en un reómetro (Anton Paar Physica Rheometer con ASC, Automatic Sample Changer, Anton Paar® GmbH, Austria) utilizando un *bob-cup*. El reómetro se ajustó a una temperatura constante de 13 °C durante el tiempo de medición. Los ajustes eran los siguientes:

Tiempo de espera (para reconstruir algo la estructura original)

15 5 minutos sin ningún esfuerzo físico (oscilación o rotación) aplicado a la muestra. Etapa de oscilación (para medir el módulo elástico y viscoso,  $G'$  y  $G''$ , respectivamente, calculando así el módulo complejo  $G^*$ )

Esfuerzo constante = 0,3 %, frecuencia ( $f$ ) = [0,5...8] Hz

6 puntos de medición durante 60 s (uno cada 10 s)

20 Etapa de rotación (para medir la tensión de cizallamiento a 300 1/s)

Se diseñaron dos etapas:

25 Velocidad de cizallamiento = [0,3-300] 1/s y 2) Velocidad de cizallamiento = [275-0,3] 1/s.

Cada etapa contenía 21 puntos de medición durante 210 s (cada 10 s).

30 La tensión de cizallamiento a 300 1/s se eligió para el análisis posterior, ya que se correlaciona con el espesor que produce en boca al deglutir un producto lácteo fermentado.

En relación con la presente invención, la "firmeza del gel" puede medirse con el siguiente método:

35 La firmeza del gel se mide mediante una prueba de retroextrusión con un analizador de textura (TA.XT Plus, Stable Micro System, Surrey, UK) suministrado con una placa paralela de 35 mm. La distancia de desplazamiento se fija en 15 mm y la velocidad de desplazamiento en 2 mm/s. La prueba se realiza a los 7 días de la producción. El producto lácteo fermentado se llevó a 13 °C, se agitó cuidadosamente a mano y se midió en un recipiente de plástico de 250 g. La fuerza máxima (N o g) obtenida por las curvas de fuerza frente a distancia se utiliza como parámetro de "firmeza del gel", la superficie positiva (N\*mm) como grado de deformación, la fuerza negativa máxima (N) como viscosidad.

40 En el presente documento, la expresión "lactasa estable a pH bajo" se refiere a una lactasa, que conserva su actividad a un pH de 5,0 y a una temperatura de 37 °C a un nivel de al menos el 5 % en comparación con su actividad al pH óptimo de la lactasa.

45 La expresión "actividad al pH óptimo" significa la actividad de la lactasa al pH, donde la lactasa tiene su actividad óptima.

50 La expresión "hidrato de carbono sin lactosa" significa cualquier hidrato de carbono, que no es lactosa, y que una bacteria acidoláctica deficiente en lactosa utilizada en el proceso de la invención es capaz de metabolizar.

El término "agotamiento", en relación con los hidratos de carbono sin lactosa, significa que la concentración de los hidratos de carbono sin lactosa es cero o tan baja que el cultivo iniciador ya no es capaz de crecer.

55 La expresión "al inicio de la etapa de fermentación" significa justo antes, al mismo tiempo o justo después, de la adición del cultivo iniciador a la base láctea. En este caso, el término "justo" significa menos de 30 minutos".

La expresión "durante la etapa de fermentación" significa en cualquier momento durante la fermentación después del inicio y antes del final de la fermentación.

60 La expresión "al final de la etapa de fermentación" significa justo antes, al mismo tiempo o justo después de alcanzar el pH específico. En este caso, el término "justo" significa menos de 30 minutos".

65 La expresión "pH específico" significa el pH en el que finaliza la etapa de fermentación. En función de diversos parámetros del proceso, la etapa de fermentación finaliza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en 1) acidificación de la leche fermentada que hace que al menos una cepa del cultivo iniciador no pueda crecer, 2) tratamiento de enfriamiento y 3) agotamiento del hidrato de carbono sin lactosa.

En el presente contexto, la expresión "cepa mutante" debe entenderse como cepas derivadas, o cepas que pueden derivar, de una cepa (o de su cepa madre) de la invención, p. ej., mediante genomodificación, radiación y/o tratamiento químico. Las "cepas derivadas de las mismas" también pueden ser mutantes espontáneos. Se prefiere que las "cepas derivadas de las mismas" sean mutantes funcionalmente equivalentes, p. ej. mutantes que tienen propiedades sustancialmente iguales o mejoradas que su cepa madre. Especialmente, la expresión "cepas mutantes" se refiere a cepas obtenidas sometiendo una cepa de la invención a cualquier tratamiento de mutagenización utilizado convencionalmente, incluido el tratamiento con un mutágeno químico tal como etano metano sulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV, o a un mutante espontáneo. Un mutante puede haberse sometido a varios tratamientos de mutagenización (un único tratamiento debe entenderse como una etapa de mutagenización seguida de una etapa de cribado/selección), pero actualmente se prefiere que no se lleven a cabo más de 20 o no más de 10 o no más de 5 tratamientos (o etapas de cribado/selección). En un mutante actualmente preferido menos del 1 %, menos del 0,1 %, menos del 0,01 %, menos del 0,001 % o incluso menos del 0,0001 % de los nucleótidos del genoma bacteriano se han deleciónado o sustituido por otro nucleótido, en comparación con la cepa madre.

#### DEPÓSITOS Y SOLUCIÓN DEL EXPERTO

El Solicitante pide que sólo se ponga una muestra del microorganismo depositado a disposición de un experto aprobado por el Solicitante.

La cepa de *Streptococcus thermophilus* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el número de registro DSM 28952.

La cepa de *Streptococcus thermophilus* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el número de registro DSM 28953.

La cepa de *Streptococcus thermophilus* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 22-08-2017 con el número de registro DSM 32599.

La cepa de *Streptococcus thermophilus* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 22-08-2017 con el número de registro DSM 32600.

La cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 06-12-2016 con el número de registro DSM 32398.

La cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 19-12-2006 con el número de registro DSM 18882.

La cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 19-12-2006 con el número de registro DSM 18893.

La cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 06-12-2016 con el número de registro DSM 32399.

La cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 22-08-2017 con el número de registro DSM 32601.

La cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 22-08-2017 con el número de registro DSM 32602.

La cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 22-08-2017 con el número de registro DSM 32603.

La cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 22-08-2017 con el número de registro DSM 32604.

La cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 22-08-2017 con el número de registro DSM 32605.

La cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 05-06-2018 con el número de registro DSM 32829.

La cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 05-06-2018 con el número de registro DSM 32830.

La cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se depositó en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 05-06-2018 con el número de registro DSM 32832.

Los depósitos se realizaron de conformidad con el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del

depósito de microorganismos a efectos del procedimiento de patentes.

### Ejemplos

#### 5 **EJEMPLO 1**

*Producción de nata agria agitada utilizando sacarosa como fuente de hidrato de carbono y un cultivo que consiste en una S. thermophilus (ST) deficiente en lactosa y una o dos L. lactis subsp. cremoris (CR) deficientes en lactosa*

#### 10 **Cepas**

ST1: *Streptococcus thermophilus* DSM 28952  
 CR1: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 32398  
 CR7: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 18893

15

#### **Composiciones de cultivo**

Tabla 1

	ST1 (%)	CR1 (%)	CR7 (%)
M1	72,2	27,8	0,0
M2	72,2	13,9	13,9

20 Como base de comparación se utilizó un cultivo de referencia que contenía una cepa convencional de *Streptococcus thermophilus* positiva a la lactosa y una cepa convencional de *Lactococcus lactis* positiva a la lactosa.

#### **Base láctea**

25 La base láctea del cultivo de referencia contenía 3,5 % de proteínas y 15 % de grasa. La base láctea de los cultivos de la invención contenía 3,2 % de proteínas y 15 % de grasa.

Tabla 2: Composición de la base láctea

	Base láctea de la invención (%)	Base láctea de referencia (%)
Leche	50,74	50,63
Nata	46,87	46,87
Leche desnatada en polvo	1,67	2,49
Azúcar (sacarosa)	0,71	0,0

#### 30 **Procedimiento**

La fermentación se llevó a cabo a temperaturas de 30 °C y 34 °C.

35 Las muestras de la nata agria agitada producida se introdujeron en vasos, se conservaron a 6 °C y el pH se midió al final de la fermentación y los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 después de finalizar la fermentación.

La muestra de referencia se enfrió a 16 °C antes de introducirla en los vasos.

40 Las muestras producidas de acuerdo con la invención no se enfriaron antes de introducirlas en vasos.

#### **Mediciones**

Se midió la post-acidificación, la firmeza del gel y la tensión de cizallamiento.

45 Los niveles de grasa y proteínas se determinaron utilizando el análisis MilkoScan.

Prueba de compresión (correlacionada con la firmeza del gel en una cuchara, evaluada por un grupo de expertos (panel) entrenado con respecto a técnicas sensoriales)

50 Se realizó una prueba de retroextrusión para evaluar la firmeza del gel. Las muestras se templaron a 13 °C durante una hora antes de las mediciones de tensión de cizallamiento. Se agitaron con una cuchara para obtener una muestra homogénea, es decir, se agitaron cinco veces. La medición se realizó con el TA-XT plus, y el programa informático

## ES 3 010 118 T3

Texture Expert Exceed v6.1.9.0. Una sonda acrílica cilíndrica ( $\varnothing$  40 mm) se introdujo en el yogur a una profundidad de 15 mm con una velocidad de 2 mm/s y una fuerza de activación de 5 g. La superficie positiva se usó como medición de la firmeza.

### 5 *Tensión de cizallamiento*

Siete días después de la incubación, el producto lácteo fermentado se llevó a 13 °C y se agitó cuidadosamente a mano con una cuchara (5 veces) hasta la homogeneidad de la muestra. Las propiedades reológicas de la muestra se evaluaron en un reómetro (Anton Paar Physica Rheometer con ASC, Automatic Sample Changer, Anton Paar® GmbH, Austria) utilizando un *bob-cup*. El reómetro se ajustó a una temperatura constante de 13 °C durante el tiempo de medición. Los ajustes eran los siguientes:

15 Tiempo de espera (para reconstruir algo la estructura original)  
5 minutos sin ningún esfuerzo físico (oscilación o rotación) aplicado a la muestra. Etapa de oscilación (para medir el módulo elástico y viscoso,  $G'$  y  $G''$ , respectivamente, calculando así el módulo complejo  $G^*$ )  
Esfuerzo constante = 0,3 %, frecuencia ( $f$ ) = [0,5..8] Hz  
6 puntos de medición durante 60 s (uno cada 10 s)  
Etapa de rotación (para medir la tensión de cizallamiento a 300 1/s)

20 Se diseñaron dos etapas:

1) Velocidad de cizallamiento = [0,3-300] 1/s y 2) Velocidad de cizallamiento = [275-0,3] 1/s.

25 Cada etapa contenía 21 puntos de medición durante 210 s (cada 10 s).

La tensión de cizallamiento a 300 1/s se eligió para el análisis posterior, ya que se correlaciona con el espesor que produce en boca al deglutir un producto lácteo fermentado.

### **Resultados**

30 *Post-acidificación*

Tabla 3

	Día 0 (pH final)	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42
Ref. a 30 °C	4,50	4,46	4,43	4,41	4,45	4,43	4,41
M1 a 30 °C	4,48	4,48	4,47	4,45	4,45	4,45	4,45
M2 a 30 °C	4,50	4,52	4,49	4,49	4,49	4,49	4,49
Ref. a 34 °C	4,50	4,48	4,42	4,40	4,40	4,39	4,40
M1 a 34 °C	4,45	4,44	4,44	4,42	4,37	4,37	4,40
M2 a 34 °C	4,50	4,52	4,44	4,44	4,42	4,42	4,42

35 Como se apreciará en los resultados de la Tabla 3, para las muestras fermentadas a 30 °C, la post-acidificación de las muestras producidas de acuerdo con el procedimiento de la invención fue inferior a la de la muestra de referencia. Para las muestras fermentadas a 34 °C, la post-acidificación de la muestra M2 producida de acuerdo con el procedimiento de la invención fue inferior a la de la muestra de referencia, mientras que la post-acidificación de la muestra M1 era del mismo nivel que el de la muestra de referencia.

40 *Firmeza del gel*

Tabla 4

	Superficie positiva (g.s)
Ref. a 30 °C	526,8
M1 a 30 °C	560,01
M2 a 30 °C	648,28
Ref. a 34 °C	510,58

## ES 3 010 118 T3

	Superficie positiva (g.s)
M1 a 34 °C	639,0
M2 a 34 °C	999,55

Como se apreciará en la Tabla 4, la firmeza del gel de las muestras producidas de acuerdo con el proceso de la invención aumentó significativamente en comparación con las muestras de referencia correspondientes.

### 5 *Tensión de cizallamiento*

Tabla 5

	Tensión de cizallamiento (Pa)
Ref. a 34 °C	148
M1 a 34 °C	156
M2 a 34 °C	170

10 Como se apreciará en la Tabla 5, la tensión de cizallamiento de las muestras producidas de acuerdo con el procedimiento de la invención aumentó significativamente en comparación con la muestra de referencia.

### *Sin enfriamiento antes de introducir en vasos*

15 Como se apreciará en los resultados anteriores, las muestras producidas de acuerdo con el proceso de la invención tenían un rendimiento superior con respecto a la post-acidificación y la textura en comparación con la muestra de referencia, aunque, a diferencia de las muestras de referencia, las muestras de la invención no se enfriaron antes de introducir las en vasos. Por tanto, los presentes resultados muestran que utilizando el procedimiento de la presente invención es posible omitir la etapa de enfriamiento de los productos lácteos fermentados antes de introducirlos en vasos para el consumidor final.

20

### **EJEMPLO 2**

25 *Producción de Quark utilizando sacarosa como fuente de hidrato de carbono y un cultivo que consiste en una S. thermophilus (ST) deficiente en lactosa y una o dos L. lactis subsp. cremoris (CR) deficientes en lactosa.*

25

El objeto de este experimento es la producción de Quark con un contenido específico de proteínas del 7,5 %. La base láctea consiste en leche pura con 3,2 % de proteínas y 0 % de grasa. Para su uso en los cultivos de la invención, a las bases lácteas se añade sacarosa. Para el cultivo de referencia no se añade sacarosa a la base láctea. Las cepas, las composiciones de cultivo, el procedimiento y las mediciones son los mismos que en el Ejemplo 1.

30

### **Resultados**

#### *Post-acidificación*

35

Tabla 6

	Día 0 (pH final)	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Ref. a 30 °C	4,55	4,37	4,35	4,30	4,28
M1 a 30 °C	4,53	4,50	4,50	4,50	4,50
M2 a 30 °C	4,55	4,51	4,51	4,50	4,50
Ref. a 34 °C	4,54	4,45	4,43	4,40	4,39
M1 a 34 °C	4,47	4,50	4,47	4,47	4,47
M2 a 34 °C	4,53	4,50	4,48	4,48	4,48

Como se apreciará en los resultados de la Tabla 6, la post-acidificación de las muestras producidas de acuerdo el procedimiento de la invención era inferior a la de las muestras de referencia correspondientes.

### 40 *Firmeza del gel*

Tabla 7

	Superficie positiva (g.s)
Ref. a 30 °C	264,12
M1 a 30 °C	283,21
M2 a 30 °C	415,88
Ref. a 34 °C	113,46
M1 a 34 °C	127,71
M2 a 34 °C	126,97

Como se apreciará en la Tabla 7, la firmeza del gel de las muestras producidas de acuerdo con el proceso de la invención aumentó significativamente en comparación con las muestras de referencia correspondientes.

5 **EJEMPLO 3**

*Producción de nata agria agitada utilizando glucosa como fuente de hidrato de carbono y un cultivo que consiste en una S. thermophilus (ST) deficiente en lactosa y una o dos L. lactis subsp. cremoris (CR) deficientes en lactosa*

10 En este experimento se utilizó glucosa como fuente de hidrato de carbono. Las temperaturas de fermentación fueron de 30 °C y 35 °C. El procedimiento y las mediciones fueron los mismos que en el Ejemplo 1.

**Cepas**

- 15 ST1: *Streptococcus thermophilus* DSM 28952  
 CR1: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 32398  
 CR2: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 18882  
 CR7: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 18893

20 **Composiciones de cultivo**

Tabla 8

	ST1 (%)	CR1 (%)	CR2 (%)	CR7 (%)
M1.2	72,2	13,9	13,9	0,0
M1.7	72,2	13,9	0,0	13,9

25 Como base de comparación se utilizó un cultivo de referencia que contenía una cepa convencional de *Streptococcus thermophilus* positiva a la lactosa y una cepa convencional de *Lactococcus lactis* positiva a la lactosa.

**Base láctea**

30 La base láctea del cultivo de referencia contenía 3,5 % de proteínas y 15 % de grasa. La base láctea de los cultivos de la invención contenía 3,2 % de proteínas y 15 % de grasa.

Tabla 9: Composición de la base láctea

	Base láctea de la invención (kg)	Base láctea de referencia (kg)
Leche	18,34	19,66
Nata	16,40	17,34
Leche desnatada en polvo	0,025	0,002
Azúcar (glucosa)	0,228	0,0

**Resultados**

35 *Post-acidificación*

Tabla 10

	Día 0 (pH final)	Día 7	Día 21	Día 28
Ref. a 30 °C	4,57	4,47	4,46	4,46
M1.2 a 30 °C	4,54	4,58	4,64	4,62
M1.7 a 30 °C	4,58	4,62	4,68	4,65
Ref. a 35 °C	4,57	4,48	4,50	4,47
M1.2 a 35 °C	4,58	4,60	4,65	4,62
M1.7 a 35 °C	4,56	4,60	4,66	4,64

Como se apreciará en los resultados de la Tabla 10, la post-acidificación de las muestras producidas de acuerdo el procedimiento de la invención era inferior a la de las muestras de referencia correspondientes.

5

*Firmeza del gel*

Tabla 11

	Superficie positiva (g.s)
Ref. a 30 °C	1650,46
M1.2 a 30 °C	1718,41
M1.7 a 30 °C	1658,08
Ref. a 35 °C	1880,56
M1.2 a 35 °C	2494,80
M1.7 a 35 °C	1970,33

10 Como se apreciará en la Tabla 11, la firmeza del gel de las muestras producidas de acuerdo con el proceso de la invención aumentó significativamente en comparación con las muestras de referencia correspondientes.

**EJEMPLO 4**

15 *Producción de quark utilizando glucosa como fuente de hidrato de carbono y un cultivo que consiste en una S. thermophilus (ST) deficiente en lactosa y una o dos L. lactis subsp. cremoris (CR) deficientes en lactosa*

20 En este experimento se utilizó glucosa como fuente de hidrato de carbono. La temperatura de fermentación fue de 30 °C. Las cepas, las composiciones de cultivo, el procedimiento y las mediciones son los mismos que en el Ejemplo 3.

**Base láctea**

Tabla 12

	Base láctea de la invención (kg)
Leche	59,61
Glucosa	0,390

25

**Resultados**

*Post-acidificación*

30 Tabla 13

	Día 0 (pH final)	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 36	Día 42	Día 49
Ref. a 30 °C	4,63	4,45	4,39	4,37	4,35	4,38	4,38	4,35
M1.2 a 30 °C	4,68	4,78	4,78	4,78	4,74	4,80	4,80	4,74
M1.7 a 30 °C	4,65	4,82	4,78	4,78	4,78	4,78	4,77	4,76

Como se apreciará en los resultados de la Tabla 13, la post-acidificación de las muestras producidas de acuerdo el procedimiento de la invención era inferior a la de las muestras de referencia correspondientes.

5 *Firmeza del gel*

Tabla 14

	Superficie positiva (g.s)
Ref. a 30 °C	88,2
M1.2 a 30 °C	104,53
M1.7 a 30 °C	132,44

10 Como se apreciará en la Tabla 14, la firmeza del gel de las muestras producidas de acuerdo con el proceso de la invención aumentó significativamente en comparación con las muestras de referencia correspondientes.

**EJEMPLO 5**

15 *Producción de quark utilizando glucosa y sacarosa como fuente de hidrato de carbono y un cultivo que consiste en una S. thermophilus (ST) deficiente en lactosa y dos L. lactis subsp. cremoris (CR) deficientes en lactosa*

20 La base láctea consistía en leche desnatada que contenía 0,7 % de glucosa o 0,6 % de sacarosa. La fermentación se llevó a cabo a 30 °C hasta alcanzar un pH específico de 4,6. Las muestras se agitaron y enfriaron en agua congelada durante aprox. 15 minutos y después se conservaron a 5 °C. La textura (tensión de cizallamiento) se midió el día 7.

**Cepas**

ST2: *Streptococcus thermophilus* DSM 32599.

25 **Composiciones de cultivo**

Tabla 15

	ST1 (%)	ST2 (%)	CR1 (%)	CR7 (%)
M1.7_ST1	72,2		13,9	13,9
M1.7_ST2		72,2	13,9	13,9

**Resultados**

30 Tensión de cizallamiento

Tabla 16

	Hidratos de carbono	Tensión de cizallamiento (Pa)
M1.7_ST1	Glucosa	30,55
M1.7_ST2	Glucosa	31,15
M1.7_ST1	Sacarosa	42,00
M1.7_ST2	Sacarosa	39,40

35 Como se apreciará en la Tabla 16, los cultivos con las dos *Streptococcus thermophilus* produjeron quark con el mismo nivel de tensión de cizallamiento. Asimismo, las muestras cultivadas con sacarosa tenían un nivel de tensión de cizallamiento superior al de las muestras cultivadas con glucosa.

**EJEMPLO 6**

40 *Perfiles de acidificación de cultivos que consisten en una S. thermophilus (ST) deficiente en lactosa y una o dos L. lactis subsp. lactis (LC) deficientes en lactosa positivas a la sacarosa*

**Cepas**

45

- ST1: *Streptococcus thermophilus* DSM 28952
- ST2: *Streptococcus thermophilus* DSM 32599
- LC1: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32603
- LC2: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32604
- LC3: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32601
- LC4: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32602
- LC5: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32605

**Composiciones de cultivo**

Tabla 17

	ST (%)	ST2 (%)	LC1 (%)	LC2 (%)	LC3 (%)	LC4 (%)	LC5 (%)
C1	72,2		27,8				
C2	72,2			27,8			
C3	72,2				27,8		
C4	72,2					27,8	
C5	72,2						27,8
C6		72,2	27,8				

Como base de comparación se utilizó un cultivo de referencia que contenía una cepa convencional de *Streptococcus thermophilus* positiva a la lactosa y una cepa convencional de *Lactococcus lactis* positiva a la lactosa.

**Procedimiento**

Se inocularon cultivos nocturnos en medio M17 que contenía 1 % de sacarosa en 200 ml de leche B que contenía 0,5 % de sacarosa y 0,02 g/l de formiato de sodio y se incubaron en un bañomaría a 30 °C o 34 °C. Se realiza un seguimiento del pH durante un largo periodo de tiempo después de alcanzar el pH específico.

**Resultados**

La Fig. 1 muestra los perfiles de acidificación de C1-C4 a 34 °C.

La Fig. 2 muestra los perfiles de acidificación de C1-C4 a 30 °C.

La Fig. 3 muestra el perfil de acidificación de C5 a 34 °C.

La Fig. 4 muestra el perfil de acidificación de C6 a 34 °C.

Como se apreciará en las figuras 1 y 3, para todos los cultivos C1-C5 a 34 °C, el pH desciende a un nivel específico de aprox. 4,7-4,8 en aprox. 8 horas. Como se apreciará en la figura 2, para los cultivos C1-C4 a 30 °C, el pH desciende a un nivel específico de aprox. 4,7-4,8 en aprox. 14 horas. Como se apreciará en la figura 4, para el cultivo C6 a 34 °C, el pH desciende a un nivel específico de aprox. 4,7-4,8 en aprox. 10 horas. Una vez alcanzado el pH específico, el pH permanece completamente constante durante el periodo siguiente, mientras se mida el pH, es decir, no se produce post-acidificación.

En comparación, para el producto de referencia, el pH sigue disminuyendo durante todo el periodo de seguimiento del pH, es decir, se produce post-acidificación.

**EJEMPLO 7**

Perfiles de acidificación de dos cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LC) deficientes en lactosa, positivas a la sacarosa y dos cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis cremoris* (LACcr) deficientes en lactosa, positivas a la glucosa.

**Cepas**

- LC5: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32605
- LC7: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32832
- LACcr1: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32829
- LACcr2: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32830
- ST1: *Streptococcus thermophilus* DSM 28952

**Composiciones de cultivo**

- 5 LC5 + ST1
- LC7 + ST1
- LACcr1 + ST1
- LACcr2 + ST1

**Procedimiento**

- 10 Se cultivaron cultivos nocturnos de LC5 y LC7 en leche esterilizada en autoclave (leche A) que contenía 2 % y se utilizaron para inocular 200 ml de leche desnatada que contenía 0,5 % de sacarosa.
- 15 ST1 se inoculó con 0,0065 %. La fermentación se llevó a cabo a 30 °C durante 24 horas
- Las cepas de LACcr1 y LACcr2 se inocularon directamente a partir de material de preinoculación (MPI) correspondiente a 1,1E+09 células / 200 ml de leche. ST1 se inoculó con 0,0065 %. La fermentación se llevó a cabo en leche desnatada que contenía 0,5 % de glucosa a 30 °C durante 47 horas

**Resultados**

- 20 La Fig. 5 muestra los perfiles de acidificación de LC5 + ST1 y LC7 + ST1 a 30 °C.
- La Fig. 6 muestra los perfiles de acidificación de LACcr1 + ST1 y LACcr2 + ST1 a 30 °C.
- 25 Como se apreciará en las figuras 5 y 6, el pH desciende a un nivel estable, lo que refleja la finalización de la fermentación debido a la disminución/agotamiento de la fuente de hidrato de carbono añadida. Una vez alcanzado el pH estable, éste permanece completamente constante durante el periodo siguiente mientras se mida el pH, es decir, no se produce post-acidificación.

**EJEMPLO 8**

- 35 *Perfiles de acidificación y post-acidificación de mezclas de cultivo que consisten en una cepa de Lactococcus lactis subsp lactis (LC) deficiente en lactosa, positiva a la sacarosa, una de Lactococcus lactis subsp cremoris (LACcr) deficiente en lactosa, positiva a la glucosa, una de S. thermophilus (ST) deficiente en lactosa y una S. thermophilus moderada.*

**Cepas**

- 40 LC5: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32605
- LC7: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32832
- LACcr1: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 32829
- LACcr2: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 32830
- ST1: *Streptococcus thermophilus* DSM 28952
- 45 STmoderada: cepa comercial de *Streptococcus thermophilus* con baja capacidad de acidificación.

**Composiciones de cultivo**

Tabla 18

	ST1	ST moderada	LC5	LC7	LACcr1	LACcr
C1	X	X	X		X	
C2	X	X	X			X
C3	X	X		X	X	
C4	X	X		X		X

- 50 Como base de comparación, se utilizó un cultivo de referencia que contenía una cepa convencional de *Streptococcus thermophilus* positiva a la lactosa y una cepa convencional de *Lactococcus lactis* positiva a la lactosa.

**Procedimiento**

- 55 Las mezclas de cultivo C1-C4 se acidificaron en leche desnatada que contenía 0,6 % de sacarosa. La fermentación se llevó a cabo a 30 °C durante 18 horas. Las muestras se agitaron y enfriaron en agua congelada durante aprox. 15 minutos y después se conservaron a 5 °C. Después de un periodo de conservación en frío de 28 días se midió la post-

## ES 3 010 118 T3

acidificación (pH) y la tensión de cizallamiento se midió el día 7 utilizando el método descrito en el Ejemplo 1.

### Resultados

5 La Fig. 7 muestra los perfiles de acidificación de C1-C4 y de la referencia a 30 °C.

La Fig. 8 muestra los perfiles de acidificación de C1-C4 y de la referencia a 35 °C.

10 Como se apreciará en la figura 7 (30 °C), el pH se estabiliza a 4,55 para las mezclas de cultivo C1-C3 después de aproximadamente 13 horas y para C4 después de aproximadamente 17 horas. Los perfiles de acidificación a 35 °C (Fig. 8) muestran estabilización del pH a un pH de aproximadamente 4,60 después de 11 horas en todas las mezclas de cultivo C1-C4. Para el cultivo de referencia, el pH sigue bajando durante todo el período controlado (18 horas) tanto a 30 °C como a 35 °C.

15 Tabla 19: Post-acidificación y tensión de cizallamiento prolongadas

	Temperatura	pH el día 28	Tensión de cizallamiento a 300 1/s
C1	30 °C	4,45	39,90
C2		4,53	43,45
C3		4,44	41,65
C4		4,48	48,00
Ref		4,31	40,35
C1	35 °C	4,43	46,80
C2		4,54	47,45
C3		4,52	50,75
C4		4,52	48,65
Ref		4,38	40,85

20 Como se apreciará en la Tabla 19, los valores de pH de las mezclas de cultivo C1-C4 conservadas durante 28 días a 30 °C son entre 0,13-0,22 unidades de pH superiores al pH del cultivo de referencia. Los valores de pH de las mezclas de cultivo C1-C4 conservadas durante 28 días a 35 °C son entre 0,05-0,16 unidades de pH por encima de la referencia.

Para las muestras conservadas tanto a 30 °C como a 35 °C, la tensión de cizallamiento estaba al mismo nivel o superior para las mezclas de cultivo C1-C4 que la tensión de cizallamiento para el cultivo de referencia.

### EJEMPLO 9

25 *Producción de nata agria agitada utilizando sacarosa como fuente de hidrato de carbono y un cultivo que consiste en una cepa de Lactococcus lactis subsp lactis (LC) deficiente en lactosa, positiva a la sacarosa, una de Lactococcus lactis subsp cremoris (CR / LACcr deficiente en lactosa, positiva a la glucosa, una de S. thermophilus (ST) deficiente en lactosa y una de S. thermophilus (ST) moderada (STmoderada).*

### Cepas

LC7: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32832

LACcr1: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 32829

LACcr2: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 32830

CR7: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 18893

ST1: *Streptococcus thermophilus* DSM 28952

STmoderada1: cepa comercial de *Streptococcus thermophilus* con baja capacidad de acidificación.

STmoderada2: cepa comercial de *Streptococcus thermophilus* con baja capacidad de acidificación.

### Composiciones de cultivo

Tabla 20

## ES 3 010 118 T3

	ST1	STmoderada 1	STmoderada2	LC7	LACcr1	LACcr2	CR7
C1	X		X	X	X		
C2	X	X		X		X	
C3	X		X	X			X

Como base de comparación, se utilizó un cultivo de referencia que contenía una cepa convencional de *Streptococcus thermophilus* positiva a la lactosa y una cepa convencional de *Lactococcus lactis* positiva a la lactosa.

### 5 **Base láctea**

La base láctea del cultivo de referencia contenía 2,7 % de proteínas y 15 % de grasa. La base láctea de los cultivos de la invención contenía 2,4 % de proteínas, 15 % de grasa y 0,45 % de sacarosa.

10 Tabla 21: Composición de la base láctea

	Base láctea de la invención (%)	Base láctea de referencia (%)
Leche	46,00	52,96
Nata	46,87	46,88
Leche desnatada en polvo		0,16
Azúcar (sacarosa)	0,45	
Agua	6,68	
Tratamiento	Homogeneización: 200/40 bar a 70 °C Tratamiento térmico: 92 °C / 6 min	

### **Procedimiento**

La fermentación se llevó a cabo a temperaturas de 30 °C y 35 °C.

15 La referencia se trató posteriormente utilizando 2 bares de contrapresión y enfriando a 18 °C. Las muestras producidas de acuerdo con la invención se trataron posteriormente utilizando 2 bares de contrapresión a la temperatura de fermentación (30 °C y 35 °C).

20 Las muestras se conservaron a 6 °C.

La post-acidificación (pH) se midió después de un periodo de conservación en frío de 28 días y la firmeza del gel se midió después del día 7. Los procedimientos para las mediciones de textura (firmeza del gel) fueron los mismos que los del Ejemplo 1.

### 25 **Mediciones**

Se midieron la post-acidificación y la firmeza del gel.

30 Tabla 22: Post-acidificación

pH	Día 0 (pH final)	Día 1	Día 7	Día 14	Día 28	Día 1 menos Día 35
Ref. a 30 °C	4,55	4,53	4,5	4,45	4,41	-0,12
C1 a 30 °C	4,48	4,48	4,48	4,49	4,46	-0,02
C2 a 30 °C	4,53	4,52	4,52	4,52	4,52	-0,00
C3 a 30 °C	4,44	4,44	4,43	4,42	4,41	-0,03
Ref. a 35 °C	4,55	4,54	4,52	4,50	4,46	-0,08
C1 a 35 °C	4,56	4,55	4,53	4,52	4,49	-0,06
C2 a 35 °C	4,51	4,5	4,49	4,48	4,46	-0,04
C3 a 35 °C	4,56	4,55	4,52	4,52	4,49	-0,06

Como se apreciará en los resultados de la Tabla 22, la post-acidificación de las muestras producidas de acuerdo el procedimiento de la invención era inferior a la de las muestras de referencia correspondientes.

5 Tabla 23: Firmeza del gel

	Superficie positiva (g.s) de la firmeza del gel
Ref. a 30 °C	1299
C1 a 30 °C	2164
C2 a 30 °C	2789
C3 a 30 °C	2832
Ref. a 35 °C	1272
C1 a 35 °C	2885
C2 a 35 °C	2684
C3 a 35 °C	3130

Como se apreciará en la Tabla 23, la firmeza del gel de las muestras producidas de acuerdo con el proceso de la invención aumentó significativamente en comparación con las muestras de referencia correspondientes.

10 **EJEMPLO 10**

*Producción de quark agitado utilizando sacarosa como fuente de hidrato de carbono y un cultivo que consiste en una cepa de Lactococcus lactis subsp lactis (LC) deficiente en lactosa, positiva a la sacarosa, una de Lactococcus lactis subsp cremoris (CR / LACcr deficiente en lactosa, positiva a la glucosa, una de S. thermophilus (ST) deficiente en lactosa y una de S. thermophilus (ST) moderada (STmoderada).*

Las cepas y las composiciones de cultivo, son las mismas que en el Ejemplo 9.

**Base láctea**

Se utilizó leche desnatada como base láctea.

La base láctea del cultivo de referencia contenía 3,2 % de proteínas y 0,05 % de grasa. La base láctea de los cultivos de la invención contenía 3,2 % de proteínas, 0,05 % de grasa y niveles de sacarosa entre 0,45 % y 0,65 % seleccionados de forma que se optimicen para cada composición de cultivo específica.

**Procedimiento**

La fermentación se llevó a cabo a temperaturas de 30 °C y 35 °C. El porcentaje de inoculación del cultivo fue del 0,01 %.

Las muestras se conservaron a 6 °C.

**Resultados**

La Fig. 9 muestra los perfiles de acidificación de C1-C3 y de la referencia a 30 °C.

La Fig. 10 muestra los perfiles de acidificación de C1-C3 y de la referencia a 35 °C

Como se apreciará en la figura 9 (30 °C), el pH se estabiliza para las mezclas de cultivo C1-C3 después de aproximadamente 12 horas. Los perfiles de acidificación a 35 °C (Fig. 10) muestran estabilización del pH después de aproximadamente 11 horas de fermentación. Para el cultivo de referencia, el pH baja a un valor significativamente inferior durante el periodo controlado tanto a 30 °C como a 35 °C.

La post-acidificación se midió en diferentes periodos de tiempo de conservación en frío (6 °C).

Tabla 24: Post-acidificación

## ES 3 010 118 T3

pH	Día 0 (pH final)	Día 3	Día 8	Día 9	Día 13
Ref. a 30 °C	4,68	ND	4,37	ND	4,38
C1 a 30 °C	4,71	ND	4,70	ND	4,70
C2 a 30 °C	4,68	ND	4,73	ND	4,73
C3 a 30 °C	4,64	ND	4,68	ND	4,69
Ref. a 35 °C	4,60	4,47	ND	4,48	ND
C1 a 35 °C	4,60	4,60	ND	4,60	ND
C2 a 35 °C	4,59	4,62	ND	4,61	ND
C3 a 35 °C	4,58	4,59	ND	4,59	ND

ND: No hay datos.

5 Como se apreciará en los resultados de la Tabla 24, la post-acidificación de las muestras producidas de acuerdo el procedimiento de la invención era inferior a la de las muestras de referencia correspondientes.

Tabla 25: Firmeza del gel

	Superficie positiva (g.s) de la firmeza del gel
Ref. a 30 °C	594,96
C1 a 30 °C	744,85
C2 a 30 °C	578,39
C3 a 30 °C	712,14

10 Como se apreciará en la Tabla 25, la firmeza del gel de las muestras producidas de acuerdo con el proceso de la invención a 30 °C aumentó significativamente en comparación con la muestra de referencia correspondiente.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de producción de un producto lácteo fermentado que comprende las etapas de
  - 5 1) añadir un cultivo iniciador de bacterias acidolácticas que comprende al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa, que es capaz de metabolizar un hidrato de carbono sin lactosa, y al menos una cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa, que es capaz de metabolizar el hidrato de carbono sin lactosa, a una base láctea, y
  - 10 2) fermentar la leche durante un periodo de tiempo hasta alcanzar un pH específico para obtener un producto lácteo fermentado,

en donde al inicio de la etapa de fermentación, a la base láctea se le añade el hidrato de carbono sin lactosa.
- 15 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las cepas deficientes en lactosa son capaces de metabolizar un hidrato de carbono sin lactosa seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, galactosa y glucosa.
3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el hidrato de carbono sin lactosa se añade a la base láctea en una cantidad medida para que se agote al pH específico entre 3,2 y 4,8 y, por tanto, detenga el crecimiento de las bacterias acidolácticas y la fermentación.
- 20 4. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa se selecciona del grupo que consiste en:
  - 25 (a) la cepa depositada en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (colección alemana de microorganismos y cultivos celulares GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el número de registro DSM 28952;
  - (b) la cepa depositada en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 12-06-2014 con el número de registro DSM 28953;
  - 30 (c) la cepa depositada en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 22-08-2017 con el número de registro DSM 32599; y
  - (d) la cepa depositada en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 22-08-2017 con el número de registro DSM 32600.
- 35 5. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cepa de *Lactococcus lactis* se selecciona del grupo que consiste en una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.
- 40 6. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cultivo iniciador contiene, además, una o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc spp.* y *Bifidobacterium spp.*
- 45 7. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el producto lácteo fermentado producido se selecciona del grupo que consiste en suero de mantequilla, leche agria, leche cultivada, Smetana, nata agria, nata espesa, nata cultivada, ymer, lactosuero fermentado, Kéfir y queso fresco, tal como Quark, tvarog y queso crema.
8. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa se selecciona del grupo que consiste en
  - 50 1) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32398,
  - 2) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 18882,
  - 3) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32399,
  - 4) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 18893,
  - 5) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32601,
  - 55 6) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32602,
  - 7) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32603,
  - 8) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32604,
  - 9) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32605,
  - 10) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32829,
  - 60 11) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32830, y
  - 12) la cepa depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 32832.
9. Una composición de bacterias acidolácticas que comprende al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa y al menos una de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa.
- 65 10. Un producto lácteo fermentado producido por el proceso de las reivindicaciones 1-8.

11. Uso en un proceso de producción de un producto lácteo fermentado que comprende las etapas de

- 5
- 1) añadir un cultivo iniciador de una cepa de bacterias acidolácticas a una base láctea, y
  - 2) fermentar la leche durante un periodo de tiempo hasta alcanzar un pH específico para obtener un producto lácteo fermentado, de un cultivo iniciador de bacterias acidolácticas que comprende al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* deficiente en lactosa, que es capaz de metabolizar un hidrato de carbono sin lactosa, y al menos una cepa de *Lactococcus lactis* deficiente en lactosa, que es capaz de metabolizar el hidrato de carbono sin lactosa.

10

12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, para aumentar la textura medida como tensión de cizallamiento o firmeza del gel del producto lácteo fermentado en comparación con el uso de un cultivo iniciador que comprende al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* positiva a la lactosa, capaz de metabolizar la lactosa, y al menos una cepa de *Lactococcus lactis* positiva a la lactosa, que es capaz de metabolizar la lactosa.

15

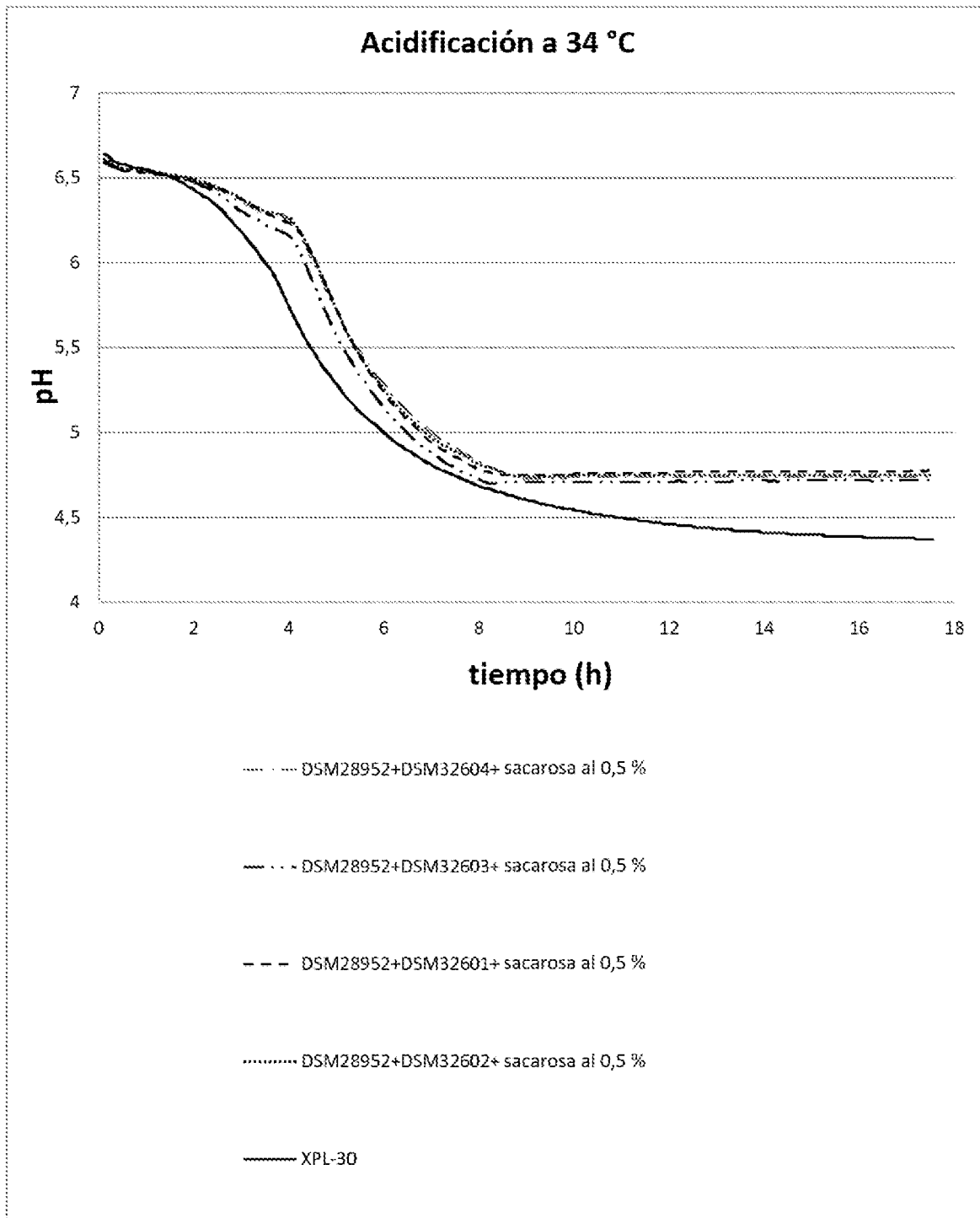
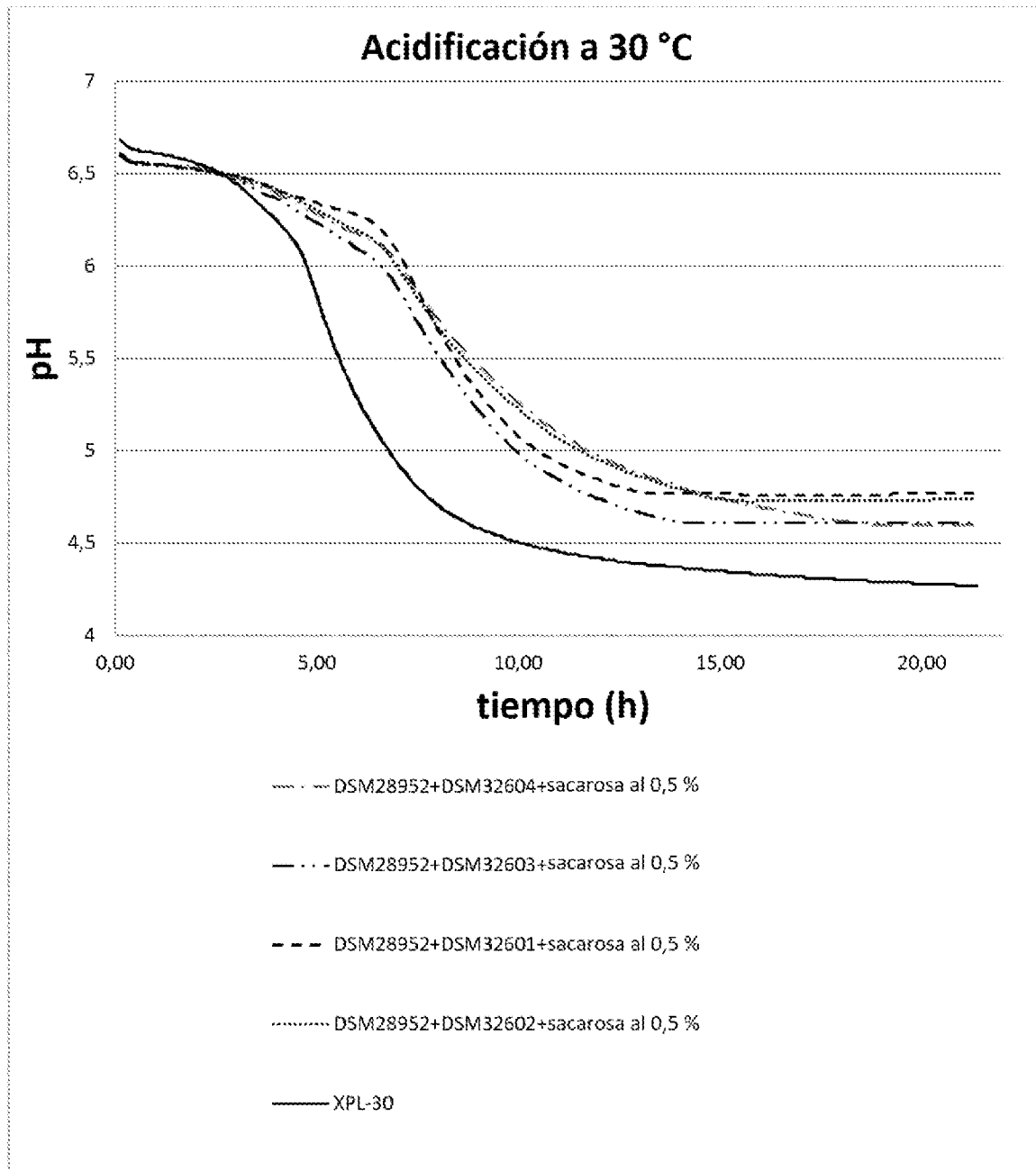
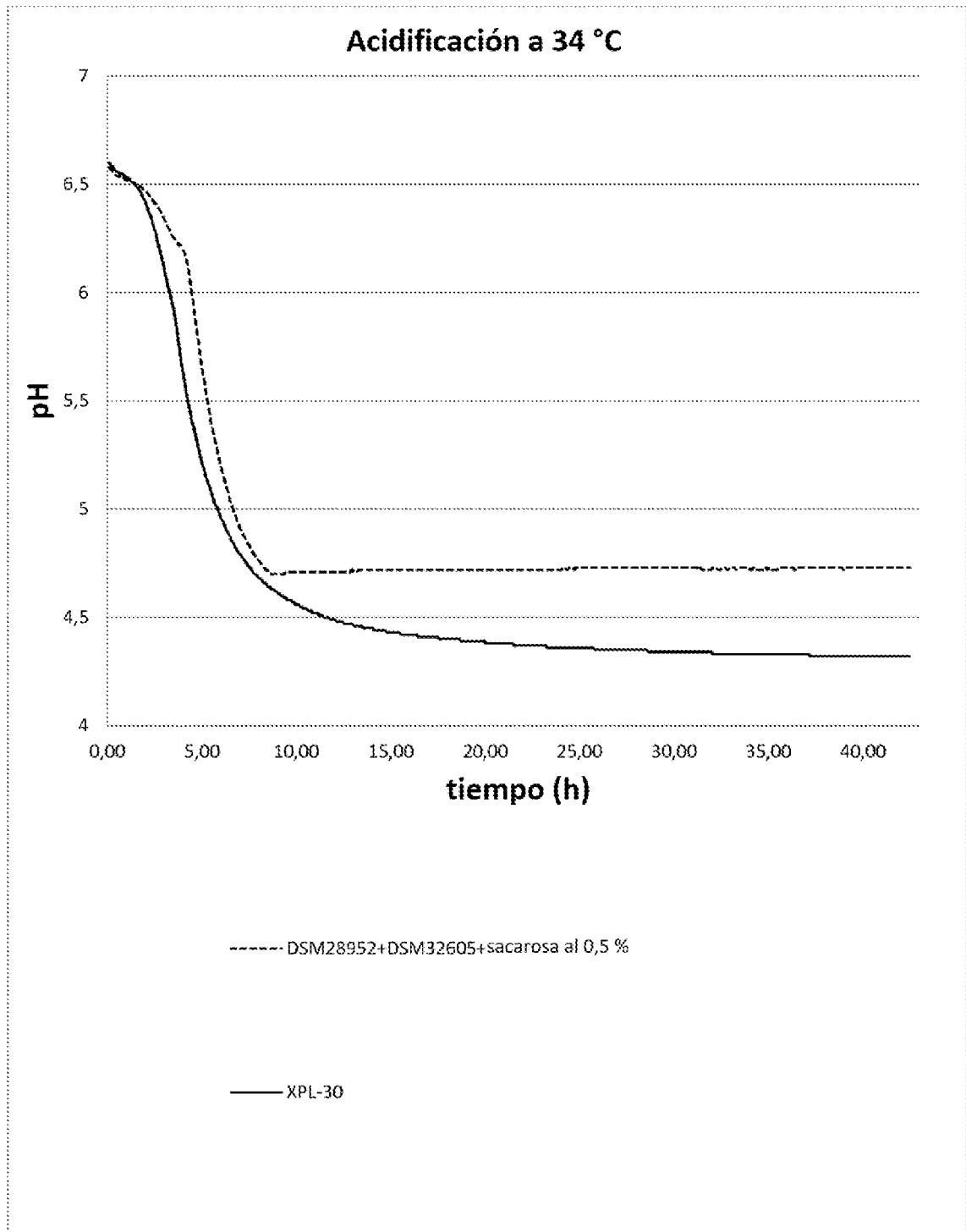


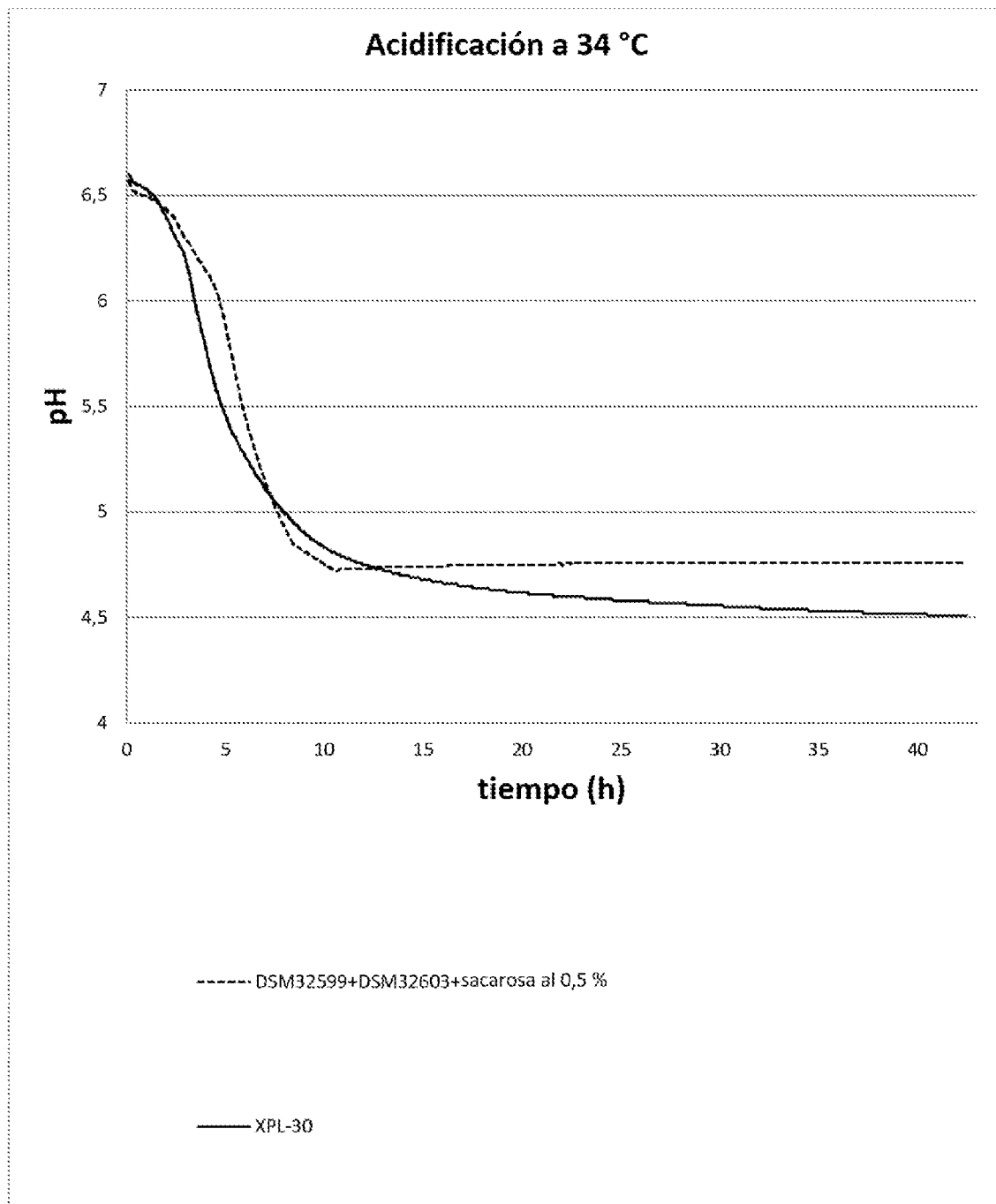
Fig. 1



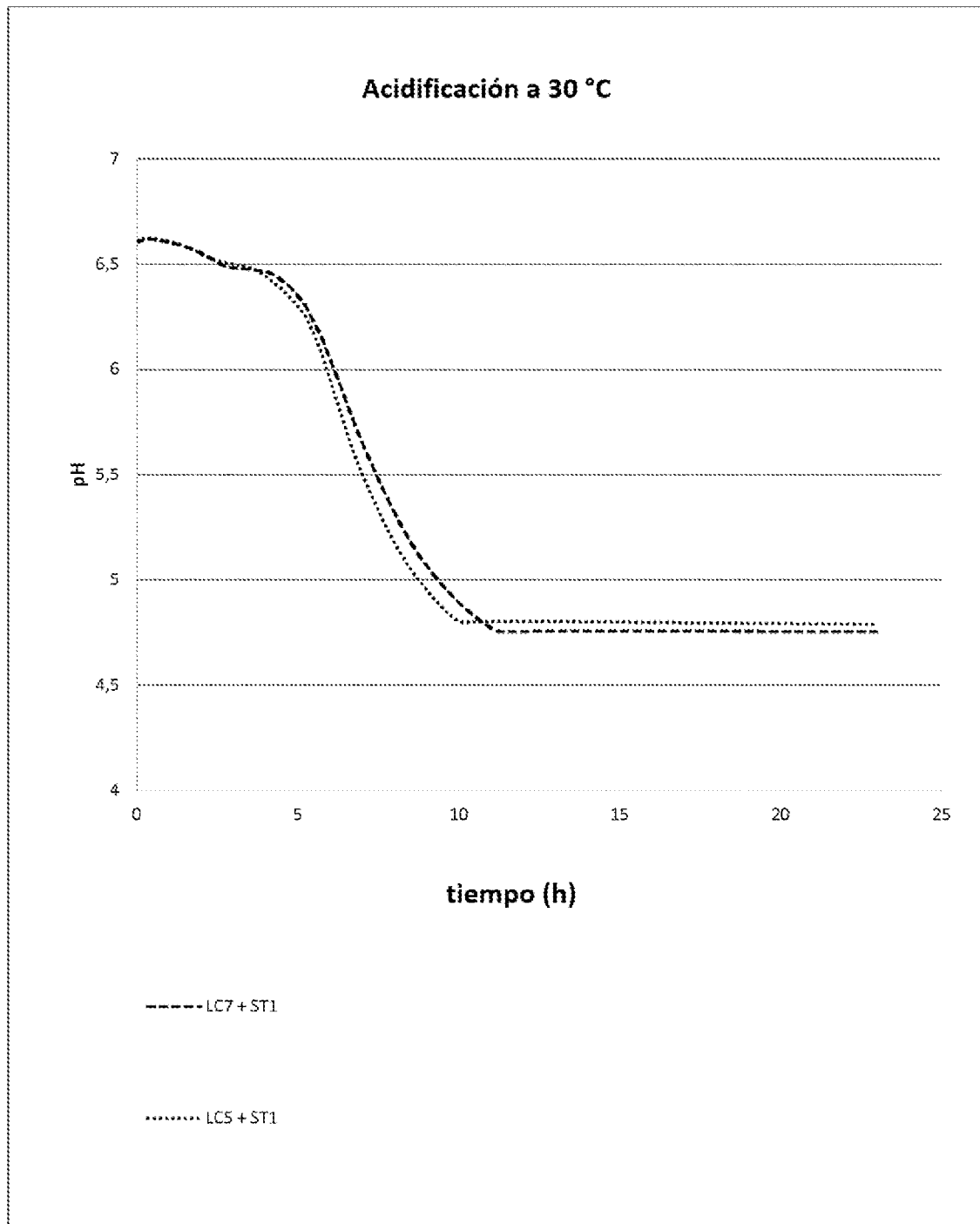
**Fig. 2**



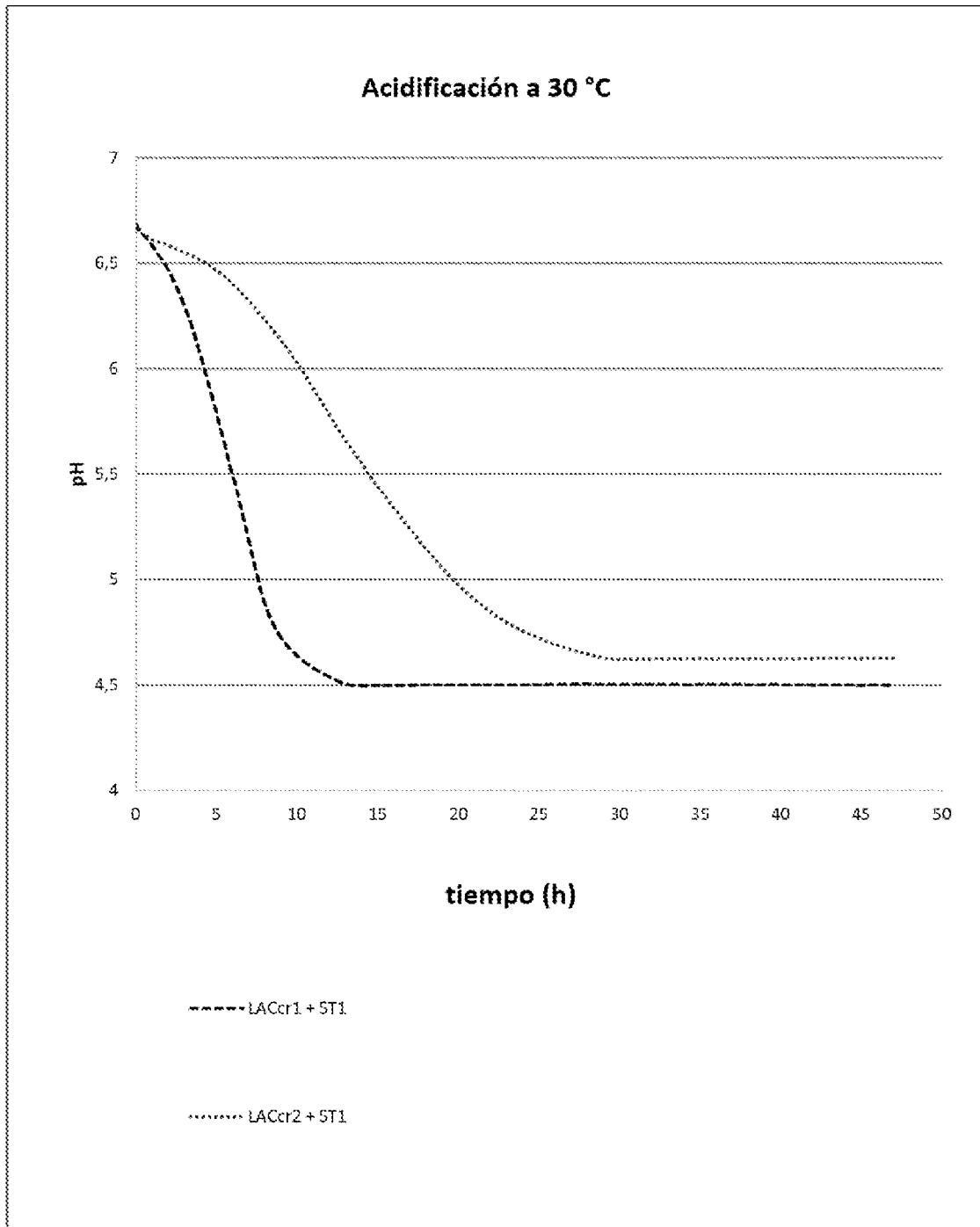
**Fig. 3**



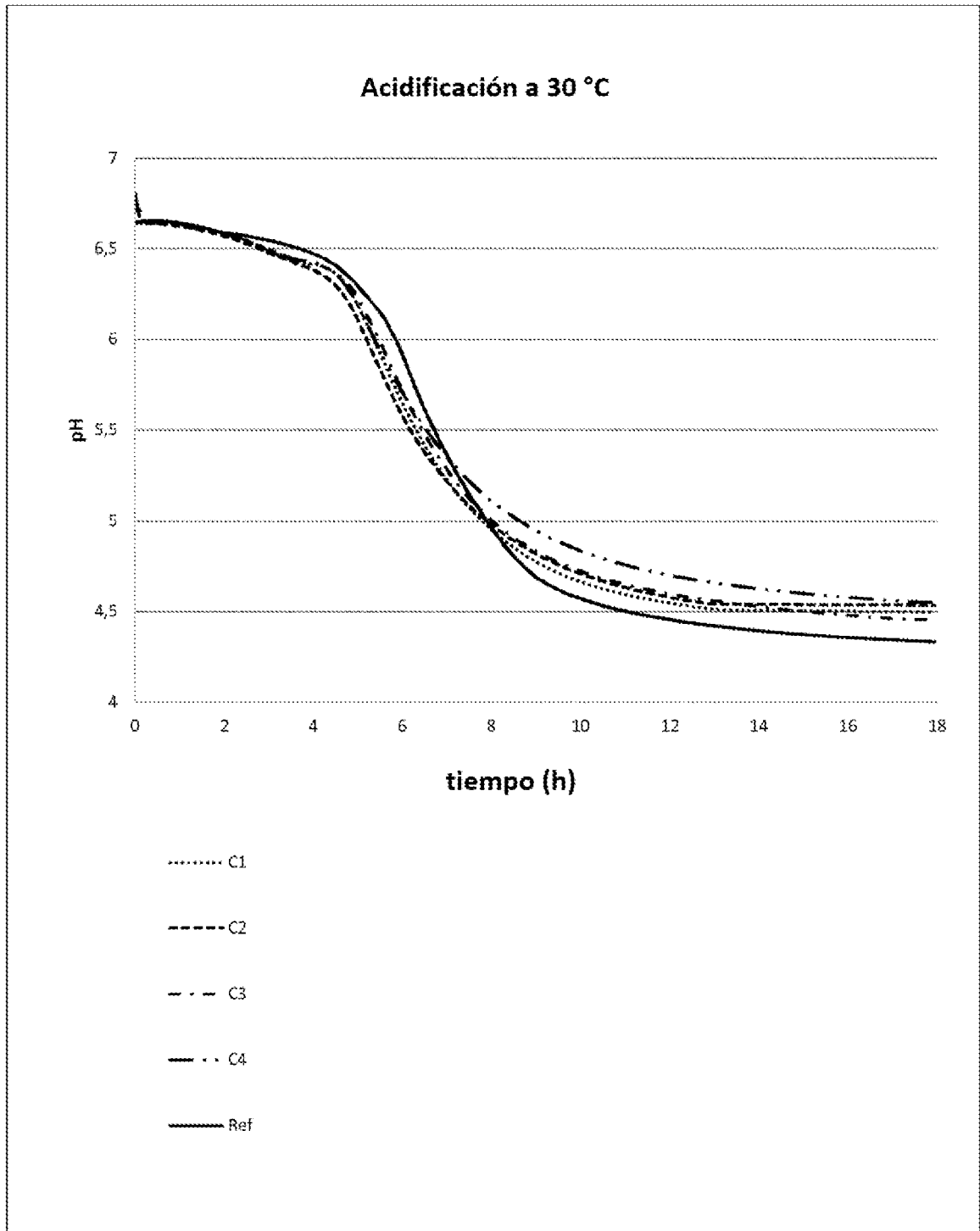
**Fig. 4**



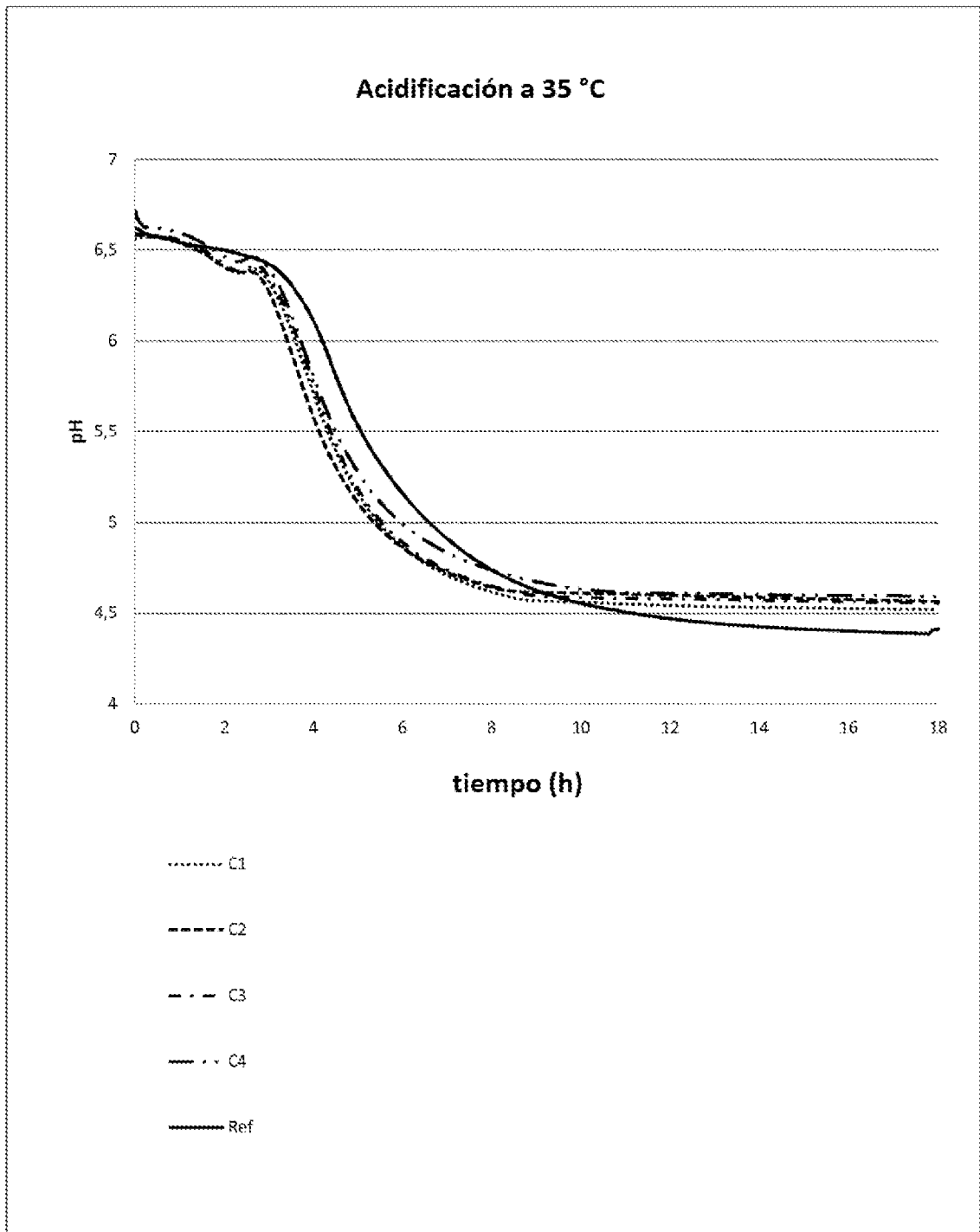
**Fig. 5**



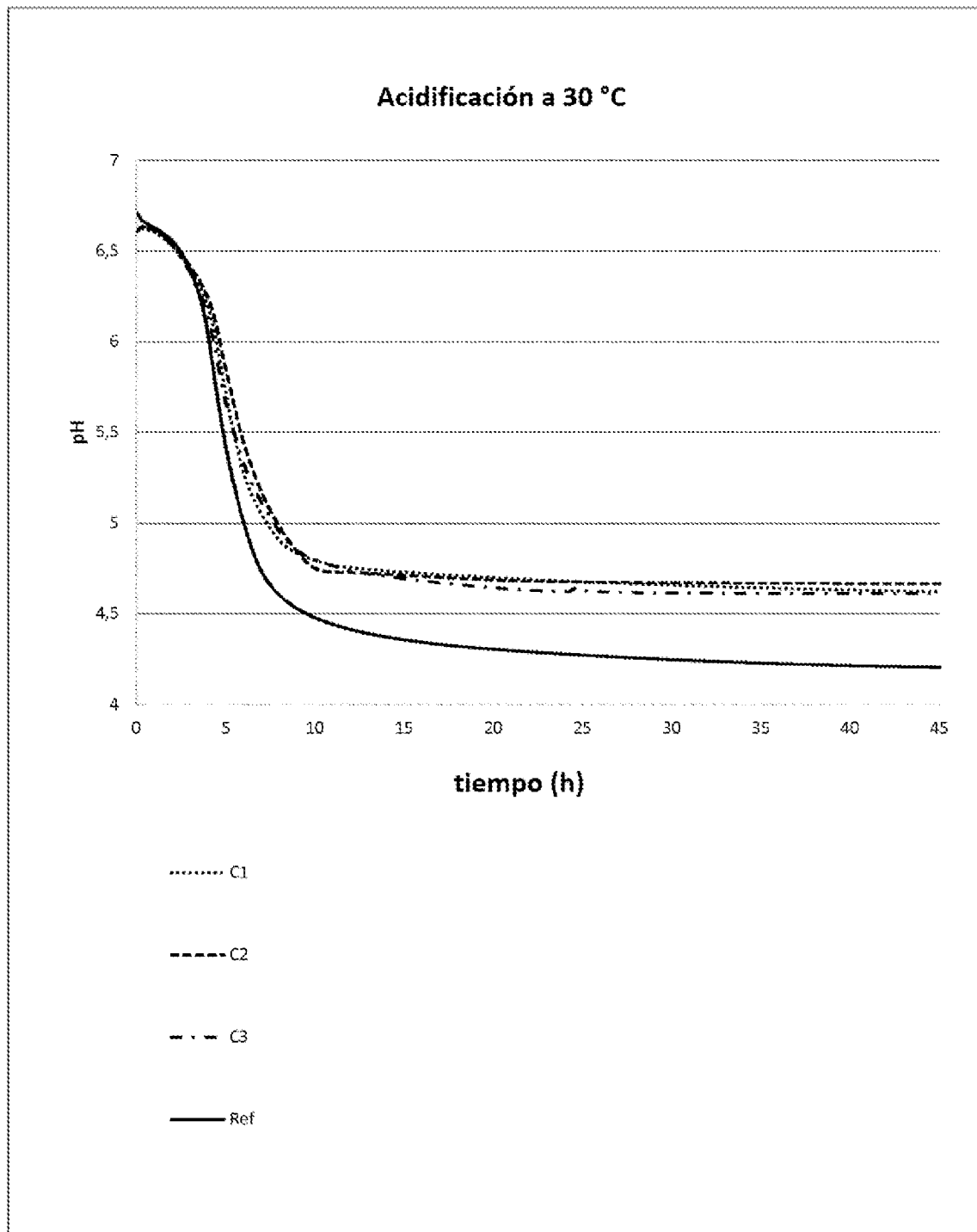
**Fig. 6**



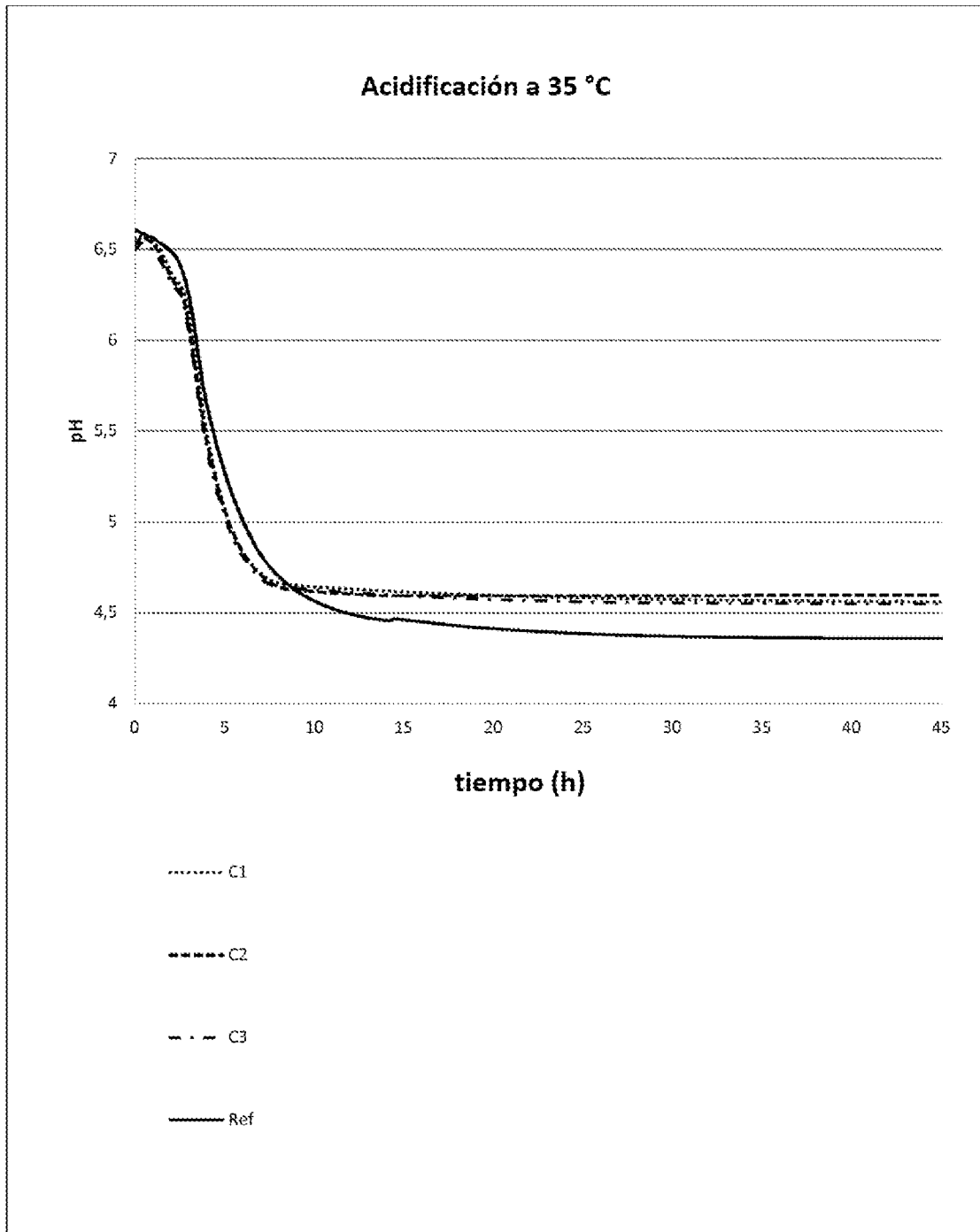
**Fig. 7**



**Fig. 8**



**Fig. 9**



**Fig. 10**