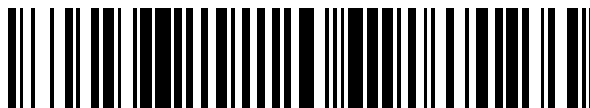


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 628**

21 Número de solicitud: 201131615

51 Int. Cl.:

A23C 19/032 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

07.10.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.04.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA
(100.0%)**

**Plaza de la Universidad, 2
02071 Albacete ES**

72 Inventor/es:

**SESEÑA PRIETO, Susana;
PALOP HERREROS, M^a Llanos;
POVEDA COLADO, Justa M^a;
CABEZAS REDONDO, Lourdes y
NIETO ARRIBAS, Pedro David**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **CULTIVO INICIADOR PARA LA ELABORACIÓN DE QUESO.**

57 Resumen:

La invención describe un cultivo iniciador formado por tres cepas de bacterias lácticas autóctonas seleccionadas de la especie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, CECT 7883 y CECT 7884, y de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, CECT 7882, aisladas de queso artesanal de leche de oveja manchega que, al ser incorporadas como un cultivo iniciador en determinadas proporciones, confiere a los quesos Manchegos elaborados con leche pasteurizada propiedades sensoriales características de esta variedad de queso muy similares a las de los quesos artesanales. Las cepas mantienen sus características bioquímicas tras ser sometidas a los procesos de liofilización necesarios para su producción industrial. La invención protege también el procedimiento de obtención del queso, el queso mismo y las cepas de las bacterias utilizadas.

Perfil sensorial gustativo

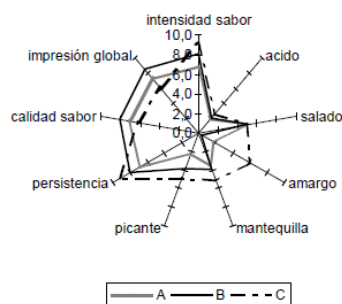


Fig. 6

DESCRIPCIÓN

Cultivo iniciador para la elaboración de queso.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5

La invención describe un cultivo iniciador formado por tres cepas de bacterias lácticas de las especies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* autóctonas seleccionadas, capaces de implantarse en la maduración de quesos y que proporcionan a los quesos Manchegos industriales características organolépticas semejantes a las de los quesos artesanales. La invención es de aplicación para el sector quesero en general y para las queserías inscritas en la Denominación de Origen Queso Manchego, distribuidas por Ciudad Real, Toledo, Cuenca y Albacete.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El Queso Manchego puede ser elaborado con leche cruda de oveja de la raza "Manchega", denominándose "artesanal", o con leche pasteurizada denominándose entonces "industrial". Estos dos tipos de quesos presentan unas características sensoriales muy diferentes.

15

En la elaboración artesanal la microbiota espontánea presente en la leche es la encargada de llevar a cabo el proceso de fermentación. Es además responsable de las reacciones bioquímicas que ocurren durante el proceso de maduración, que proporcionan las características organolépticas propias de los diferentes tipos de queso. No obstante, la acidificación espontánea de la leche puede llevar en ocasiones a la obtención de un producto final de características no uniformes o con defectos o alteraciones no deseadas. Además, la posible presencia en la leche cruda de microorganismos patógenos contaminantes ha llevado a un incremento en la utilización de leche pasteurizada en la elaboración de quesos y al empleo de cultivos iniciadores o "starters".

20

La adición de cultivos iniciadores a la leche pasteurizada permite fabricar quesos seguros desde el punto de vista sanitario, correctamente acidificados y con unas características organolépticas de sabor y de aroma determinadas por los microorganismos que lo conforman.

25

La elaboración con leche pasteurizada permite obtener quesos con buenas características de salubridad, pero con menor intensidad del sabor y del aroma que los elaborados con leche cruda (Lau et al.: Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in Cheddar cheese during aging. Journal of Dairy Science 74, 727-740, 1991). Por el contrario, los quesos elaborados con leche cruda desarrollan un sabor más intenso, madurando además de forma más rápida (Gaya et al.: Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: the effect of elevated ripening temperatures. Journal of Dairy Science 73, 26-32 1990).

30

La microbiota del queso puede clasificarse en dos grupos: las llamadas bacterias iniciadoras o starter, responsables de la producción de ácido láctico durante la elaboración del queso, y las denominadas bacterias non-starter o NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria), presentes en el queso durante la maduración, y que aunque no contribuyen de forma relevante a la producción de ácido láctico, producen compuestos que mejoran el aroma y el sabor del queso. Estas cepas también se conocen como cepas adjuntas.

35

Dentro del primer grupo se encuentran las bacterias del género *Lactococcus*, que es el que con mayor frecuencia forma parte de los cultivos iniciadores y que constituye la microbiota predominante al inicio de la maduración en la mayoría de los quesos, con recuentos superiores a 10^9 ufc/g. Su elevada actividad acidificante asegura la transformación de la lactosa residual en ácido láctico y algunas especies producen además, pequeñas cantidades de compuestos secundarios que contribuyen al aroma del queso.

40

45

El grupo de las bacterias NSLAB está constituido fundamentalmente por especies mesófilas del género *Lactobacillus*, fundamentalmente por *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* y *Lb. curvatus*. Estas bacterias se encuentran en elevados recuentos en el queso maduro, en torno a 10^8 ufc/g, motivo por el que se piensa que deben desempeñar alguna función importante durante la maduración. La adición a la leche pasteurizada de cepas definidas de lactobacilos mesófilos como adjuntos de las cepas de *Lactococcus* utilizadas como iniciadoras puede contribuir a la maduración del queso, acelerar la formación de aminoácidos libres, intensificar el sabor y el aroma y reducir la acumulación de péptidos amargos en el queso. Si bien todas las cepas no contribuyen de igual forma o de forma satisfactoria.

50

En la técnica se ha descrito la utilización de cepas de lactobacilos como adjuntos de las cepas de *Lactococcus* iniciadoras, con producción de compuestos amargos y sabores desagradables (McSweeney et al.: "A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality". Irish Journal of Agricultural and Food Research 33,183-192 (1994).

55

Poveda et al. ensayaron la adición de una cepa de *Lb. plantarum* autóctona como adjunto de un cultivo iniciador también constituido por bacterias lácticas autóctonas aisladas de quesos Manchegos artesanales, en lo que supone la publicación más cercana a la presente invención (Poveda et al.: "Preliminary observations on proteolysis in Manchego

60

5 cheese made with a defined strain starter culture and adjunct starter (*Lactobacillus plantarum*) or a commercial mixed strain starter". International Dairy Journal, 13, 169–178, 2003). Los quesos elaborados con estas bacterias autóctonas presentaron unas características sensoriales aceptables, si bien no se pudieron atribuir estas propiedades a las cepas de bacterias lácticas que habían sido inoculadas o ensayadas ya que no habían sido previamente caracterizadas molecularmente ni tecnológicamente, ni tampoco se realizó en ese ensayo un estudio de implantación de las mismas durante la maduración de los quesos.

10 Es importante indicar que las propiedades de las bacterias son cepa-dependientes; es decir, que resulta imposible predecir *a priori* el comportamiento de una determinada cepa en la maduración del queso a partir del comportamiento de otras filogenéticamente relacionadas. Propiedades como la producción de aminos biógenos, el distinto grado de implantación en el queso y la resistencia a tratamientos como la liofilización y el almacenamiento durante largos periodos de tiempo son características propias de cada cepa y los resultados para unas cepas no son extrapolables a otras incluso de la misma especie, además de que tampoco han podido ser sugeridos en los resultados recogidos en la técnica para otras cepas. Por otro lado, probar el comportamiento de todas las cepas identificadas del mismo género conllevaría un trabajo inabordable para un experto, tanto por la infinidad de posibles cepas a identificar como por el número de posibles combinaciones de las mismas, sin expectativa razonable de éxito en la búsqueda de cepas con las propiedades de las descritas en la presente invención. De forma que el cultivo iniciador de la invención ha resultado un descubrimiento del todo sorprendente.

20 Por otra parte, hay que tener en consideración que el comportamiento de las cepas durante la maduración del queso puede variar cuando actúan de forma individual respecto a cuando las cepas se usan en combinación con otras, y dependerá asimismo de la cantidad o proporción en la que cada una de ellas participe.

25 Dentro del sector quesero existen en la técnica cultivos iniciadores para la elaboración de quesos de pasta prensada semiduros como es el caso del Queso Manchego. Estos cultivos no proceden de la microbiota autóctona de la leche de oveja de raza manchega ni del propio queso Manchego y los quesos elaborados con ellos presentan características sensoriales muy diferentes respecto a los elaborados con leche cruda, con un sabor y aroma menos intensos y con una menor variedad de notas sensoriales, madurando además de forma más lenta. Por otra parte, el empleo de cultivos iniciadores comerciales, compuestos exclusivamente por cepas del género *Lactococcus* que no son procedentes o no forman parte de la microbiota autóctona del Queso Manchego, conlleva una pérdida de biodiversidad.

30 El problema técnico que se plantea entonces en la técnica es poder dotar a los quesos Manchegos industriales de características organolépticas propias de los quesos artesanales, en un proceso de elaboración apto a escala industrial en la Industria Quesera. La solución propuesta por la presente invención es la utilización de un cultivo iniciador compuesto por las tres cepas autóctonas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7883, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7884 y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

40 La realización principal de la invención es un cultivo iniciador compuesto por las cepas de bacterias lácticas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el código CECT 7883, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el código CECT 7884 y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el código CECT 7882. Esta última actúa como adjunto de las dos cepas iniciadoras anteriores.

45 En el ámbito de la presente solicitud se entiende por "cultivo iniciador" aquel cultivo constituido por una o varias cepas de bacterias lácticas que se inoculan en la leche pasteurizada al objeto de iniciar la fermentación, y opcionalmente por otras cepas adjuntas para la producción de compuestos responsables principales de las características organolépticas del queso.

50 En el ámbito de la presente solicitud se entiende por "cepa iniciadora" aquella cepa iniciadora de la fermentación láctica de la leche para la elaboración de queso. La cepa que se define como "adjunto" no es responsable principal de la fermentación láctica pero contribuye a la maduración del queso y es determinante de sus propiedades organolépticas finales. La "maduración" se define como el conjunto de las subsecuentes transformaciones físicas, químicas, microbiológicas y enzimáticas que suceden en el queso desde que está recién elaborado hasta que presenta las características organolépticas deseadas y propias de la variedad.

55 Las cepas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7883 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7884 presentan una gran actividad acidificante: disminuyen el pH 0,32 unidades tras 6 h y alrededor de 2 unidades tras 24 h. Tienen también un gran potencial de producción de diacetilo y no presentan capacidad aminobiogénica. Se ha comprobado la implantación de las mismas justo tras la inoculación en la leche y en las primeras etapas de la maduración del queso, momento en el que la producción de ácido debe ser más rápida, para favorecer así que el proceso transcurra de forma adecuada.

60 La cepa *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882 posee una gran actividad proteolítica y aminopeptidásica, actividades que son de gran interés en la producción de compuestos responsables de sabores y aromas deseables durante la maduración del queso. Muestra una importante capacidad de autólisis, lo que tiene una gran relevancia, ya

que tras la ruptura de la membrana celular se liberan enzimas intracelulares que actuarán sobre los componentes del queso contribuyendo a acelerar la maduración. Por otro lado, estas cepas no presentan capacidad aminobiogénica. Su capacidad de implantación cuando se utilizó en la elaboración de quesos fue elevada, pudiendo constatarse la presencia de esta cepa en el queso en todas las fechas de maduración estudiadas.

Una realización preferible de la invención es que en el cultivo iniciador la concentración de las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7883 y CECT 7884 sea independientemente entre el 20 y el 30% respecto de las cepas totales del cultivo, preferiblemente del 25%. Otra realización preferible es que la concentración de la cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882 sea de entre el 45 y el 55% respecto de las cepas totales del cultivo, preferiblemente del 50%. Es decir, las tres cepas en una proporción de 1:1:2, respectivamente.

En el proceso industrial, los cultivos iniciadores se preparan a partir de cultivos liofilizados, de forma que una realización preferible es el cultivo iniciador de la invención que procede de un cultivo liofilizado. Y otra realización es un cultivo liofilizado que comprende las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo con los códigos CECT 7883 y CECT 7884, y la cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* depositada con el código CECT 7882.

La invención también comprende el procedimiento de obtención del queso. Así que una realización más es un procedimiento de elaboración de un queso que comprende inocular en leche de oveja Manchega una cantidad efectiva de las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7883 y CECT 7884 como iniciadoras, y de la cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882 como adjunto. La inoculación de estas cepas puede ser conjunta en un cultivo iniciador o bien secuencial, y la leche en la que se inoculan es preferiblemente leche pasteurizada o también preferiblemente leche cruda.

Una realización muy preferible de la invención es el queso obtenido por un procedimiento que comprende fermentación de leche de oveja Manchega en presencia de las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7883 y CECT 7884, y de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882. Otra realización preferible es el queso obtenido por el procedimiento de la invención, que contiene la cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882 viva.

Las propias cepas también forman parte de la invención. Así, una realización es la cepa de bacteria láctica de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el código CECT 7883, otra realización es la cepa de bacteria láctica de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el código CECT 7884, y otra realización más es la cepa de bacteria láctica de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el código CECT 7882.

En la presente solicitud se muestran los resultados de un estudio comparativo de los quesos Manchegos elaborados con leche pasteurizada a la que se añadía un starter comercial mesófilo, compuesto por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (lote A), quesos elaborados con leche pasteurizada a la que se añadía el cultivo iniciador de la invención (lote B) y quesos artesanales elaborados con leche cruda sin adición de cultivo alguno (lote C).

Se efectuaron recuentos microbiológicos en la leche pasteurizada tras la inoculación empleada en la fabricación de los quesos A y B y en la leche cruda en el caso de los quesos artesanales (C); en la cuajada y en los quesos en distintos tiempos de maduración. Los recuentos de lactococos fueron similares en los tres lotes de quesos (Figura 1), mientras que los recuentos de lactobacilos fueron más elevados en los quesos elaborados con el starter motivo de la invención (lote B) que contiene la cepa *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882, que en los quesos elaborados con el starter comercial (lote A) y también superiores a los quesos elaborados con leche cruda (lote C).

Los distintos análisis químicos efectuados a lo largo de la maduración en los quesos elaborados con el cultivo iniciador de la invención muestran un valor de pH al final de la maduración inferior al de los quesos artesanales e inferior al de los elaborados con el cultivo iniciador comercial (Figura 2) y un mayor nivel de proteólisis, a la vista de los valores de la fracción del N-PTA (Figura 3), que los quesos elaborados con el cultivo comercial.

Los quesos elaborados con el cultivo de la invención han presentado además una mayor producción de la mayoría de los aminoácidos libres analizados que los quesos del cultivo comercial y superiores también a los quesos de leche cruda (Figura 4), lo cual también es indicativo de una mayor proteólisis. Por otro lado, estos quesos del lote B también han presentado una mayor concentración de algunos compuestos volátiles responsables de determinados aromas deseables en los quesos, como ácidos grasos de cadena corta, cetonas y lactonas, entre otros (Tabla 1), respecto a los quesos de los otros dos lotes A y C.

Tabla 1: Concentración de diferentes compuestos volátiles ± desviación estándar en las muestras de queso Manchego a los 8 meses de maduración (A: cultivo comercial mesófilo; B: cultivo iniciador de la invención; C: leche cruda).

Compuestos (mg/Kg queso)	Lote					
	A		B		C	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Aldehidos						
Hexanal	0,066 ^b	0,005	0,075 ^b	0,005	0,039 ^a	0,004
Octanal	0,019 ^b	0,003	0,000 ^a	0,000	0,000 ^a	0,000
Nonanal	0,084	0,020	0,129	0,011	0,090	0,014
2-Octenal	0,024 ^b	0,006	0,000 ^a	0,000	0,000 ^a	0,000
3-Metiltiopropanal	0,026 ^a	0,004	0,028 ^a	0,001	0,046 ^b	0,004
2-nonenal	0,074 ^b	0,019	0,041 ^{a,b}	0,003	0,026 ^a	0,000
Decanal	0,072	0,007	0,105	0,013	0,090	0,007
2,4-Nonadienal	0,019 ^a	0,004	0,060 ^b	0,009	0,028 ^a	0,003
2,4-decadienal	0,160 ^b	0,034	0,169 ^b	0,017	0,010 ^a	0,000
Hexadecanal	0,727 ^b	0,032	0,450 ^a	0,013	1,127 ^c	0,131
Cetonas						
2-Heptanona	1,633 ^b	0,180	1,740 ^b	0,031	1,233 ^a	0,001
Acetoína (3-hidroxi-2-butanona)	0,190 ^a	0,022	1,265 ^b	0,198	0,093 ^a	0,007
2-Nonanona	0,869	0,079	0,876	0,043	0,826	0,026
2-Decanona	0,027	0,032	0,004	0,000	0,004	0,000
Alcoholes						
3-Metil-1-butanol	0,073 ^a	0,000	0,129 ^a	0,008	1,781 ^b	0,031
2-Heptanol	0,068 ^a	0,005	0,093 ^a	0,006	0,166 ^b	0,021
3-Metil-2-buten-1-ol	0,032	0,007	0,042	0,004	0,029	0,003
1-Hexanol	0,017	0,005	0,016	0,005	0,033	0,006
2-Etil-1-hexanol	0,017 ^a	0,004	0,027 ^b	0,002	0,016 ^a	0,001
1-Octanol	0,020 ^a	0,002	0,029 ^b	0,002	0,029 ^b	0,001
Nonanol + 1,3-dimetoxibenzeno	0,071 ^b	0,010	0,081 ^b	0,019	0,000 ^a	0,000
Decanol	0,108 ^b	0,005	0,073 ^a	0,005	0,072 ^a	0,004
Ésteres						
Etil lactato	0,007 ^a	0,002	0,030 ^b	0,002	0,050 ^c	0,003
Etil octanoato	0,071 ^a	0,002	0,099 ^a	0,003	1,478 ^b	0,062
Metil decanoato	0,565 ^b	0,052	0,175 ^a	0,034	0,500 ^b	0,039
Metil benzoato	0,027 ^b	0,004	0,012 ^a	0,001	0,014 ^a	0,002
Etil decanoato	0,333 ^a	0,046	0,383 ^a	0,001	4,646 ^b	0,389
Etil dodecanoato	0,133	0,036	0,084	0,018	0,142	0,008
Metil tetradecanoato	0,006	0,001	0,020	0,014	0,021	0,004
Derivados del Terpeno						
Fenchona	0,032	0,006	0,028	0,002	0,040	0,001
Óxido de linalool	0,000 ^a	0,000	0,007 ^b	0,001	0,000 ^a	0,000
Linalool	0,010 ^a	0,001	0,023 ^b	0,002	0,010 ^a	0,002
Endoborneol	0,012 ^a	0,003	0,018 ^a	0,002	0,228 ^b	0,024
Ácidos						
Ácido Butanoico	1,467 ^b	0,080	2,706 ^c	0,055	1,103 ^a	0,100
Ácido Isovalérico	0,232 ^a	0,044	0,775 ^c	0,045	0,452 ^b	0,053
Ácido Hexanoico	4,647 ^a	0,134	5,408 ^a	0,681	9,335 ^b	0,109
Ácido Octanoico	19,598 ^b	1,630	11,356 ^a	0,006	25,859 ^c	1,174
Ácido Nonanoico	0,091 ^a	0,001	0,077 ^a	0,013	0,134 ^b	0,005
Ácido Decanoico	42,959 ^b	1,798	25,562 ^a	0,187	59,230 ^c	1,166

ES 2 401 628 A1

Ácido Undecanoico	0,178 ^a	0,018	0,295 ^b	0,023	0,672 ^c	0,018
Ácido Benzoico	0,066 ^a	0,006	0,238 ^b	0,022	0,209 ^b	0,033
Ácido Dodecanoico	5,836 ^a	0,969	6,769 ^a	0,602	15,916 ^b	0,516
Ácido Tetradecanoico	1,303 ^a	0,251	3,803 ^b	0,395	7,573 ^c	0,775
Compuestos de fenilo						
Benzaldehido	0,114 ^a	0,012	0,128 ^a	0,009	0,197 ^b	0,005
Bencenacetaldehido	0,146 ^a	0,029	0,393 ^b	0,030	0,165 ^a	0,045
Bencil alcohol	0,193 ^a	0,017	0,441 ^b	0,036	0,388 ^b	0,040
2-feniletanol	0,048 ^a	0,008	0,076 ^b	0,003	0,064 ^{a,b}	0,002
Lactonas						
γ-valerolactona	0,043 ^a	0,001	0,036 ^a	0,008	0,073 ^b	0,008
γ-caprolactona	0,166	0,028	0,092	0,019	0,115	0,008
γ-octalactona	0,035 ^b	0,007	0,010 ^a	0,000	0,010 ^a	0,000
γ-nonolactona	0,024 ^a	0,006	0,105 ^b	0,006	0,103 ^b	0,016
δ-decalactona	0,178 ^a	0,018	0,266 ^b	0,011	0,252 ^b	0,011
γ-decalactona	0,144 ^a	0,006	0,240 ^c	0,011	0,204 ^b	0,006
δ-dodecalactona	0,120 ^a	0,027	0,248 ^b	0,007	0,283 ^b	0,002

DS: Desviación estandar

^{a, b, c}: superíndices distintos en una misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

- 5 Así, los quesos Manchegos elaborados con el cultivo de la invención, formado por las tres cepas autóctonas, presentaron concentraciones significativamente superiores ($P < 0,05$) a las de los otros quesos para los siguientes compuestos volátiles: acetoína, compuesto que proporciona un aroma y sabor a mantequilla, óxido de linalool y linalool, que proporcionan un olor dulce y/o floral, ácidos grasos butanoico e isovalérico, compuestos que proporcionan olor a queso curado, bencilalcohol con aroma dulce y floral, γ-nonolactona y γ-decalactona con aroma afrutado, y δ-decalactona y δ-dodecalactona aroma a lácteo dulce.
- 10 Todos estos compuestos, resultantes de distintas rutas metabólicas, son responsables del sabor y del aroma de los quesos Manchegos elaborados con el cultivo de la invención (B).
- 15 Estos buenos resultados se han reflejado en los resultados obtenidos en el análisis sensorial de los quesos, en el que los catadores indicaron que los quesos elaborados con el cultivo motivo de la invención presentaban mayor intensidad y calidad del olor y del sabor, y recibieron puntuaciones más elevadas para el atributo de la impresión global que los elaborados con el cultivo iniciador comercial (Figuras 5 y 6). A juicio de los catadores, estos quesos presentaron unas características sensoriales parecidas a las de los quesos artesanales del lote C resultando mucho menos amargos.
- 20 Además en los quesos elaborados con el cultivo de la invención no se produjeron aminas biógenas en cantidades perjudiciales durante la maduración obteniéndose para todas las fechas de maduración analizadas y para todas las aminas biógenas analizadas valores inferiores a 30 µg/g. Las concentraciones de aminas biógenas encontradas en los quesos de los lotes A y B fueron muy similares e inferiores a las de los quesos del lote C (Tabla 2). En la literatura se ha resaltado que los niveles máximos permitidos de histamina y de tiramina en alimentos no deberían superar los 100 mg/Kg y 800 mg/Kg, respectivamente, (Nout.: Fermented foods and food safety. Food Research International 27, 291-298, 1994). Esta tan baja producción de aminas biógenas del cultivo de la invención en el queso supone una característica muy deseable desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, y conlleva una mejora de la técnica respecto a los quesos elaborados con leche cruda, los cuales suelen tener cantidades superiores y a veces bastante elevadas de aminas biógenas.
- 25
- 30

Tabla 2: Concentración (mg/Kg queso) de aminas biógenas \pm desviación estándar en distintos momentos del periodo de maduración, en los quesos Manchegos elaborados con un cultivo comercial (lote A), el cultivo de la invención (lote B) y leche cruda (lote C).

Tiempo	Amina	Lote		
		A	B	C
2 meses	Histamina	20,1 ^a \pm 1,8	27,9 ^a \pm 1,8	35,23 ^b \pm 1,8
	Tiramina	4,99 ^a \pm 0,4	5,08 ^a \pm 0,5	64,23 ^b \pm 3,4
	Cadaverina	3,44 ^a \pm 0,5	1,73 ^a \pm 0,2	170,2 ^b \pm 7,9
	Putrescina	0 ^a	0 ^a	126,5 ^b \pm 5,9
	Feniletilamina	0	0	0
5 meses	Histamina	14,9 ^a \pm 0,1	19,7 ^a \pm 0,1	41,3 ^b \pm 4,5
	Tiramina	19,1 ^a \pm 0,1	18,3 ^a \pm 0,1	136,1 ^b \pm 1,5
	Cadaverina	2,18 ^a \pm 0,3	2,01 ^a \pm 0,1	365,8 ^b \pm 11,2
	Putrescina	0 ^a	0 ^a	417,6 ^b \pm 6,4
	Feniletilamina	0 ^a	0 ^a	17,43 ^b \pm 1,6
8 meses	Histamina	23,1 ^a \pm 1,8	20,1 ^a \pm 0	65,75 ^b \pm 6,4
	Tiramina	34,5 ^b \pm 0,6	16,4 ^a \pm 1,4	214,6 ^c \pm 1,3
	Cadaverina	3,08 ^a \pm 0,3	2,22 ^a \pm 0,2	527,5 ^b \pm 2,4
	Putrescina	0 ^a	0 ^a	395,3 ^b \pm 0,7
	Feniletilamina	0 ^a	0 ^a	32,71 ^b \pm 0,9

a, b, c: superíndices distintos en una misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Se puede además afirmar que las características de los quesos elaborados con el cultivo de la invención son atribuibles a la actuación conjunta durante la maduración del queso de las tres cepas constituyentes del cultivo iniciador, ya que el estudio de implantación efectuado ha puesto de manifiesto la presencia predominante de las cepas inoculadas frente a otras procedentes de la leche o de las instalaciones.

Las ventajas principales del cultivo iniciador que comprende las tres cepas de bacterias de la invención son que permite la obtención de quesos industriales con mayor intensidad y calidad del olor y sabor y con unas características sensoriales que se asemejan a las de los quesos artesanales, a la vez que permite una garantía higiénico-sanitaria y un control eficiente del proceso de fabricación al emplear leche pasteurizada, y que preserva la biodiversidad microbiana presente en los quesos Manchegos artesanales, ya que las cepas de la invención formaban parte de la microbiota autóctona de dichos quesos, de donde fue aislada y seleccionada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Recuentos de bacterias mesófilas totales, de lactococos y de lactobacilos en la leche, en la cuajada y en los quesos Manchegos a lo largo de la maduración. En todas las Figuras que afecta se denomina como A) quesos elaborados con cultivo comercial constituido por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; B) quesos elaborados con cultivo constituido por las cepas autóctonas de *Lactococcus* y *Lactobacillus*; C) quesos elaborados con leche cruda

Figura 2: Evolución del pH durante la maduración de los quesos Manchegos de los lotes A, B y C.

Figura 3: Evolución del índice de la maduración N-PTA (%NT) (nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico expresado como % del nitrógeno total) en los quesos Manchegos de los lotes A, B y C.

Figura 4: Contenido en aminoácidos libres a los 8 meses de maduración en los quesos Manchegos de los lotes A, B y C.

Figura 5: Perfil sensorial olfativo de los tres lotes de quesos Manchegos a los 8 meses de maduración.

Figura 6: Perfil sensorial gustativo de los tres lotes de quesos Manchegos a los 8 meses de maduración.

EJEMPLOS

5 Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Determinación de las propiedades tecnológicas de las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, CECT 7883 y CECT 7884 y de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882.

10 Las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, CECT 7883, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7884 y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (CECT 7882) integrantes del cultivo iniciador propuesto para la elaboración de queso Manchego, fueron obtenidas y aisladas por métodos convencionales de la técnica, a partir de leche cruda de oveja manchega y de queso Manchego elaborado con leche cruda en distintos momentos del periodo de maduración. Las propiedades tecnológicas estudiadas fueron la actividad acidificante, proteolítica, autolítica, producción de aminas biógenas, actividad peptidásica, actividad lipolítica, análisis sensorial tras fermentación de la leche, viabilidad tras la liofilización y mantenimiento de las propiedades deseables tras la liofilización y el almacenamiento durante 1 año, que se realizaron siguiendo los métodos descritos por Nieto-Arribas y colaboradores (Nieto-Arribas et al.: "Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures". Food Control 20, 1092-1098, 2009; Nieto-Arribas et al. "Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese". Journal of Applied Microbiology 107, 1505-1517, 2009. Los resultados corresponden a las propiedades por las cuales estas cepas han sido seleccionadas y están comentados anteriormente.

Ejemplo 2: Preparación del cultivo iniciador compuesto por las cepas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7883 y CECT 7884 y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882 para su inoculación en la leche pasteurizada.

25 Para la preparación del cultivo iniciador que iba a ser inoculado en la leche pasteurizada, las cepas liofilizadas fueron revitalizadas en leche desnatada reconstituida y subcultivadas hasta crecimiento exponencial y hasta alcanzar una densidad óptica de 2 unidades de absorbancia, hasta lograr los volúmenes necesarios para su inoculación al 1,5% en 60 L de leche de oveja, es decir, un volumen de 900 mL, en el cual cada una de las cepas se encontraba en la siguiente proporción: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7883 (25%), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7884 (25%) y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882 (50%).

Ejemplo 3: Elaboración de los quesos Manchegos con el cultivo iniciador compuesto por las cepas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7883, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7884 y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882.

35 Se partió de 60 litros de leche de oveja procedente de una ganadería inscrita en el Consejo Regulador de la Denominación de Origen Queso Manchego. La leche se sometió a un tratamiento térmico de pasteurización (72-74°C/15-20s) y tras estabilizar la leche a una temperatura de 30 °C se añadió el cultivo iniciador al 1,5% (v/v) y se dejó actuar durante 30 minutos a dicha temperatura. A continuación, se añadió cuajo animal para llevar a cabo la coagulación (30°C/30-60min). Además también se añadió cloruro cálcico a razón de 2,5 g/L. Tras la coagulación se procedió al corte de la cuajada, mediante cortes sucesivos hasta conseguir granos de tamaño de 5-10 mm. A continuación la masa se agitó y se recalentó hasta alcanzar de modo paulatino una temperatura no superior a 40 °C, para favorecer el desuerado. La cuajada obtenida se introdujo en moldes para los quesos, que disponen de los adecuados relieves para imprimir en las caras del queso la característica "flor" y en los lados la "pleita". A continuación se realizó el prensado del queso, para extraer el lactosuero que aún pudiese quedar retenido en la cuajada. Este prensado se realizó con una prensa hidráulica durante 5-6 horas aproximadamente, aumentando gradualmente la presión hasta un máximo de 3 kg de presión. Durante este prensado se realizaron varios volteos de los quesos. Los quesos así obtenidos tenían un peso de entre 2,5-3 Kg, y fueron salados por inmersión en una salmuera de concentración del 16-18% de NaCl a una temperatura de 12 °C durante 15 horas. Después se maduraron en una cámara con una humedad relativa del 75-80% y una temperatura de 10-12 °C, durante un periodo de 8 meses.

Ejemplo 4: Preparación del cultivo iniciador comercial.

50 El cultivo comercial concentrado de inoculación directa, marca Choozit (Danisco) compuesto por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, se inoculó al 1,5% siguiendo las indicaciones del fabricante. Se pesaron 0,9 gramos de liófilo y se disolvieron en 200 mL de leche de oveja pasteurizada a temperatura de 30 °C.

Ejemplo 5: Elaboración de los quesos Manchegos con el cultivo iniciador comercial.

55 El cultivo iniciador obtenido en el ejemplo 4 se añadió a 60 litros de leche para seguir el procedimiento de elaboración del queso según el ejemplo 3.

Ejemplo 6: Elaboración de quesos Manchegos artesanales de leche cruda.

Se procedió del mismo modo que en el ejemplo 3, con las diferencias de que no se pasteurizó la leche ni se añadió cultivo iniciador alguno.

Ejemplo 7: Estudio de implantación de las cepas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7883, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7884 y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882.

Los aislados puros obtenidos en las placas de los recuentos de MRS, fueron analizados mediante RAPD-PCR utilizándose el cebador M-13 según la SEQ ID NO:1, y los perfiles obtenidos fueron comparados con aquellos de las cepas inoculadas. Para la conversión, normalización y análisis de los perfiles de polimorfismo de ADN se utilizó el programa informático GelCompar versión 4.0. La comparación de los perfiles se realizó mediante el cálculo del coeficiente de Pearson, utilizándose un análisis cluster mediante el método UPGMA, que permitió la construcción de los correspondientes dendrogramas de similitud. La implantación es calculada como el número de aislados que muestran un perfil genético idéntico al de la cepa objeto de estudio dividido por el total de aislados obtenidos, expresado en porcentaje.

Ejemplo 8: Análisis microbiológicos.

Se tomaron muestras de 10 mL de leche o de 10 g de los quesos de los ejemplos anteriores que se homogeneizaron con 90 mL de citrato sódico al 2% (p/v) estéril, previamente calentado a 45 °C, durante 2 min a intervalos de 30 s en un triturador de palas (Stomacher). A partir de los homogeneizados se realizaron diluciones decimales en citrato sódico estéril al 2% y a partir de éstas se realizaron los correspondientes recuentos. Se realizaron recuentos de bacterias viables totales en placas de Standard Plate Count Agar (PCA, Panreac) incubándose a 30° C durante 72 h (ICMSF, 1978). Asimismo se realizaron recuentos de lactococos en agar M17 (Scharlau Chemie, S.A) tras incubación a 30° C durante 24 h y de lactobacilos en agar Rogosa (Merck) a 37°C durante 48 h, en condiciones anaerobias (AnaeroGen, Oxoid). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 9: Análisis físico-químicos.

Se determinó el pH por medida directa con un pH-metro Crison 2002, empleando un electrodo de penetración. El análisis de la fracción de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico 5% (N-PTA) se llevó a cabo siguiendo el método de Bütikofer et al. (Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of a collaborative study. Lebensmittel Wissenschaft Technology 20, 271-275, 1993). Para la determinación de los aminoácidos libres individuales y de las aminas biógenas se partió de la fracción soluble en agua a pH 4.6 (NS-pH 4,6) obtenida por el método de Kuchroo y Fox (Soluble nitrogen in Cheddar cheeses: comparison of extraction procedures. Milchwissenschaft 37, 331-335, 1982), modificado por Sousa y McSweeney, (Studies on the ripening of Cooleeney cheese, an Irish farmhouse Camembert-type cheese. Irish Journal of Agricultural and Food Research 40, 83–95, 2001). La preparación de la muestra se llevó a cabo descartando la fracción de Pm > 3000 Da para evitar posibles interferencias debidas a la presencia de pequeños péptidos. Para ello la fracción NS-pH 4,6 fue sometida a ultrafiltración. Los aminoácidos y las aminas biógenas fueron analizados por HPLC en fase inversa con derivatización precolumna, utilizando como agente derivatizante el etoximetilen malonato de dietilo (EMMDE), según el método de Gómez-Alonso et al. (Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 608-613, 2007). La cuantificación se realizó por el método del patrón interno, construyendo rectas de calibrado realizadas con sustancias patrón puras. El análisis de los compuestos volátiles de los quesos se realizó mediante la técnica de extracción-destilación simultánea (SDE) y su posterior análisis por cromatografía de gases-masas (GC-MS), como está descrito en Poveda et al. (Volatile composition, olfactometry profile and sensory evaluation of semi-hard Spanish goat cheeses. Dairy Science Technology 88, 355-367, 2008). Los resultados se muestran en las Figuras 2 a 4.

Ejemplo 10: Evaluación sensorial.

Los quesos fueron evaluados sensorialmente a partir de los 60 días de maduración, que es el mínimo exigido por el Consejo Regulador de D.O. Manchego para su comercialización. Se evaluaron los siguientes atributos: a) perfil sensorial olfativo: intensidad del olor, calidad del olor, olor a mantequilla, olor a láctico/yogur, olor afrutado y olor añejo; b) perfil gustativo: intensidad y calidad del sabor, sabor ácido, salado, amargo, picante, mantequilla y persistencia del sabor. También se evaluó la impresión global. Para ello se utilizó un panel de cata formado por 6 jueces entrenados en la evaluación sensorial del queso Manchego industrial y artesanal. Los resultados se muestran en las Figuras 5 y 6.

REIVINDICACIONES

1. Cultivo iniciador para la elaboración de queso que comprende las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo con los códigos CECT 7883 y CECT 7884, y la cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* depositada con el código CECT 7882.
- 5 2. Un cultivo según la reivindicación 1, en que la concentración de dichas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7883 y CECT 7884 es independientemente entre el 20 y el 30% respecto de las cepas totales del cultivo.
3. Un cultivo iniciador según la reivindicación 2, en que la concentración de dichas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7883 y CECT 7884 es independientemente del 25% respecto de las cepas totales del cultivo.
- 10 4. Un cultivo iniciador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que la concentración de dicha cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882 es de entre el 45 y el 55% respecto de las cepas totales del cultivo.
5. Un cultivo iniciador según la reivindicación 4, en que la concentración de dicha cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882 es del 50% respecto de las cepas totales del cultivo.
6. Un cultivo iniciador según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que procede de un cultivo liofilizado.
- 15 7. Cultivo liofilizado que comprende las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo con los códigos CECT 7883 y CECT 7884, y la cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* depositada con el código CECT 7882.
8. Procedimiento de elaboración de un queso, que comprende inocular en leche de oveja Manchega una cantidad efectiva de las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7883 y CECT 7884 como iniciadoras, y de la cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882 como adjunto.
- 20 9. Un procedimiento según la reivindicación 8, en que la inoculación de dichas cepas es conjunta en un cultivo iniciador.
10. Un procedimiento según la reivindicación 8, en que la inoculación de dichas cepas es secuencial.
11. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en que dicha leche es leche pasteurizada.
- 25 12. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en que dicha leche es leche cruda.
13. Queso obtenido por un procedimiento que comprende fermentación de leche de oveja Manchega en presencia de las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 7883 y CECT 7884, y de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882.
- 30 14. Un queso según la reivindicación 13, que contiene la cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 7882, viva.
15. Cepa de bacteria láctica de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el código CECT 7883.
16. Cepa de bacteria láctica de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el código CECT 7884.
- 35 17. Cepa de bacteria láctica de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el código CECT 7882.

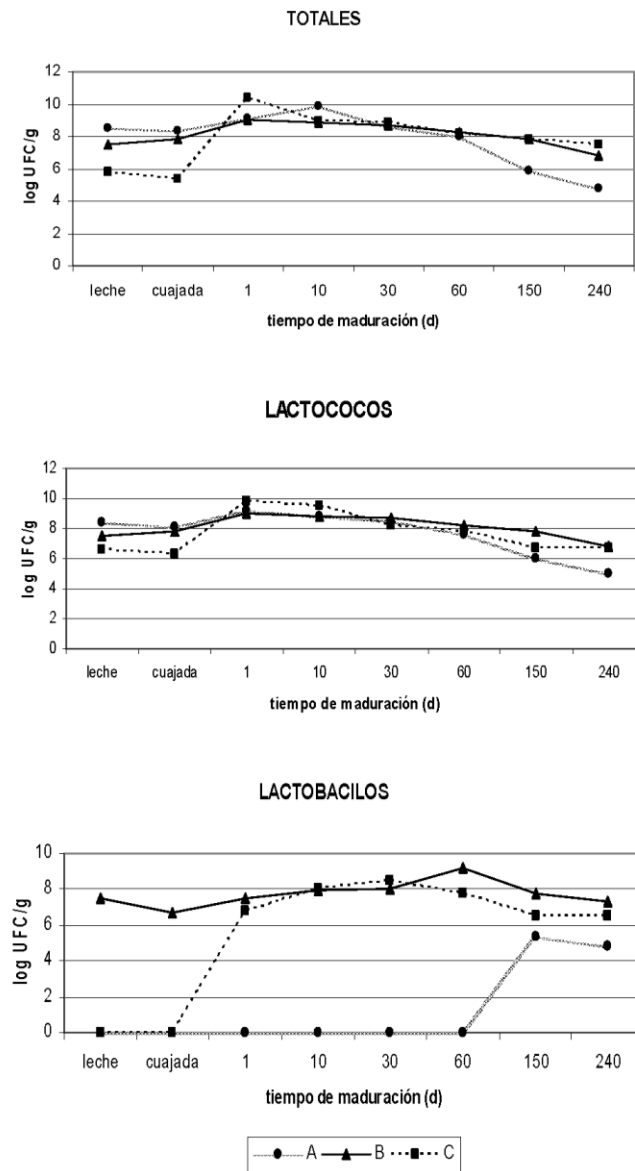


Fig. 1

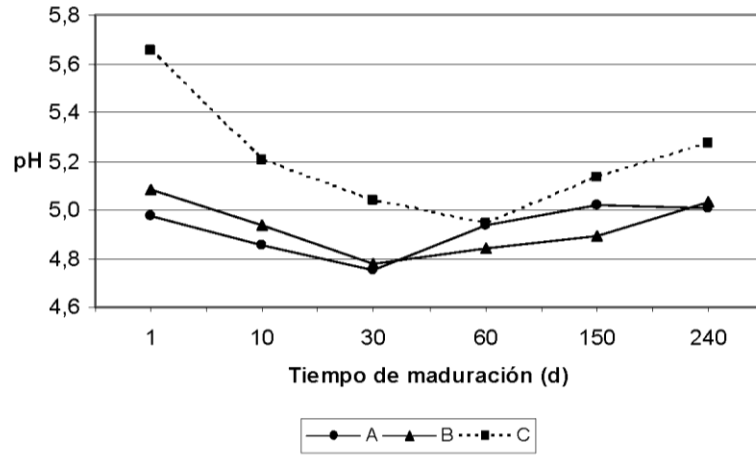


Fig. 2

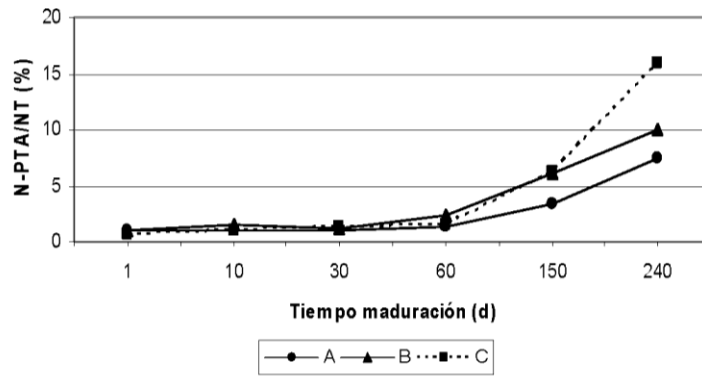


Fig. 3

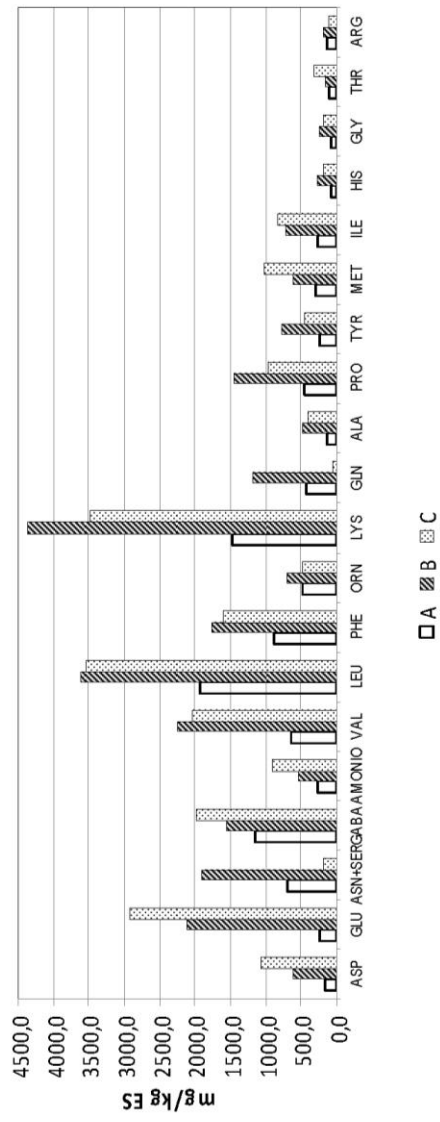


Fig. 4

Perfil sensorial olfativo

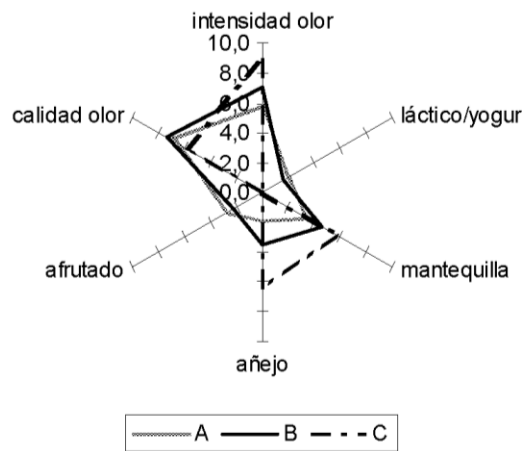


Fig. 5

Perfil sensorial gustativo

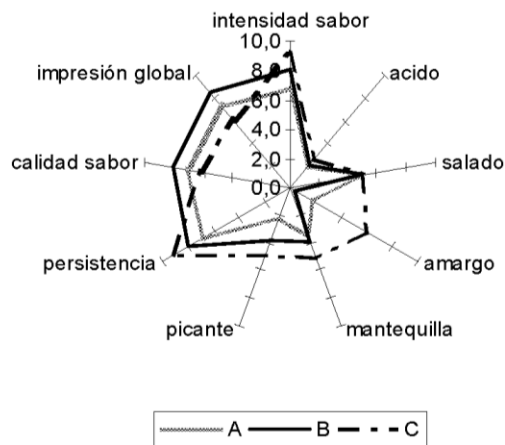


Fig. 6

ES 2 401 628 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE CASTILLA- LA MANCHA
<120> CULTIVO INICIADOR PARA LA ELABORACIÓN DE QUESO
<130> P1255/2011
<160> 1
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 1
gagggtggcg gttct

15



②① N.º solicitud: 201131615

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.10.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2350127 A1 (UNIV LA LAGUNA) 19.01.2011, todo el documento.	1-15
A	NIETO-ARRIBAS P et al. Technological characterization of Lactobacillus isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. Food Control 12.2009 VOL: 20 No: 12 Pags: 1092-1098 ISSN 0956-7135 (print)-ISSN 1873-7129 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.foodcont.2009.03.001.	1-15
A	BALLESTEROS C et al. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. Food Control 04.2006 VOL: 17 No: 4 Pags: 249-255 ISSN 0956-7135.	1-15
A	VAN HOORDE KOENRAAD et al. Selection, application and monitoring of Lactobacillus paracasei strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. International Journal of Food Microbiology 12.2010 VOL: 144 No: 2 Pags: 226-235 ISSN 0168-1605 Doi: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.007.	1-15
A	POVEDA COLADO, J.M. "EFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE DISTINTOS CULTIVOS INICIADORES EN LA PROTEOLISIS DEL QUESO MANCHEGO. OTROS ASPECTOS DE LA MADURACIÓN", 2007, Tesis doctoral defendida en 2001 en la Universidad de Castilla-La Mancha (Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos) Ediciones de la UCLM, I.S.B.N.978-84-8427-559-6.	1-15
A	NIETO ARRIBAS, P.D. "DIVERSIDAD GENÉTICA Y CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE CEPAS AUTÓCTONAS AISLADAS DE QUESO DE D.O. "MANCHEGO", PARA SU SELECCIÓN COMO CULTIVO INICIADOR", 2010, Tesis doctoral defendida en 2010 en la Universidad de Castilla-La Mancha (Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos).	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.02.2013

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A23C19/032 (2006.01)

C12N1/20 (2006.01)

C12R1/225 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23C, C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.02.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-17	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-17	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2350127 A1 (UNIV LA LAGUNA)	19.01.2011
D02	NIETO-ARRIBAS P et al. Technological characterization of <i>Lactobacillus</i> isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. Food Control 12.2009 VOL: 20 No: 12 Pags: 1092-1098 ISSN 0956-7135 (print)-ISSN 1873-7129 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.foodcont.2009.03.001.	30.11.2009
D03	BALLESTEROS C et al. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. Food Control 04.2006 VOL: 17 No: 4 Pags: 249-255 ISSN 0956-7135.	31.03.2006
D04	VAN HOORDE KOENRAAD et al. Selection, application and monitoring of <i>Lactobacillus paracasei</i> strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. International Journal of Food Microbiology 12.2010 VOL: 144 No: 2 Pags: 226-235 ISSN 0168-1605 Doi: doi:10.1016/j.jfoodmicro.2010.05.007.	30.11.2010
D05	POVEDA COLADO, J.M. "EFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE DISTINTOS CULTIVOS INICIADORES EN LA PROTEOLISIS DEL QUESO MANCHEGO. OTROS ASPECTOS DE LA MADURACIÓN", 2007, Tesis doctoral defendida en 2001 en la Universidad de Castilla-La Mancha (Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos) Ediciones de la UCLM, I.S.B.N.978-84-8427-559-6.	
D06	NIETO ARRIBAS, P.D. "DIVERSIDAD GENÉTICA Y CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE CEPAS AUTÓCTONAS AISLADAS DE QUESO DE D.O. "MANCHEGO", PARA SU SELECCIÓN COMO CULTIVO INICIADOR", 2010, Tesis doctoral defendida en 2010 en la Universidad de Castilla-La Mancha (Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos).	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud reivindica un cultivo iniciador para la elaboración de queso manchego que comprende dos cepas distintas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y una de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

La solicitud reivindica, asimismo, el procedimiento para la fabricación de un queso utilizando dicho cultivo iniciador y el queso así obtenido.

El procedimiento se reivindica tanto para llevarlo a cabo a partir de leche cruda como de leche pasteurizada.

D01-D06 representan el estado de la técnica anterior. Se refieren a estudios microbiológicos de la flora existente en distintos quesos. En ninguno de ellos se describe la utilización de un cultivo iniciador que contenga los microorganismos reivindicados en la solicitud. Tan sólo en D01 se habla de la posibilidad de combinar cepas de *Lactococcus lactis* y *Leuconostoc pseudomesenteroides* como iniciadoras con otras de *Lactobacillus paracasei* como adjuntas para mejorar las características de quesos tipo Gouda, luego podría considerarse como el estado de la técnica más cercano.

Habida cuenta de las diferencias entre quesos manchego y Gouda y, sobre todo, entre las cepas utilizadas por los solicitantes y los autores del trabajo (D01), además del hecho de que en la solicitud se combinan dos cepas distintas de *Lactococcus lactis* con una de *Lactobacillus paracasei* en el propio cultivo iniciador, mientras que en D01 no, se estima que el contenido de D01, así como del resto de documentos (D02-D05) no anticipa el objeto de la invención de la solicitud.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1-17 de la solicitud cumplen el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986 y el de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986.