

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

11 ABR. 1978

CONCEDIDA
PATENTE DE INVENCION

10 ES	11 NUMERO 461.435	10 AI
	21	
	22 FECHA DE PRESENTACION 8.8.77	

60 PRIORIDADES:		
61 NUMERO 712.692 (parcial)	62 FECHA 9.8.76	63 PAIS EE.UU.
64 FECHA DE PUBLICIDAD	65 CLASIFICACION INTERNACIONAL A23C	66 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
67 TITULO DE LA INVENCION "UN METODO PARA LA PREPARACION DE ALIMENTOS"		
68 SOLICITANTE (S) MICROLIFE TECHNICS, INC. (Microlife 4.2+22)		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE 1833, 57th Street, Sarasota, Florida, 33578, Estados Unidos de America		
69 INVENTOR (ES) Ebenezer R. Vedamuthu		
70 TITULAR (ES)		
71 REPRESENTANTE D. FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P.- 66.693)		

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una nueva cepa mutante de Streptococcus diacetilactis especialmente adecuada para la preparación de queso cremoso "Cottage" (queso cremoso casero) sin fermentación preliminar de la mezcla que contiene crema. En particular, la presente invención se refiere a concentrados de Streptococcus diacetilactis NRRL-B-8177 para usar en mezclas que contienen crema, sin fermentación, como profiláctico contra bacterias corruptoras.

TECNICA ANTERIOR

La técnica anterior en el uso de bacterias para preparar mezclas que contienen crema para queso Cottage está representada en parte por las Patentes de Estados Unidos Nos. 2.971.847 a Babel y otros, y 3.323.921 a Moseley y otros. Esta última patente describe el uso de Streptococcus diacetilactis 18-16 para este fin. En estos métodos se somete a fermentación leche descremada con la bacteria seleccionada a temperaturas por encima de la refrigeración normal, a saber, de 20 a 22°C, durante cierto periodo de tiempo y después se mezcla con el aditivo que contiene crema. De este modo se requieren varias etapas para preparar la mezcla que contiene crema por estos métodos.

Más recientemente la Patente Canadiense No. 979.275 y la Patente de Estados Unidos No. 3.968.256 a Sing describe el uso de formas concentradas o liofilizadas particulares de Streptococcus diacetilactis, en especial la ATCC No. 15346 (conocida también como 18-16) añadidas a la mezcla que contiene crema a una concentración

comprendida entre $1,0 \times 10^6$ y 2×10^8 células por gramo de queso Cottage sin fermentar y después se mezcla con el queso Cottage. La Patente de Estados Unidos No. 3.048.490 a Lundstedt describe el uso de formas sin concentrar, del mismo modo. Asimismo en la Solicitud de Patente No. de Serie 639.052 se ha descrito una mejora sobre el método de Sing. Estos métodos "sin fermentación previa" producen queso cremoso Cottage muy bueno. El problema ha sido que incluso a temperaturas bajas comprendidas entre $4,4^{\circ}\text{C}$ y 10°C en el método de Sing y en el método mejorado antes citado, la 18-16 produce lentamente ácido que después de algún tiempo comunica al queso Cottage un sabor agrio. Asimismo, e incluso más importante, bajo condiciones comerciales, las temperaturas a veces aumentan por encima de 10°C , acelerando la producción de ácido, ocasionando de este modo que el queso Cottage tenga un sabor agrio.

OBJETOS

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar una nueva cepa mutante de Streptococcus diacetylactis para queso Cottage que comunica un sabor mejorado, sin fermentar o incubar las mezclas que contienen crema antes de la adición a la cuajada de queso Cottage. También es un objeto de la presente invención proporcionar una cepa mutante que incluso cuando las temperaturas exceden de 10°C (hasta 16°C), produce muy poco ácido durante periodos cortos de elevación de temperatura que pueden ocurrir durante la comercialización. Asimismo un objeto de la presente invención es describir una cepa mutante de Streptococcus diacetylactis que proporciona profi

laxis contra el crecimiento de bacterias corruptoras en el queso cremoso Cottage. Estos y otros objetos llegarán a ser evidentes de modo creciente por referencia a la descripción que figura seguidamente.

5

DESCRIPCION GENERAL

La presente invención se refiere a una composición que comprende: células bacterianas de Streptococcus diacetylactis NRRL-B-8177, que es un mutante de Streptococcus diacetylactis 18-16, mezcladas con un medio nutriente para las células bacterianas que es aceptable para el consumo humano y en el que las células son cocci mutantes relativamente grandes que producen cantidades significativamente inferiores de ácido en comparación con las células ligeramente más pequeñas de Streptococcus diacetylactis 18-16. Preferiblemente la composición contiene por lo menos aproximadamente 10^6 células por ml.

10

15

20

25

Se ha encontrado que las composiciones de Streptococcus diacetylactis NRRL-B-8177 de la presente invención comunican un sabor diacetilado deseable al queso Cottage cuando se encuentran presentes en altos números de células viables y activas, por síntesis de diacetilo a temperaturas de refrigeración normales, con baja producción de ácido láctico. La producción excesiva de ácido láctico induce un defecto "agrio" en el queso Cottage.

30

El mutante Streptococcus diacetylactis NRRL-B-8177 fue depositado recientemente por el autor de esta Patente en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 1815 North University Street, Peoria, Illinois y se encuentra ahora disponible al público a petición median

te el número de identificación. Induciendo mutaciones en S. diacetylactis 18-16 WT Wild-Type y seleccionando para obtener un mutante (con respecto al WT) que produjera ácido lentamente, el autor de esta Patente fue capaz, por suerte, de obtener un cultivo adecuado, en el que pudo retener varias de las características deseables de la cepa afín WT. La cepa mutante: (1) produce ácido lentamente y no ocasiona el defecto de sabor "agrio" en el queso Cottage; (2) permite crecer rápidamente al Leuconostoc cremoris en asociación con ella; y (3) retiene la propiedad de producción de diacetilo y la actividad inhibidora de su afín.

La cepa NRRL-B-8177 está caracterizada por el hecho de que produjo $4,5 \times 10^8$ unidades que forman placa por ml (UFP/ml) cuando se enfrentó con un fago de la cepa 18-16 WT. La cepa 18-16 WT produjo $6,5 \times 10^8$ UFP/ml. El fago, por consiguiente, sólo es eficaz en un 69% contra el mutante NRRL-B-8177; sin embargo, ello muestra que la cepa de mutante procede de la 18-16 WT. La cantidad de diacetilo producido por NRRL-B-8177 es relativamente baja cuando se mide mediante el método de Pack y otros (J. Dairy Science, Vol. 47, páginas 981-986 (1964)), basado en la medida espectrofotométrica de absorción por un complejo coloreado producido por el diacetilo y reactivos químicos específicos. La cepa NRRL-B-8177 mostró 0,25 ppm de diacetilo en comparación con la 18-16 WT con 0,65 ppm de diacetilo después de 18 horas a 21°C. La cepa 8177 crece fácilmente en un medio nutriente adecuado para Streptococcus diacetylactis hasta cuentas de células superiores a $1,0 \times 10^9$ y tiene buena estabilidad por congelación en presencia de glicerina. Tiene una capacidad de utilización de lactosa relativamente baja y por tanto produce rela

tivamente poca acidez en leche (aproximadamente la mitad que la cepa 18-16 WT). Era equivalente a la 18-16 WT respecto a la inhibición de Alcaligenes viscolactis; Pseudomonas fluorescens; P. viscosa y P. aeruginosa a 7,2°C.

5

PROCEDIMIENTO MUTAGENO Y PREPARACION DE COMPOSICIONES

El procedimiento mutágeno escogido es el más sencillo conocido. Se escogió incubación a temperatura elevada para obtener un mutante de baja capacidad de producción de ácido. El grupo de Streptococcus lácticos al que pertenece el S. lactis, subespecie diacetylactis, está constituido por miembros del género Streptococcus, que se diferencian, entre otras características, por su capacidad para iniciar el crecimiento a 10°C y su incapacidad para iniciar el crecimiento (aumento de números) a 45°C. Basándose en esta premisa, se escogió la incubación a 45°C para inducir la mutación deseada.

10

15

n20

Un cultivo recién propagado de la cepa 18-16 Wild-Tipo, se hizo pasar a 100 ml de leche seca sin grasa reconstituida, al 11% (P/V), estéril, que había sido templada a 45°C durante 20 minutos por lo menos. El grado de inoculación fue de 5% (V/V). Después de mantener a 45°C durante 3 días, el cultivo se extendió en placa (mediante la técnica de siembra superficial) sobre el agar diferencial con lactosa de Reddy (Tesis de M.S., Universidad del Estado de Iowa, Ames, Iowa (1971), página 45), previamente vertido.

25

30

El agar de Reddy diferencia entre bacterias capaces de producción rápida de ácido y de producción lenta de ácido o no producción, partiendo de la lactosa disacárid

do (que es el principal hidrato de carbono en los productos lácteos). El medio contiene niveles bajos de sustancias proteicas, extracto de levadura, lactosa, un tampón difusible en forma de hidrogenofosfato dipotásico, un tampón no difusible en forma de carbonato de calcio, agar, carboximetilcelulosa, un indicador de pH para poner de manifiesto la producción de ácido por colonias individuales, en forma de púrpura de bromocresol (zona ácida-amarillo, zona neutra y alcalina-violeta) y agar de calidad bacteriana. El pH del agar era de $6,8 \pm 0,1$ y el color del agar a este pH es violeta. El Streptococcus diacetylactis que produce ácido con rapidez, al desarrollarse en este agar, da lugar a grandes colonias coloreadas de amarillo con una zona amarillenta circundante (debido a cambio de color del indicador). Las bacterias que no producen ácido forman colonias blancas o incoloras o translúcidas. Las bacterias que producen ácido lentamente forman colonias amarillas muy pequeñas. Este agar permite por tanto la diferenciación y selección de células (colonias) que no producen ácido, lo producen con rapidez o lo producen lentamente, a partir de un cultivo dado. Para la formación rápida de colonias, las placas sembradas en la superficie, se incuban en una atmósfera de CO_2 a $32^{\circ}C$.

DESCRIPCION ESPECIFICA

Como primera etapa, se aisló un mutante de S. diacetylactis 18-16, de baja capacidad de producción de ácido (con respecto al WT). Esto se efectuó del siguiente modo:

(1) Un cultivo en leche de la cepa WT se separó de la reserva en nitrógeno líquido, y se propagó una vez

en leche seca sin grasa reconstituida (LSSG), estéril, al once por ciento (11%) (16 horas a 22°C).

(2) Este cultivo se usó para inocular 100 ml de LSSG reconstituida, estéril, al once por ciento (11%) en la proporción de uno por ciento (1%). El cultivo en 100 ml de leche se incubó a 22°C durante 16 horas.

(3) Un inóculo al 5,0% procedente de (2) se transfirió a otro frasco que contenía 100 ml de LSSG reconstituida, estéril, al once por ciento (11%) que había sido templada a 45°C durante 20 minutos por lo menos. Después de la transferencia, el frasco se devolvió a 45°C y se mantuvo en el incubador de 45°C durante 72 horas.

(4) Al cabo de 3 días a 45°C, el cultivo se comprobó para determinar diacetil-acetoína mediante el Ensayo de King (N King, como se describe en Dairy Industry 13: 860 (1948)), para una reacción positiva como medida de crecimiento. El cultivo se sembró después en placa mediante la técnica de siembra superficial sobre el agar diferencial con lactosa de Reddy antes descrito, a diluciones comprendidas entre 1×10^{-2} y 1×10^{-7} . Las placas fueron incubadas en un recipiente lleno con dióxido de carbono (Bio-Quest Gas-Pak) a 32°C durante 4 días.

(5) Después de 4 días, fueron examinadas las placas. Se apreciaron en placas sembradas con dilución 1×10^{-3} varias colonias amarillas discretas (indicativas de producción normal de ácido) y algunas colonias incolóras, transparentes, grandes. Las colonias transparentes fueron marcadas y una porción pequeña de una de tales colonias fué pinchada con una aguja y se hizo una extensión microscópica. La extensión microscópica mostró que la colonia

estaba constituida por cocci. Cocci relativamente grandes (en comparación con células de WT) se encontraban presentes en parejas y cadenas muy cortas.

(6) La porción restante de la colonia examinada al microscopio se hizo pasar a un tubo de ISSG reconstituida, estéril, al once por ciento (11%), se incubó a temperatura ambiente durante 72 horas y al término de la incubación se examinó al microscopio. Las células eran típicamente las de Streptococci lácticos en parejas o cadenas cortas. El cultivo de mutante falló en coagular leche incluso después de 72 horas. La cepa de WT coagula habitualmente la leche después de 48 horas.

(7) El cultivo en leche de 72 horas fue ensayado para determinar diacetil-acetoína mediante el Método de King, que dió reacción positiva. Los resultados se muestran en la Tabla I.

TABLA I

Cepa	Ensayo de King
WT	++++
NRRL_B-8177	++

(8) Para estar seguros de que el cultivo aislado era realmente un productor lento de ácido de baja cantidad de ácido, un inóculo de diez por ciento (10%) del cultivo aislado se hizo pasar a otro tubo con leche estéril y se incubó a temperatura ambiente junto con otro tubo al que se añadió inóculo de uno por ciento (1%) de cultivo de WT. Los resultados se muestran en la Tabla II.

TABLA II

Coagulación (Temperatura ambiente)

Cepa	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
18-16 (inóculo de 1%)	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
NRRL-B-8177 (Inóculo de 10%)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

5

10

Esto mostró que el aislado es relativamente un productor lento de ácido a pesar del inóculo usado, 10 veces mayor.

15

(9) Una porción de los cultivos procedentes de (8) fueron ensayados para determinar diacetil-acetoína con respecto a la cepa de WT. El aislado produjo diacetil-acetoína.

20

(10) Dos asas de los cultivos procedentes de (8) fueron inoculadas en dos tubos separados que contenían medio diferencial de Reddy y otros (J. Milk Food Technology, Volumen 34, páginas 43-45 (1971)), se incubó a 32°C durante 72 horas y se examinó. Los resultados se indican en la Tabla III.

25

TABLA III

Cepas	Color	Gas	NH ₃ por reactivo de Nessler (1)	Crecimiento
18-16	violeta	+++	+++	+++
NRRL-B-8177	violeta	+++	+++	+++

30

(1) El reactivo de Nessler se describe en Handbook of Chem. and Physics, Chemical Rubber Co., 42ª Edición (1960), en la página 1653.

(11) Se usaron cultivos procedentes de (8) para efectuar un ensayo arbitrario de actividad (actividad de producción de ácido) en leche, como se describe por Horral y Elliker en J.Dairy Science, Volumen 30, página 523 (1947). La temperatura de la leche es de 37,7°C y el tiempo de incubación de 5 1/2 horas. Los resultados se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV

Cepa	% de acidez después de 5 $\frac{1}{2}$ horas a 37,7°C (inóculo de 10% en ² leche de Horral y Elliker)
18-16	0,41%
NRRL-B-8177	0,23%

Estos resultados indicaron que el aislado es un mutante de la cepa 18-16 WT de baja capacidad de producción de ácido.

La preparación de los concentrados de NRRL-B-8177 puede llevarse a cabo como se describe en las Patentes de Estados Unidos Reexpedidas Nos. 28.276 y 28.488.

Se usa para cultivar las células un medio nutritivo para el crecimiento de *S.diacetilactis* 18-16, convencional. Algo del medio nutriente se encuentra presente con las células incluso si se concentran hasta obtener una pasta de aproximadamente 10^{15} células por ml y por tanto el medio

debe ser aceptable para alimentos para consumo humano. Se usan en el medio nutriente leche descremada o derivados de la misma para ayudar al crecimiento de las células. No se excede un nivel de leche descremada de aproximadamente veinte por ciento en peso (20%) en la mezcla de fermentación, para facilitar la separación de las células bacterianas de la mezcla de fermentación y se usa preferiblemente menos de diez por ciento (10%) de leche descremada. El ácido generado durante el crecimiento celular se neutraliza, de preferencia continuamente, de tal modo que el fermentado final tiene un pH comprendido entre aproximadamente 6,0 y 7,0. Las células se concentran de preferencia, habitualmente con una centrífuga, para separar algo o la totalidad del líquido. Son conocidas otras técnicas para la separación de componentes indeseados y la concentración de la mezcla de fermentación, tal como mediante diálisis. Los concentrados contienen preferiblemente por lo menos aproximadamente 1×10^9 células por ml, y de preferencia entre 100 y 300×10^9 células por ml para la separación de algo del medio nutriente de cultivo. Los concentrados son congelados preferiblemente con un agente de estabilización de la congelación, tal como un alcohol polivalente (glicerina), leche descremada o derivados de leche descremada para su almacenamiento y transporte antes del uso por el industrial lechero y se encuentran comercialmente disponibles.

QUESO COTTAGE

En el queso cremoso Cottage, el S. diacetilactis NRRL-B-8177 mutante a menos de 10°C, crece lentamente y genera una concentración muy baja de ácido láctico; no

obstante, la temperatura de conservación debe estar comprendida entre 4,4 y 7,2°C para una estabilidad de aproximadamente 28 días o menos. Muy poco ácido se genera en este periodo a estas temperaturas. Asimismo, incluso cuando la temperatura asciende hasta 10 - 16°C, como puede ocurrir durante periodos cortos en la distribución comercial, el mutante produce muy poco ácido.

El Streptococcus diacetylactis 18-16, tiene la capacidad conocida de inhibir organismos corruptores en el queso Cottage durante un periodo substancial de almacenamiento. Esta característica general se discute en un trabajo publicado en el Journal of Milk and Food Technology, Vol. 35, No.6, páginas 349-357 (junio 1972) y en una publicación titulada "Crecimiento competitivo de Streptococcus Diacetylactis en Cultivos Lácticos de Cepas Mixtas y Queso" Band D des XVII, Internationalen Milchwirtschafts kongresses Sección D 2, páginas 611-618 (1966).

El Streptococcus diacetylactis NRRL-B-8177 comparte esta característica con su afín aun cuando produce menos ácido.

Es sabido que el acetaldehído es un sub-producto de la acción fermentativa del S. diacetylactis sobre sistemas lactosa-citrato en leche. Cuando se acumula acetaldehído en cantidades relativamente grandes, ello ocasiona un defecto de sabor, llamado "crudo", en queso Cottage y ciertos otros productos lácteos fermentados. El defecto de sabor "crudo" se evita o elimina utilizando concentrados de Leuconostoc cremoris ó Leuconostoc dextranicum mezclados con concentrados de S. diacetylactis según se describe en la Solicitud de Patente No. 639.052. El L. cremoris

en especial posee (en términos relativos) alta actividad de alcohol-deshidrogenasa lo que permite que el organismo separe o elimine el acetaldehído en exceso generado por el S.diacetilactis NRRL-B-8177 en la mezcla que contiene crema, evitando de este modo el defecto de sabor "crudo". El S.diacetilactis NRRL-B-8177 no suprime estas bacterias de sabor. Asimismo, usando L.cremoris ó L.dextranicum con NRRL-B-8177, el Leuconostoc puede ser usado a niveles de 10^6 células por gramo de queso Cottage y el NRRL-B-8177 a niveles de 10^4 ó 10^5 células por gramo de queso Cottage para asegurar que la acidez se mantiene en un nivel bajo.

La fortificación de la mezcla que contiene crema con citratos solubles, que se encuentran de modo natural en la leche, junto con los concentrados bacterianos, proporciona una producción adicional de diacetilo. Esta es una reacción conocida en la técnica anterior.

DESCRIPCION ESPECIFICA

Los Ejemplos 1, 2 y 3 muestran el método preferido para la preparación de queso cremoso Cottage usando S.diacetilactis NRRL-B-8177.

Ejemplo 1

Se usó un concentrado congelado de S.diacetilactis NRRL-B-8177 preparado a partir de leche descremada como se describe en la Patente de Estados Unidos Reexpedida No. 28.276. La leche descremada se encuentra presente en la mezcla de fermentación a un nivel de 1,0% en peso. La mezcla de fermentación se neutralizó continuamente con amoníaco gaseoso anhidro. La mezcla de fermentación se cer

5 -trifugó produciendo un concentrado que contenía aproximada-
mente 150 a 250×10^9 células por ml, se mezcló con diez
por ciento (10%) en peso de glicerina como agente estabi-
lizador de congelación, y se congeló a $-28,9^{\circ}\text{C}$ antes de su
uso. El concentrado se descongeló para usarle en agua tem-
plada clorada ($37,8^{\circ}\text{C}$; por lo menos 100 ppm de cloro dispo-
nible) durante menos de 30 minutos.

10 Una mezcla que contiene crema, pasteurizada,
de 4 partes en volumen de leche descremada y 6 partes de
crema de grasa de leche al veinte por ciento (20%), se en-
frió a una temperatura de $4,4^{\circ}\text{C}$. El concentrado se inter-
puso con la mezcla que contiene crema en la proporción de
170 gramos de concentrado por 757 litros de mezcla que con-
tiene crema, durante un periodo de 30 minutos sin dejar
15 que la temperatura subiera por encima de 10°C . La mezcla
que contiene crema se aplicó inmediatamente a cuajada de
queso Cottage escurrida, lavada y enfriada, y se empaque-
tó. Los paquetes se almacenaron a $4,4^{\circ}\text{C}$ a temperatura in-
ferior. Se desarrolló un sabor notable (diacetilo) entre
20 72 y 96 horas a la temperatura de almacenamiento.

25 El queso cremoso Cottage resultante tenía un
excelente sabor, sin sabor ácido agrio, y a la vez tenía
una estabilidad de 28 días sin mostrar señales del creci-
miento de organismos corruptores que se encuentran presen-
tes habitualmente en pequeñas cantidades en el producto em-
paquetado.

Ejemplo 2

30 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 1 ex-
cepto que se añadió a la mezcla que contiene crema un con-

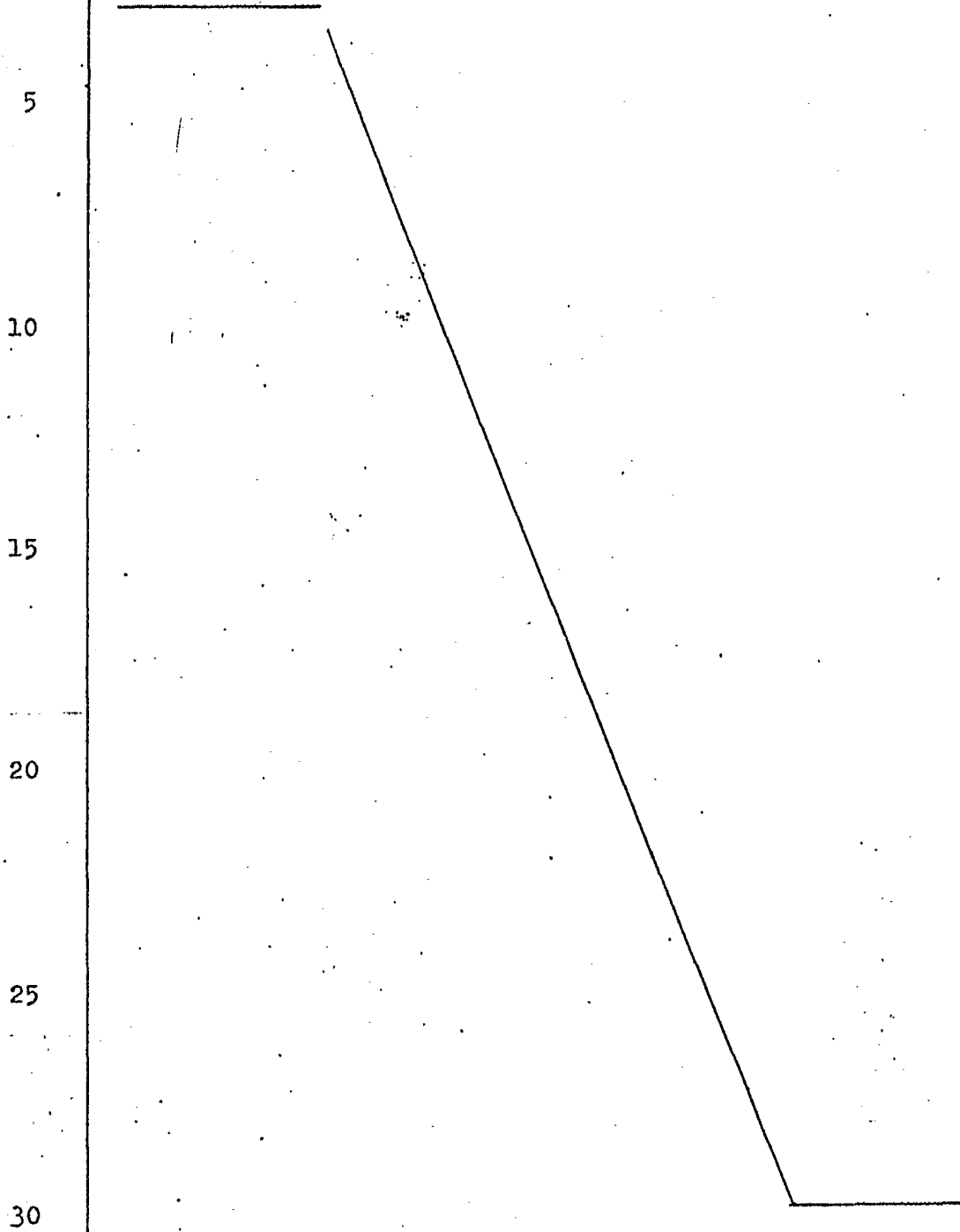
centrado de aproximadamente 1×10^{10} células por ml de Leu-
conostoc cremoris en la proporción de una parte por parte
de S. diacetilactis NRRL-B-8177. El resultado fue un queso
cremoso Cottage de sabor excelente sin sabor agrio o "cru
do". Se desarrolló un sabor notable cuando se almacenó a
4,4°C dentro de 24 horas.

Ejemplo 3

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 1 ex-
cepto que se añadió una solución de citrato de sodio en la
proporción de 7570 cc por 757 litros de mezcla que contie-
ne crema, para mejorar el sabor. La solución de citrato
se preparó disolviendo 680 gramos de la sal en 7570 cc de
agua. Se desarrolló un sabor notable en el queso Cottage
dentro de 24 horas cuando se almacenó a 4,4°C. El produc-
to tenía un sabor excelente debido a la acción aumentada
de las bacterias sobre el citrato añadido para producir
diacetilo.

Como puede apreciarse de los Ejemplo 1 a 3,
las composiciones de la presente invención que incluyen
NRRL-B-8177 son superiores para la producción de queso Co-
ttage bueno. Se verá que el NRRL-B-8177 podía ser mezcla-
do con la cuajada fría antes de añadir la mezcla que con-
tiene crema; sin embargo, no se prefiere esto. Las compo-
siciones bacterianas pueden ser formas concentradas o sin
concentrar con el medio nutriente de crecimiento. También
las células pueden ser liofilizadas, no obstante tampoco
ésto es preferido debido al efecto dañino de la liofiliza-
ción. Es posible asimismo usar el Streptococcus diacetilac-
tis mutante como profiláctico en otros productos debido a

—su baja producción de ácido y su aptitud para inhibir bacterias corruptoras.



REIVINDICACIONES

5 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10 1ª.- Un método para la preparación de alimentos proporcionando Streptococcus diacetilactis mezclado con el alimento, caracterizado porque se proporciona en el alimento Streptococcus diacetilactis NRRL-B-8177, que es un mutante de Streptococcus diacetilactis 18-16 WT, mezclado con un medio nutriente, a una cuenta de células que es
15 por lo menos suficiente para actuar como profiláctico inhibiendo bacterias corruptoras.

20 2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que las bacterias se encuentran presentes en el alimento a una cuenta de células de aproximadamente 10^4 células por gramo, por lo menos.

25 3ª.- En un método según la reivindicación 1ª para la preparación de queso cremoso Cottage como alimento, proporcionando Streptococcus diacetilactis mezclado con la cuajada y crema, la mejora que comprende inocular el queso Cottage con un nivel de cuenta de células de Streptococcus diacetilactis NRRL-B-8177 suficiente para comunicar sabor después de un periodo de tiempo a temperaturas de almacenamiento frías, así como para proporcionar profilaxis del queso Cottage.

30 4ª.- Un método según la reivindicación 3ª, en

1 el que la inoculación del queso Cottage se efectúa a una temperatura de menos de 10°C aproximadamente.

5 5a.- Un método según las reivindicaciones 3a y 4a, en el que la inoculación se efectúa en una cantidad de entre aproximadamente 10^4 y 10^8 células por gramo de queso Cottage.

6a.- UN METODO PARA LA PREPARACION DE ALIMENTOS.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de dieciocho hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 14. MAR 1978

P.A.

~~Fernando de Itzaburu~~
Por Poder.


07038
VGD.