

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 469**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12P 7/26 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
C12P 7/24 (2006.01)
C12P 7/04 (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/EP2011/073489**
87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12085009**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2011 E 11799436 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2655594**

54 Título: **Modulación de sabor por tratamiento biológico empleando cepas bacterianas que generan sabor**

30 Prioridad:

20.12.2010 EP 10195845

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

04.07.2017

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 2 621 469 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 tratamiento biológico empleando cepas bacterianas que generan sabor

5 Ámbito de la invención

La presente invención se refiere a la generación de sabor y aroma en productos lácteos. La generación de sabor y aroma en productos lácteos 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 productos importantes para el consumidor. Los productos lácteos fermentados pueden ser, por ejemplo, quesos, sueros de leche y yogures. Los productos lácteos fermentados se fabrican fermentando 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 de ácido láctico se traduce en la acidificación de la fuente láctea durante la fabricación del producto lácteo fermentado. Durante la fermentación de la fuente láctea pueden tener lugar otras reacciones en las que intervienen 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 un sabor y aroma en los productos lácteos fermentados. Además, la fermentación de la fuente láctea con las cepas bacterianas aumenta la estabilidad al almacenaje 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 las Lactobacillales.

35 La publicación de solicitud de patente internacional nº WO 2008/049581 de la solicitante Nestec SA se titula "Taste and flavour modulation by biotransformation in milk products". En esta publicación de solicitud de patente internacional nº WO 2008/049581 se describe un método para generar un sabor no aromático en un producto alimentario.

40 La publicación de solicitud de patente internacional nº WO 02/085131 del solicitante New Zealand Dairy Board se titula "Method of preparing savoury-flavoured products by fermentation of proteins". En esta publicación de solicitud de patente internacional No. 02/085131 se describe un método para la fabricación de un producto sabroso aromático a partir de una fuente de proteínas empleando una combinación de dos cepas bacterianas distintas. La fuente de proteínas puede ser una planta de soja, de trigo, de arroz, leche o suero. La primera cepa bacteriana se elige entre el grupo de los *Macrococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Anthrobacter* y *Corynebacterium*, con preferencia el *Macrococcus caseolyticus*. La segunda cepa bacteriana se elige entre el grupo de bacterias de ácido láctico *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* o *Leuconostoc*. El producto sabroso aromático puede combinarse con otros ingredientes para formar productos tales como el queso, geles de proteína y agua, yogures, cremas, natillas, salsas y productos de confitería.

50 La publicación de solicitud de patente internacional nº WO 02/00845 del solicitante Nizo Food Research se titula "Enhanced flavour production in or relating to food by cultivation of various food grade micro-organisms". En esta publicación de solicitud de patente internacional nº WO 02/00845 se describen nuevos cultivos mixtos de dos o más cepas de microorganismos, en las que por lo menos una de las cepas de microorganismo, que forma parte de dicho cultivo mixto, se elige a título individual en base a su capacidad de llevar a cabo una parte del mecanismo enzimático y dichas dos o más cepas de microorganismos elegidas realizan, juntas, el 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 o un queso o un embutido (salchicha). Dichas dos o más cepas de microorganismos se cultivan con preferencia de modo simultáneo. Las formas de ejecuciones particulares y preferidas son cultivos de inicio para la fabricación de queso. Los cultivos mixtos contienen una combinación de varias cepas *Lactococcus* y una combinación de una cepa de *Brevibacterium* y una cepa de *Staphylococcus*, respectivamente.

65 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., aparecido en *Milchwissenschaft* 64(1), pp. 26-29,

2009, se refiere a una cepa que produce leche fermentada aceptable para un grupo de personas que participan en una prueba sensorial (sensory panel) a pesar de la presencia de un sabor ligeramente malteado (malty).

5 El artículo "Production of fermented milk using a malty compounding-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetilactis*, isolated from Zimbabwean naturally fermented milk" de Narvhus y col., aparecido en *Internat. J. Food Microbiol.* 41, pp. 73-80, 1998, se refiere a la preparación de leche fermentada a partir de diversas leches, empleando una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetilactis* aislada a partir de leche fermentada de modo natural en Zimbabue.

10 Sin embargo, debido al gran número de cepas bacterianas de ácido láctico y a sus interacciones con los individuos no es posible predecir si la selección de ciertas cepas bacterianas de ácido láctico va a producir ciertos sabores y aromas en los productos lácteos fermentados.

15 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 que se emplean 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.

20 Además el consumidor percibe negativamente los aditivos artificiales. Hay demanda de nuevos sabores y aromas obtenidos por métodos naturales que permitan evitar los aditivos artificiales.

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

25 Existe además una demanda de productos que permitan superar los problemas ya mencionados de la técnica anterior.

Resumen de la invención

30 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método de fabricación de un producto lácteo fermentado. El producto lácteo fermentado tiene por lo menos un sabor y aroma malteados. El método consiste en aportar una fuente láctea, formar una fuente láctea suplementada con aminoácidos, a la fuente láctea suplementada con aminoácidos se le añade el *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetilactis* (nº CNCM I-1962) para formar una mezcla. Después se fermenta la mezcla para fabricar el producto lácteo fermentado.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto lácteo fermentado con por lo menos un sabor y aroma malteados obtenido por el método recién mencionado.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto para el consumo de mamíferos que contiene el producto lácteo fermentado con por lo menos un sabor y aroma malteados.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto alimentario que contiene una bacteria de ácido láctico, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetilactis* (nº CNCM I-1962) y uno cualquiera de 2-metilpropanal, 2/3-metilbutanal, fenilacetaldehído y 2/3-metilbutanol.

50 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una bacteria de ácido láctico, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetilactis* (nº CNCM I-1962) para conferir por lo menos por lo menos un sabor y aroma malteados a una fuente láctea.

55 Los inventores presentes se han sorprendido al encontrar que una bacteria de ácido láctico, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetilactis* (nº CNCM I-1962) confiere dicho sabor y aroma a los productos lácteos fermentados.

Descripción detallada de la invención

60 Para la comprensión perfecta de la presente invención y de las ventajas de la misma, se remite a la siguiente descripción detallada de la invención.

65 Se podrá apreciar que varios aspectos de la presente invención son puramente ilustrativos de los diferentes métodos de llevar a la práctica y del uso de la presente invención.

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.

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

5 La bacteria de ácido láctico es el *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. La bacteria de ácido láctico, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* NCC 2415 se depositó en 1997 con el Instituto Pasteur, Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) con el número CNCM I-1962.

10 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 leche tratada por UHT, leche pasteurizada o leche no pasteurizada. La fuente láctea puede ser leche entera con toda la grasa, leche desnatada o leche semidesnatada. Además, la fuente láctea puede ser leche fresca, leche recombinada, leche que contenga grasas vegetales o cualquier mezcla de las mismas.

15 La conversión de los aminoácidos en compuestos volátiles de sabor y de aroma desempeña un papel importante en la tecnología de los alimentos. La conversión de los aminoácidos en compuestos volátiles de sabor y de aroma puede llevarse a cabo con la bacteria de ácido láctico. Hay pues demanda de suplementar la fuente láctea con aminoácidos. Es decir, que los aminoácidos son un suplemento para la fuente láctea además de cualquier aminoácido que ya esté presente por naturaleza en la fuente láctea. Con el fin de suplementar la fuente láctea se
20 añade a dicha fuente láctea por lo menos con uno de los siguientes: un aminoácido, una proteasa o una peptidasa o cualquier mezcla de los mismos. Los aminoácidos son por lo menos uno de los siguientes: L-fenilalanina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina. Es preferible que las peptidasas sean exopeptidasas que se aplican en forma de preparación enzimática (producida por ejemplo por el *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Rhizopus oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Ananas comosus*) o en forma de cepas microbianas que tengan actividad exoproteolítica (por ejemplo *L. helveticus*,
25 *S. thermophilus*, *L. plantarum*, las subespecies de *L. lactis*). Las peptidasas o proteasas liberan aminoácido(s), por ejemplo la L-fenilalanina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina por interacción con péptidos y proteínas que están presentes de forma natural en la fuente láctea.

30 Los aminoácidos se convierten en compuestos volátiles de sabor y aroma, que son compuestos volátiles de sabor y aroma de tipo miel, de tipo malta o de tipo chocolate.

Las peptidasas o proteasas pueden añadirse sin aminoácido(s) o con aminoácidos. El por lo menos uno de los aminoácidos, proteasas o peptidasas o cualquier mezcla de los mismos 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
35 1,0 % en peso, con preferencia especial del 0,05 al 0,3 % en peso.

A la fuente láctea suplementada se le añade la bacteria de ácido láctico, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (nº CNCM I-1962) para formar una mezcla.

40 La lipasa puede añadirse también a la fuente láctea o a la mezcla para producir el sabor y aroma deseado en los productos lácteos fermentados. La lipasa hidroliza las grasas de la fuente láctea para formar por ejemplo diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres o cualquier mezcla de los mismos. Los diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres confieren un sabor cremoso al producto lácteo fermentado. La lactasa puede añadirse también a la fuente láctea o a la mezcla para producir el sabor y aroma deseado en los productos lácteos
45 fermentados. La lactasa hidroliza el disacárido lactosa de la fuente láctea convirtiéndola en galactosa y glucosa. La glucosa y la galactosa se emplean como compuestos previos de sabor para la generación de sabores de tipo caramelo y de tipo leche condensada edulcorada.

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

Después 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 lácteo fermentado de sabor y aroma malteados. La fermentación se deja progresar a una temperatura de aproximadamente 30°C durante un tiempo comprendido entre
60 6 y 24 horas. Opcionalmente pueden añadirse también cofactores que mejoran la fermentación, por ejemplo el alfa-cetoglutarato, sales de manganeso o de magnesio antes de la fermentación.

En función de la fuente láctea se podrá apreciar que el producto lácteo fermentado con sabor y aroma malteados puede presentarse en forma de suspensión (slurry) (de tipo yogur) o de líquido. Además, el producto lácteo fermentado puede secarse o concentrarse.

65

El producto lácteo fermentado de sabor y aroma malteados puede secarse, con preferencia por atomización y seguidamente convertirse en polvo.

- 5 El producto lácteo fermentado de sabor y aroma malteados puede tener aplicaciones en productos alimentarios y durante la fabricación de productos alimentarios. Por ejemplo, el polvo de sabor y aroma malteados puede tener aplicaciones en la industria de las bebidas para conferir un sabor y aroma malteados a dichas bebidas. Por ejemplo, el polvo de sabor y aroma malteados puede tener aplicaciones en la industria de los alimentos conferir un sabor y aroma malteados a dichos alimentos.

10 Ejemplos

Los productos lácteos fermentados fabricados se analizan con un olfato electrónico basado en la espectrometría de masas y en la espectrometría de masas combinada con la cromatografía de gases (CG-EM).

- 15 El análisis con un olfato electrónico basado en la espectrometría de masas es un método de análisis directo, en el que el producto lácteo fermentado se introduce directamente en la fuente iónica sin necesidad de procesos de separación y por ello permite ahorrar tiempo. La determinación de compuestos volátiles a partir de los espectros de masas obtenidos contiene una información limitada para la identificación de los componentes del aroma. La identificación inequívoca de los distintos compuestos presentes no es posible sin la separación previa y la fragmentación selectiva de los mismos, es decir, la CG-EM.

- 20 La cromatografía de gases combinada con la espectrometría de masas (CG-EM) proporciona la separación y detección necesarias de los compuestos volátiles. La CG-EM se emplea para obtener los fragmentos de EM pertenecientes a los componentes específicos del aroma. La identificación inequívoca de las moléculas por CG-EM en combinación con la olfatometría es imprescindible para analizar los compuestos volátiles que tienen un olor específico.

- 30 Los métodos de extracción empleados habitualmente para aislar los componentes volátiles de los productos lácteos fermentados son la destilación con vacío y posterior extracción del disolvente, la purga y captura (PT) y las técnicas del espacio de cabeza, por ejemplo la microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME). La purga y captura (PT) y los métodos del espacio de cabeza identifican los compuestos volátiles con diferentes rendimientos, pero con una reproducibilidad similar. La PT parece ser más sensible, mientras que la SPME es una técnica más rápida y menos costosa.

- 35 Los reactivos se emplean tal como se reciben, sin tratamiento previo, a menos que se indique otra cosa.

Ejemplo 1

A - Reactivación de la bacteria de ácido láctico

- 40 La bacteria de ácido láctico, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (nº CNCM I-1962) en ampollas se reactiva 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.

- 45 La bacteria de ácido láctico, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (nº CNCM I-1962) se almacena a 6°C durante dos semanas y después se inocula a razón del 0,5% ((v/v) 0,05/10 ml de medio) en un cultivo.

- 50 El cultivo es M17x un caldo Terzaghi M17 (Merck 1.15029 y 5 g/l de glucosa (Merck 8342). Después de la fase de crecimiento (3 días) se almacenan los matraces a 6°C para formar la bacteria de ácido láctico reactivada.

Como alternativa el cultivo puede ser de leche desnatada.

B - Suplementación de la fuente láctea con aminoácidos

- 55 Se disuelve en agua estéril una solución 100 mM de aminoácidos de L-fenilalanina (Fluka, Buchs, Suiza) (1,65 g/100 ml), L-leucina (Merck, Darmstadt, Alemania) (1,31 g/100 ml), L-isoleucina (Merck, Darmstadt, Alemania) (1,31 g/100 ml), L-valina (Merck, Darmstadt, Alemania) (1,17 g/100 ml). Se filtra la solución de aminoácidos a través de un filtro de 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 aminoácidos 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.

C - Fermentación

- 65 La fermentación de la leche UHT se lleva a cabo por dos métodos (I -II).

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

5 II: "Tenax" (accumulation adsorbens, Marin-Epagnier, Suiza): muestreo en espacio de cabeza de fragmentos de compuestos volátiles de la fuente láctea, leche UHT, suplementada (10 mM L-leucina, L-isoleucina, L-valina y L-fenilalanina).

10 Se transfiere una parte alícuota de 50 µl de la bacteria de ácido láctico reactivada a 5 ml de fuente láctea, leche UHT, suplementada (inoculación al 1 %) en condiciones estériles y se incuba a 30°C en condiciones aeróbicas durante 16-24 horas en la oscuridad. La adición de 2,8 g de NaCl a los viales del espacio de cabeza facilita la expulsión de los compuestos volátiles del producto lácteo fermentado al espacio de cabeza para conseguir una liberación más intensa de los compuestos volátiles.

15 Un olfato electrónico detecta los fragmentos de compuestos volátiles en un intervalo de 40 - 100 m/z en el ensayo de leche UHT no suplementada (es decir, sin aminoácidos) y en el intervalo de 10 - 160 m/z en el ensayo de leche UHT suplementada (es decir, con aminoácidos).

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

D - Mediciones con olfato electrónico

25 Se efectúan análisis de los productos lácteos fermentados por mediciones realizadas con el olfato electrónico de una fuente láctea, la leche UHT, suplementada. II: medición "Tenax" en el espacio de cabeza de leche UHT suplementada con una solución 10 mM de Leu, Ile, Val y Phe. Los fragmentos de CG-EM [M]⁺ son 27, 29, 43, 45, 60, 70, 86, 87, 88, 91, 103 y 120.

30 E - pH y potencial redox

Se determina el pH del producto lácteo fermentado y se obtiene el valor 4,3 con un potencial redox de 50 mV.

F - Evaluación sensorial del producto lácteo fermentado

35 Después de la fermentación se mantienen los viales de vidrio cerrados hasta el inicio de la evaluación sensorial. Siete personas se encargan de la evaluación sensorial del producto lácteo fermentado. La evaluación sensorial se basa en los siguientes atributos, que se puntúan empleando la letra X. Una muestra en blanco (leche incubada) se toma como referencia. Con el fin de evaluar la influencia de las muestras de aminoácidos se preparan también
40 muestras sin aminoácidos (se añade solamente agua esterilizada) y se presentan al grupo de personas que participan en el ensayo. Los resultados se recogen a continuación, en ellos la letra X indica la percepción sensorial del producto lácteo fermentado.

mantecoso	-
almendra amarga	XX
floral	X
tipo pan	XXXX
cremoso	X
caramelo	-
fresa	-
fresco	-
afrutado	-
levadura	X
miel	X
yogur	-
tipo queso	-
lechoso	-
malteado	XXXX
almendra	XX
sabor a nuez	X
tipo papel	-
dulce	X
ácido	X
salado	-

vainilla	-
----------	---

Los resultados de la evaluación sensorial de los productos lácteos fermentados demuestran que el producto lácteo fermentado tiene un aroma y sabor de tipo pan malteado. Otros ensayos han puesto de manifiesto que con la selección del o de los aminoácido(s) pueden generarse diferentes sabores y aromas.

Ejemplo 2

A - Reactivación de la bacteria de ácido láctico

La reactivación de la bacteria de ácido láctico se lleva a cabo del modo descrito en el ejemplo 1.

B - Suplementación de la fuente láctea con aminoácidos

Se disuelve en agua estéril una solución de aminoácidos L-leucina (Merck, Darmstadt, Alemania) (1,31 g/100 ml), L-isoleucina (Merck, Darmstadt, Alemania) (1,31 g/100 ml), L-fenilalanina (Fluka, Buchs, Suiza) (1,65 g/100 ml). Se filtra la solución de aminoácidos a través de un filtro de 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 aminoácidos 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.

C - Fermentación

La fermentación de la leche UHT se lleva a cabo por dos métodos (I -II).

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

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

Se transfiere una parte alícuota de 500 μl de la bacteria de ácido láctico reactivada a 5 ml de fuente láctea, leche UHT, suplementada (inoculación al 2 %) en condiciones estériles y se incuba a 30°C en condiciones aeróbicas durante 16 horas en la oscuridad. La adición de 2,8 g de NaCl a los viales del espacio de cabeza facilita la expulsión de los compuestos volátiles del producto lácteo fermentado al espacio de cabeza para conseguir una liberación más intensa de los compuestos volátiles.

Un olfato electrónico detecta los fragmentos de compuestos volátiles en un intervalo de 40 - 100 m/z en el ensayo de leche UHT no suplementada (es decir, sin aminoácidos) y en el intervalo de 10 - 160 m/z en el ensayo de leche UHT suplementada (es decir, con aminoácidos).

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

D - Mediciones con olfato electrónico

Se efectúan análisis de los productos lácteos fermentados por mediciones realizadas con el olfato electrónico de una fuente láctea, la leche UHT, suplementada. II: medición "Tenax" en el espacio de cabeza de leche UHT suplementada con una solución 10 mM de Leu, Ile, Val y Phe. Los fragmentos de CG-EM $[M]^+$ son 27, 29, 43, 45, 60, 70, 86, 87, 88, 91, 103 y 120.

E - pH y potencial redox

Se determina el pH del producto lácteo fermentado y se obtiene el valor 4,78.

F - Evaluación sensorial del producto lácteo fermentado

Después de la fermentación se mantienen los viales de vidrio cerrados hasta el inicio de la evaluación sensorial. Diez personas se encargan de la evaluación sensorial del producto lácteo fermentado. La evaluación sensorial es una evaluación del sabor con el fin de obtener información acerca del efecto en boca y del sabor de los productos lácteos fermentados resultantes.

Las muestras se pasteurizan en todos los casos (85 °C durante 15 min en un baño de agua) y se diluyen hasta el 1 % en leche UHT (a una temperatura de 20-25°C). A continuación se recogen los resultados que detallan las sensaciones producidas en los participantes en el ensayo.

participante	blanco de leche UHT incubada	producto lácteo fermentado
1	ligeramente lechoso	malteado, ovomaltina
2	lechoso, leche UHT ligeramente agria	muy malteado, tipo ovomaltina, dulzón, ligeramente tipo chocolate
3	lechoso, ligeramente almendra amarga	a levadura
4	lechoso	malteado
5	lechoso, cocido	malteado
6	leche en polvo, dulce	malta con una nota de miel
7	lechoso, graso, mantecoso, dulce	cereales malteados
8	-	malteado
9	-	malteado, miel
10	-	añejo, rancio

5 Los resultados de la evaluación sensorial del producto lácteo fermentado demuestran que el producto lácteo fermentado tiene un sabor y aroma predominantemente malteado con un poco de aroma y sabor de tipo miel y chocolate.

10 La nota malteada puede atribuirse a la presencia del 2-metilpropanal, 2/3-metilbutanal, fenilacetaldehído y 2/3-metilbutanol que se detectan en las mediciones realizadas con el olfato electrónico.

Después de haber descrito la presente invención en detalle, se da por supuesto que la descripción detallada no tiene por finalidad limitar el alcance de la invención.

15 Lo que se desea proteger con la patente descrita se define en las reivindicaciones que siguen.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la fabricación de un producto lácteo fermentado con por lo menos un sabor y aroma malteados que consiste en:
- 5
- aportar una fuente láctea,
 - formar fuente láctea suplementada con aminoácidos,
 - añadir a la fuente láctea suplementada con aminoácidos el *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, depositado con el número CNCM I-1962, para formar una mezcla; y
 - fermentar la mezcla para fabricar el producto lácteo fermentado.
- 10
2. El método según la reivindicación 1, en el que la formación de la fuente láctea suplementada con aminoácidos consiste por lo menos en uno de los siguientes: la adición de por lo menos un aminoácido, la adición de una proteasa o la adición de una peptidasa a la fuente láctea.
- 15
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que consiste además en secar el producto lácteo fermentado y en formar un polvo.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que consiste además en concentrar el producto lácteo fermentado y formar un concentrado de producto lácteo fermentado.
- 20
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fuente láctea se elige entre por lo menos uno de los siguientes: leche entera con toda su grasa, leche desnatada, leche semidesnatada, leche fresca, leche recombinada, crema, suero de leche, suero y leche que contiene grasas vegetales.
- 25
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos un aminoácido se elige entre la L-fenilalanina, L-leucina, L-isoleucina y L-valina.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la peptidasa es una exopeptidasa.
- 30
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteasa es una exoproteasa.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que consiste además en la adición de por lo menos uno de los siguientes: una enzima lipasa y una enzima lactasa a la fuente láctea.
- 35
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que consiste además en la adición de un cofactor de fermentación a la fuente láctea.
11. Un producto lácteo fermentado con por lo menos un sabor y aroma malteados que puede obtenerse el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 40
12. Un producto para el consumo de mamíferos que contiene el producto lácteo fermentado de la reivindicación 11.
13. Un producto alimentario que contiene el *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, depositado con el número CNCM I-1962, y uno cualquiera de los siguientes: 2-metilpropanal, 2/3-metilbutanal, fenilacetaldehído y 2/3-metilbutanol.
- 45
14. El uso de la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, depositada con el número CNCM I-1962, para conferir por lo menos un sabor y aroma malteados a una fuente láctea.
- 50