

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 103**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 7/26 (2006.01)

A23C 9/12 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2011 PCT/EP2011/073490**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO2012085010**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2011 E 11808199 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2655598**

54 Título: **Modulación de sabor por bioprocesado empleando cepas bacterianas que generan el sabor a crema**

30 Prioridad:

20.12.2010 EP 10195848

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

25.04.2017

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

BRAUN, MARCEL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 610 103 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

Modulación de sabor por bioprocesado empleando cepas bacterianas que generan el sabor a crema

5 Ámbito de la invención

La presente invención se refiere a la generación de sabor y aroma en productos de base láctea. La generación de sabor y aroma en productos de base láctea se logra empleando cepas bacterianas durante la fermentación de una fuente láctea.

10

Antecedentes de la invención

La fermentación es la conversión de hidratos de carbono en ácidos orgánicos o en otros compuestos empleando cepas bacterianas.

15

Los productos lácteos fermentados son los principales productos de consumo. Los productos lácteos fermentados pueden ser, por ejemplo los quesos, los sueros de leche y los yogures. Los productos lácteos fermentados se fabrican por fermentación de una fuente láctea.

20 Una fuente láctea, por ejemplo la leche, contiene el hidrato de carbono lactosa. Durante la fermentación de la fuente láctea, las cepas bacterianas fermentan el hidrato de carbono lactosa para producir el ácido láctico. La producción del ácido láctico se traduce en una acidificación de la fuente láctea durante la fabricación del producto láctico fermentado. Durante la fermentación de la fuente láctea pueden tener lugar otras reacciones entre otras sustancias presentes en la fuente láctea y las cepas bacterianas.

25

La fermentación de la fuente láctea con cepas bacterianas es la causa de la generación de sabor y aroma en los productos lácteos fermentados. Además, la fermentación de la fuente láctea con las cepas bacterianas aumenta o prolonga el período de conservación de los productos lácteos fermentados.

30 Las cepas bacterianas empleadas para fermentar la fuente láctea pueden ser cepas bacterianas de ácido láctico. Las cepas bacterianas de ácido láctico incluyen al *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*; así como los más periféricos *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*; estas cepas bacterianas de ácido láctico pertenecen al orden de los Lactobacillales.

35

Una publicación de solicitud de patente internacional con el nº WO 2008/049581 de la empresa solicitante Nestec SA se titula "Taste and flavour modulation by biotransformation in milk products". En la publicación de solicitud de patente internacional del nº WO 2008/049581 se describe un método para promover un sabor no aromático en un producto alimentario.

40

Una publicación de solicitud de patente internacional con el nº WO 02/085131 de la empresa solicitante New Zealand Dairy Board se titula "Method of preparing savoury-sabored products by fermentation of proteins". En la publicación de solicitud de patente internacional del nº WO 02/085131 se describe un método de fabricación de productos sabrosos aromáticos a partir de una fuente de proteínas empleando una combinación de dos cepas bacterianas distintas. La fuente de proteínas puede ser una planta como la soja, el trigo, el arroz, la leche o el suero. Se elige la primera cepa bacteriana entre el grupo formado por el *Macroccoccus*, *Microccoccus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Anthrobacter* y *Corynebacterium*, con preferencia el *Macroccoccus caseolyticus*. La segunda cepa bacteriana se elige entre las bacterias de ácido láctico: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* o *Leuconostoc*. El producto de sabor aromático puede combinarse con otros ingredientes para formar productos tales como quesos, geles de proteína-agua, yogures, cremas, natillas (flanes), salsas y productos de repostería.

50

Una publicación de solicitud de patente internacional con el nº WO 02/00845 de la empresa solicitante Nizo Food Research se titula "Enhanced flavour production in or relating to food by cultivation of various food grade microorganisms". En la publicación de solicitud de patente internacional del nº WO 02/00845 se describen nuevos cultivos mixtos de dos o más cepas de microorganismos, en los que por lo menos una de las cepas de microorganismos, contenida en dicho cultivo mixto, se elige a título individual en base a su capacidad para llevar a cabo una parte del mecanismo enzimático, y dichas dos o más cepas de microorganismos elegidas forman juntas un mecanismo completo que conduce al componente de sabor deseado. El cultivo mixto es un cultivo para la producción de un producto fermentado, por ejemplo un yogur, un queso o una salchicha. Dichas dos o más cepas de microorganismos se cultivan con preferencia de modo simultáneo. Las formas de ejecución particulares y preferidas son cultivos de inicio para la fabricación de queso. El cultivo mixto contiene una combinación de varias cepas de *Lactococcus* y una combinación de una cepa de *Brevibacterium* y una cepa de *Staphylococcus*, respectivamente.

55

Un artículo de Monnet y col. publicado en Journal of Microbiological Methods 37, pp. 183-185, 1999 se titula "An improved method for screening alpha-acetolactate producing mutants". En el artículo de Monnet y col. se describe

65

que en la industria láctea se emplea una cepa bacteriana de *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis* para producir el diacetilo. El diacetilo es uno de los principales compuestos de sabor de los productos lácteos elaborados.

5 Un artículo de Boumerdassi y col. publicado en Journal of Dairy Science, vol. 80, edición 4, pp. 634-639, 1997 se titula "Effect of citrate on production of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis ssp. lactis* CNRZ 483 cultivated in the presence of oxygen". En el artículo de Boumerdassi y col. se describen los efectos de la adición de citrato trisódico en el crecimiento y la formación del diacetilo y la acetoina causados por el *Lactococcus lactis ssp. lactis* CNRZ 483 en un medio basado en el suero.

10 En el artículo "Characterisation of a malty-compound producing *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* C1 strain isolated from naturally fermented milk" de Mutukumira y col. publicado en Milchwissenschaft 64(1) pp. 26-29, 2009, se describe una cepa que produce leche fermentada aceptable para una grupo (panel) sensorial a pesar de la presencia de un sabor ligeramente malteado.

15 En el artículo "Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* y *Leuconostoc spp.*" de Hugenholtz y Starrenburg, publicado en Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, pp. 17-22, 1992 se describe la comparación de varias cepas para la formación de producto a partir del citrato en cultivos lácteos.

20 Sin embargo, debido al gran número de cepas bacterianas de ácido láctico y sus interacciones con los individuos, no puede predecirse la selección de ciertas cepas bacterianas de ácido láctico para producir ciertos sabores y aromas en los productos lácteos fermentados.

25 Los productos lácteos fermentados tienen un amplio abanico de sabores y aromas en función de la fuente láctea y de las cepas bacterianas de ácido láctico empleadas para fermentar la fuente láctea.

Hay demanda de nuevos métodos y cepas bacterianas de ácido láctico que puedan generar sabores y aromas específicos en los productos lácteos fermentados.

30 Además, el consumidor percibe negativamente los aditivos artificiales. Hay demanda de nuevos sabores y aromas obtenidos de modo natural para evitar los aditivos artificiales.

Hay también demanda de nuevos sabores y aromas que puedan emplearse en un amplio abanico de alimentos.

35 Existe la necesidad de superar los problemas recién mencionados de la técnica anterior.

Resumen de la invención

40 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a la bacteria del ácido láctico *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404). La presente invención se refiere también a la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405).

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la fabricación de un producto láctico fermentado. El producto láctico fermentado tiene por lo menos un sabor y aroma a crema. El método consiste en aportar una fuente láctea, añadiendo opcionalmente citrato a la fuente láctea para formar una fuente láctea suplementada, añadiendo a la leche o fuente láctea suplementada un *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404) o un *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405) para formar una mezcla. Después se fermenta la mezcla para fabricar el producto láctico fermentado.

50 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto láctico fermentado con por lo menos un sabor y aroma a crema que puede obtenerse por el método recién mencionado.

En otro aspecto, la presente invención relates a un producto para el consumo de animales mamíferos, que contiene un producto láctico fermentado con por lo menos un sabor y aroma a crema.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto alimentario que contiene la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404) o el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405) y por lo menos uno de los siguientes: diacetilo, acetoina y 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un cultivo formado por la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404) o el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405).

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404) o el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405) para conferir por lo menos un sabor y aroma a crema a una fuente láctea.

- 5 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404) o el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405) para la obtención de la 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona.

- 10 Los inventores presentes se han sorprendido al encontrar que la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404) o el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405) confiere tal sabor y aroma a los productos lácticos fermentados.

Descripción detallada de la invención

- 15 Para la comprensión completa de la presente invención y de las ventajas de la misma, se aporta la siguiente descripción detallada de la invención.

Se podrá apreciar que varios aspectos de la presente invención son meramente ilustrativos de las formas específicas de ejecución y uso de la presente invención.

- 20 Los diversos aspectos de la presente invención pueden combinarse con otros aspectos de la presente invención y no limitan el alcance de la invención cuando se toman en consideración junto con las reivindicaciones y la descripción detallada que sigue.

- 25 La presente invención se refiere a los productos lácticos fermentados. Los productos lácticos fermentados se fabrican por fermentación de una fuente láctea con una bacteria de ácido láctico para aportar sabor y aroma a los productos lácticos fermentados.

- 30 La bacteria de ácido láctico es el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404) o el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405). La bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404) y el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405) se depositaron fecha 25 de noviembre de 2010 en el Instituto Pasteur - Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM).

- 35 La fuente láctea puede ser cualquier tipo de leche, por ejemplo leche de vaca, leche de oveja, leche de cabra, leche de búfalo o cualquier mezcla de las mismas. La fuente láctea puede ser una leche que se ha tratado por UHT, una leche pasteurizada o una leche no pasteurizada. La fuente láctea puede ser una leche grasa completa, una leche desnatada o una leche semidesnatada. Además, la fuente láctea puede ser una leche fresca, una leche combinada o una leche que contenga grasas vegetales o cualquier mezcla de las mismas.

- 40 La conversión del citrato en compuestos volátiles de sabor y aroma desempeña un papel importante en la tecnología de los alimentos. La conversión del citrato en compuestos volátiles de sabor y aroma puede lograrse con las bacterias de ácido láctico. Muchos ingredientes lácteos contienen citrato; sin embargo, para aumentar la formación puede ser deseable suplementar la fuente láctea con citrato.

- 45 El citrato se convierte en compuestos volátiles de sabor y aroma en compuestos volátiles de sabor y aroma durante la fermentación. Los compuestos volátiles de sabor y aroma tienen por lo menos un sabor y aroma de tipo crema tal como se debate a continuación.

- 50 El compuesto citrato, p. ej. el citrato trisódico, se añade a la fuente láctea en una cantidad del 0,01 al 5 % en peso, con preferencia del 0,01 al 2 % en peso, con mayor preferencia en una cantidad del 0,03 al 1,0 % en peso, con preferencia especial del 0,05 al 0,3 % en peso.

- 55 A la fuente láctea suplementada se le añade la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404) o el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405).

- 60 Se puede añadir también una lipasa a la fuente láctea o a la mezcla para producir un sabor y aroma más intensos en los productos lácticos fermentados. La lipasa hidroliza las grasas de la fuente láctea para formar por ejemplo diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres o cualquier mezcla de los mismos. Los diglicéridos, monoglicéridos y los ácidos grasos libres aportan un sabor de tipo crema al producto láctico fermentado. Por lo tanto, el uso de lipasas intensifica el sabor de tipo crema del producto láctico fermentado.

La lactasa puede añadirse también a la fuente láctea o a la mezcla para producir el sabor y aroma deseados en los productos lácticos fermentados. La lactasa hidroliza al disacárido lactosa de la fuente láctea en galactosa y glucosa.

La glucosa y la galactosa se emplean en productos previos aromáticos para la generación de sabor tipo caramelo y de sabor tipo leche condensada edulcorada.

5 Si la fuente láctea no está pasteurizada, la fuente láctea o la fuente láctea suplementada podrá pasteurizarse, someterse a un tratamiento de temperatura ultraalta (UHT) o esterilizarse en condiciones ya conocidas en la técnica. La pasteurización, el tratamiento a temperatura ultraalta y la esterilización se llevan a cabo en un intervalo de temperaturas comprendido entre 70°C y 150°C durante un tiempo comprendido entre 2 s y 20 min. Como alternativa, la fuente láctea puede tratarse térmicamente antes de convertirse en fuente láctea suplementada.

10 A continuación se fermenta la mezcla de la fuente láctea suplementada y la bacteria de ácido láctico (*Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*) para fabricar el producto láctico fermentado con sabor y aroma a crema. La fermentación tiene lugar entre 6 y 24 horas a una temperatura de aproximadamente 30°C. Opcionalmente, antes de la fermentación pueden añadirse también cofactores que mejoran dicha fermentación, por ejemplo el alfa-cetoglutarato, las sales de manganeso o de magnesio.

15 En función de la fuente láctea se podrá apreciar que el producto láctico fermentado con sabor y aroma a crema puede adoptar también la forma de suspensión (de tipo yogur) o de líquido. El producto láctico fermentado puede secarse o concentrarse.

20 El producto láctico fermentado con el sabor y aroma a crema puede secarse, con preferencia por secado de atomización y después convertirse en polvo.

25 El producto láctico fermentado con sabor y aroma a crema puede tener aplicaciones en productos alimentarios y durante la fabricación de productos alimentarios. Por ejemplo, el polvo con sabor y aroma a crema puede tener aplicaciones en la industria de las bebidas, para aportar sabor y aroma malteados a las bebidas. Por ejemplo, el polvo con sabor y aroma a crema puede tener aplicaciones en la industria alimentaria para aportar el sabor y aroma a crema a los productos alimentarios.

Ejemplos

30 Los productos lácticos fermentados fabricados se analizan con una “nariz” electrónica basada en la espectrometría de masas y la cromatografía de gases acoplada a una espectrometría de masas (CG-EM).

35 El análisis con la “nariz” electrónica basada en la espectrometría de masas es un método directo de análisis, en el que el producto láctico fermentado se coloca directamente en la fuente iónica sin necesidad de procedimientos de separación, lo cual permite ahorrar tiempo. La determinación de compuestos volátiles a partir de los espectros de masas resultantes contiene una información limitada con vistas a la identificación de los componentes aromáticos. La identificación inequívoca de los distintos compuestos individuales presentes no es posible sin una separación previa y una fragmentación selectiva, es decir una CG-EM.

40 La cromatografía de gases acoplada a una espectrometría de masas (CG-EM) proporciona la necesaria separación y detección de los componentes volátiles. La CG-EM se emplea para obtener los fragmentos de EM pertenecientes a un componente aromático específico. La identificación inequívoca de las moléculas por CG-EM en combinación con un análisis olfatométrico es un requisito indispensable para analizar los componentes volátiles provistos de olor específico.

50 Los métodos de extracción aplicados normalmente para aislar los componentes volátiles de los productos lácticos fermentados son la destilación con vacío y la posterior extracción con disolvente, las técnicas de purga y trampa (PT) y del espacio de cabeza, por ejemplo la microextracción de fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME). Los métodos de purga y trampa (PT) y del espacio de cabeza permiten identificar los componentes volátiles con diferentes resultados de rendimiento, pero con una reproducibilidad similar. La PT parece ser una técnica menos sensible, mientras que la SPME es más rápida y más económica.

55 Los reactivos se emplean tal como se reciben, sin tratamiento previo, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1

A - Reactivación de la bacteria de ácido láctico

60 Se reactiva el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404) de viales con 1 ml de leche reconstituida en condiciones estériles, se trasvasa a tubos de vidrio estériles que contienen 9 ml de leche reconstituida y se incuba en condiciones aeróbicas a 30°C durante 24 h en la oscuridad.

65 Después se guardan (se almacenan) las bacterias a 6°C durante dos semanas y a continuación se inoculan con un 0,5% ((v/v) 0,05/10 ml de medio) en un cultivo.

El cultivo es M17x (M17 Terzaghi Bouillon, Merck 1.15029 y 5 g/l de glucosa (Merck 8342). Después de la fase de crecimiento (3 días) se almacenan los frascos a 6°C para formar las bacterias reactivadas de ácido láctico.

Como alternativa, el cultivo puede ser de leche desnatada.

5

B - Suplementación de la fuente láctea con citrato trisódico

Se prepara una solución 100 mM de citrato trisódico en agua. Se filtra la solución de citrato trisódico a través de un tamaño de poro de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Whatmann, FP 30/0,45 µm, 7 bares máx. CA-S). Se añaden 500 µl de la solución de citrato trisódico a 4,5 ml de leche UHT (dilución 1:10) para obtener una fuente láctea suplementada de una concentración final de 10 mM en 5,0 ml.

10

C - Fermentación

15 Se lleva a cabo la fermentación en leche UHT por dos estrategias (I - II).

I: Index (= inside needle dynamic extraction; Hamilton) muestreo de fragmentos de compuestos volátiles en espacio de cabeza de leche UHT sin suplementar.

20

II: Tenax (= accumulation adsorbens, Marin-Epagnier, Suiza) muestreo de fragmentos de compuestos volátiles en espacio de cabeza de leche UHT suplementada (10 mM de citrato trisódico).

Una parte alícuota de 50 µl de la bacteria de ácido láctico reactivada se trasvasa (se añade) a 5 ml de una leche UHT suplementada (1 % de inoculación) en condiciones estériles y se incuba a 30°C en condiciones aeróbicas durante 16-24 horas en la oscuridad.

25

La introducción de 2,8 g de NaCl en los viales de espacio de cabeza permite expulsar los componentes volátiles del producto láctico fermentado hacia el espacio de cabeza, logrando una liberación más intensa de dichos componentes volátiles.

30

Una "nariz" electrónica detecta los fragmentos de compuestos volátiles en un intervalo m/z de 40 a 100 para el ensayo realizado con leche UHT no suplementada (es decir, sin citrato sódico) y un intervalo m/z de 10 a 160 para el ensayo con la leche UHT suplementada (es decir, con citrato trisódico).

35

El análisis de componentes principales (PCA) se calcula empleando el programa informático "The Unscrambler" (versión 9.7). Los resultados se calculan con los datos en bruto logaritmizados y con exclusión del agua y los blancos de leche. Los cálculos se realizan con todas las variables (fragmentos de EM) incluidos en el grupo de las cepas en relación con los modelos de fragmentos EM similares y la abundancia de los compuestos.

40

D - Mediciones con la "nariz" electrónica

Se efectúan análisis del producto láctico fermentado por mediciones realizadas con la "nariz" electrónica en leche UHT suplementada. II: medición de espacio de cabeza Tenax con leche UHT suplementada con 10 mM de citrato trisódico. Los fragmentos CG-EM [M]⁺ son de 27, 29, 43, 45, 60, 70, 86, 87, 88 y 135.

45

E - pH y potencial redox

Se determina el pH del producto láctico fermentado, que resulta ser de 2,2 con un potencial redox de -10 mV.

50

F - Evaluación sensorial del producto láctico fermentado

Después de la fermentación se mantienen cerrados los viales de vidrio hasta iniciar la evaluación sensorial. Siete personas se encargan de la evaluación sensorial del producto láctico fermentado. La evaluación sensorial se basa en los atributos siguientes, con una puntuación que anota con una X. Se toma como referencia una muestra en blanco (leche incubada). Con el fin de comprobar la influencia del citrato trisódico se preparan también muestras sin el citrato trisódico (adición únicamente de agua esterilizada) y se recogen en el tablero (panel). Los resultados se indican a continuación, en ellos la X indica la percepción sensorial del producto láctico fermentado por parte de una persona del tablero (que participa en el ensayo).

55

mantecoso	XXXX
amargo - almendra	XX
floral	X
sabor a pan	X
cremoso	XXXX
caramelo	-
fresa	-

fresco	-
afrutado	-
levadura	X
miel	X
yogur	-
sabor a queso	-
lechoso	-
malteado	XX
almendra	XX
sabor a nueces	X
tipo papel	-
dulce	X
ácido	X
salado	-
vainilla	-

Los resultados de la evaluación sensorial del producto láctico fermentado demuestran que el producto láctico fermentado tiene un sabor y aroma cremoso de tipo mantecoso.

5 Ejemplo 2

A - Reactivación de la bacteria de ácido láctico

10 Se reactiva el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405) de viales con 1 ml de leche reconstituida en condiciones estériles, se transfiere a tubos de vidrio estériles que contienen 9 ml de leche reconstituida y se incuba en condiciones aeróbicas a 30°C durante 24 h en la oscuridad.

15 Después se guardan (se almacenan) las bacterias a 6°C durante dos semanas y a continuación se inoculan con un 0,5% ((v/v) 0,05/10 ml de medio) en un cultivo.

El cultivo es M17x (M17 Terzaghi Bouillon, Merck 1.15029 y 5 g/l de glucosa (Merck 8342). Después de la fase de crecimiento (3 días) se almacenan los frascos a 6°C para formar las bacterias reactivadas de ácido láctico.

20 Como alternativa, el cultivo puede ser de leche desnatada.

B - Suplementación de la fuente láctea con citrato trisódico

25 Se prepara una solución 100 mM de citrato trisódico en agua. Se filtra la solución de citrato trisódico a través de un tamaño de poro de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Whatmann, FP 30/0,45 µm, 7 bares máx. CA-S). Se añaden 500 µl de la solución de citrato trisódico a 4,5 ml de leche UHT (dilución 1:10) para obtener una fuente láctea suplementada de una concentración final de 10 mM en 5,0 ml. A la fuente de leche suplementada se le añade la lipasa 100 mM.

C - Fermentación

30 Se lleva a cabo la fermentación en leche UHT por dos estrategias (I - II).

I: Index (= inside needle dynamic extraction; Hamilton) muestreo de fragmentos de compuestos volátiles en espacio de cabeza de leche UHT sin suplementar.

35 II: Tenax (= accumulation adsorbens, Marin-Epagnier, Suiza) muestreo de fragmentos de compuestos volátiles en espacio de cabeza de leche UHT suplementada (10 mM de L-leucina, L-valina y L-fenilalanina).

40 Una parte alícuota de 50 µl de la bacteria de ácido láctico reactivada se trasvasa (se añade) a 5 ml de una leche UHT suplementada (1 % de inoculación) en condiciones estériles y se incuba a 30°C en condiciones aeróbicas durante 22 horas en la oscuridad.

La introducción de 2,8 g de NaCl en los viales de espacio de cabeza permite expulsar los componentes volátiles del producto láctico fermentado hacia el espacio de cabeza, logrando una liberación más intensa de dichos componentes volátiles.

45 Una "nariz" electrónica detecta los fragmentos de compuestos volátiles en un intervalo m/z de 40 a 100 para el ensayo realizado con leche UHT no suplementada (es decir, sin citrato sódico) y un intervalo m/z de 10 a 160 para el ensayo con la leche UHT suplementada (es decir, con citrato trisódico).

El análisis de componentes principales (PCA) se calcula empleando el programa informático “The Unscrambler” (versión 9.7). Los resultados se calculan con los datos en bruto logaritmizados y con exclusión del agua y los blancos de leche. Los cálculos se realizan con todas las variables (fragmentos de EM) incluidos en el grupo de las cepas en relación con los modelos de fragmentos EM similares y la abundancia de los compuestos.

5 D - Mediciones con la “nariz” electrónica

Se efectúan análisis del producto láctico fermentado por mediciones realizadas con la “nariz” electrónica en leche UHT suplementada. II: medición de espacio de cabeza Tenax con leche UHT suplementada con 10 mM de citrato trisódico. Los fragmentos CG-EM [M]⁺ son de 43, 55, 71, 77, 60, 88, 89, 99, 114, 120 y 131.

F - Evaluación sensorial del producto láctico fermentado

15 Después de la fermentación se mantienen cerrados los viales de vidrio hasta iniciar la evaluación sensorial. Diez personas se encargan de la evaluación sensorial del producto láctico fermentado. La evaluación sensorial es una evaluación de sabor con el fin de obtener información sobre el efecto y el sabor en boca de los productos lácticos fermentados obtenidos.

20 Las muestras se pasteurizan en todos los casos (85 °C durante 15 min en un baño de agua) y se diluye al 1 % en leche UHT (a una temperatura de 20-25°C). Los resultados que se presentan a continuación muestran con detalle las percepciones de las personas que participan en la evaluación.

participante	leche UHT incubada en blanco	producto láctico fermentado
1	ligeramente lechoso	cremoso intenso, mantequilla
2	lechoso, leche UHT ligeramente rancia	dulce/cremoso, mantecoso
3	lechoso, ligeramente almendra, amargo	malteado, mantequilla
4	lechoso	cremoso
5	lechoso, cocido	cremoso intenso
6	leche en polvo, dulce	cremoso, mantecoso
7	lechoso, graso, mantecoso, dulce	mantecoso, cremoso
8	-	mantequilla malteada
9	-	mantequilla cremosa
10	-	mantecoso

25 Los resultados de la evaluación sensorial del producto láctico fermentado demuestran que el producto láctico fermentado tiene un sabor y aroma predominantemente cremoso.

30 Con el fin de determinar los componentes volátiles que generan el sabor cremoso y mantecoso se realiza un espectro de masas CG con compuestos de sabor ya conocidos. Se encuentra que el espectro de masas de la 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona es idéntico al espectro de masas de los compuestos volátiles que generan el sabor cremoso mantecoso. Se encuentra además que el compuesto 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona tiene un sabor a mantequilla (véase por ejemplo la patente US n° 4,889,736). Es, pues, sorprendente que la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM n° 1-4404) o el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* (CNCM n° 1-4405) pueda emplearse para la obtención de la 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona.

35 Después de haber descrito la presente invención con detalle se da por supuesto que la descripción detallada no pretende en modo alguno limitar el alcance de la invención.

Lo que se desea proteger con derechos patentarios se define en las reivindicaciones que siguen.

40

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria de ácido láctico, *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* depositada como CNCM nº 1-4404.
- 5 2. Una bacteria de ácido láctico, *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* depositada como CNCM nº 1-4405.
3. Un método de fabricación de un producto láctico fermentado que tiene por lo menos un sabor y aroma a crema, que consiste en:
- 10 - proporcionar una fuente láctea,
- añadir opcionalmente citrato a la fuente láctea para formar una fuente láctea suplementada,
- añadir a la leche o a la fuente láctea suplementada un *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* depositado como CNCM nº 1-4404 o un *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* depositado como CNCM nº 1-4405 para formar una mezcla; y
- 15 - fermentar la mezcla para obtener el producto láctico fermentado.
4. El método según la reivindicación 3 que consiste además en concentrar el producto láctico fermentado y formar un concentrado de producto láctico fermentado.
- 20 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4 que consiste además en secar el producto láctico fermentado o el concentrado de leche fermentada y en formar un polvo.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones de 3 a 5, en el que la fuente láctea se elige por lo menos entre uno de los siguientes: leche grasa entera, leche desnatada, leche semidesnatada, leche fresca, leche recombinada, crema, suero de leche, suero y grasas vegetales que contienen leche.
- 25 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones de 3 a 6 que consiste además en la adición de por lo menos una de las siguientes: una enzima lipasa y una enzima lactasa a la fuente láctea.
- 30 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones de 3 a 7 que consiste además en añadir un cofactor de fermentación a la fuente láctea.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones de 3 a 8, en el que se añade citrato, con preferencia citrato trisódico, a la fuente láctea en una cantidad del 0,01 al 5 % en peso.
- 35 10. Un producto láctico fermentado con por lo menos un sabor y aroma a crema que puede obtener por el método de una cualquiera de las reivindicaciones de 3 a 9.
11. Un producto destinado al consumo de animales mamíferos, que contiene el producto láctico fermentado de la reivindicación 10.
- 40 12. Un producto alimentario que contiene una bacteria de ácido láctico, *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* depositado como CNCM nº 1-4404 o el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* depositado como CNCM nº 1-4405 y por lo menos uno de los siguientes: diacetilo, acetoína y 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona.
- 45 13. Un cultivo que contiene la bacteria de ácido láctico, *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* depositado como CNCM nº 1-4404 o el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* depositado como CNCM nº 1-4405.
14. El uso de una bacteria de ácido láctico, *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* depositado como CNCM nº 1-4404 o el *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* depositado como CNCM nº 1-4405 para aportar por lo menos un sabor y aroma a crema a una fuente láctea.
- 50 15. El uso de una bacteria de ácido láctico, *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* depositado como CNCM nº 1-4404 o a *Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis* depositado como CNCM nº 1-4405 para la obtención de la
- 55 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona.