

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 554**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23C 9/12 (2006.01)

A23L 29/269 (2006.01)

A23L 27/00 (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/EP2011/073491**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12085011**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2011 E 11804558 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2655596**

54 Título: **Modulación del sabor por fermentación de una fuente láctea para la formación de sabores múltiples con un cóctel de cepas bacterianas**

30 Prioridad:

20.12.2010 EP 10195855

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

14.09.2017

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 2 632 554 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

5 Modulación del sabor por fermentación de una fuente láctea para la formación de sabores múltiples con un cóctel de cepas bacterianas

Comparación con solicitudes de patente relacionadas

Ninguna

10 **Ámbito de la presente invención**

La presente invención se refiere a la generación de sabores y aromas en productos lácteos. La generación de sabores y aromas en los productos lácteos se logra mediante el uso de cepas bacterianas durante la fermentación de una fuente láctea.

15 **Antecedentes de la presente invención**

La fermentación es una transformación de hidratos de carbono en ácidos orgánicos u otros compuestos mediante el uso de cepas bacterianas.

20 Los productos lácteos fermentados son artículos de gran consumo. Pueden ser, por ejemplo, quesos, mantequillas y yogures. Los productos lácteos fermentados se elaboran por fermentación de una fuente láctea.

25 Una fuente láctea, como por ejemplo la leche, contiene el carbohidrato lactosa. Durante la fermentación de la fuente láctea las cepas bacterianas fermentan el carbohidrato lactosa produciendo ácido láctico. La producción de ácido láctico acidifica la fuente láctea durante la elaboración del producto lácteo 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.

30 La fermentación de la fuente láctea con cepas bacterianas es responsable de la generación del sabor y del aroma en los productos lácteos fermentados. Además la fermentación de la fuente láctea con las cepas bacterianas aumenta la vida útil de los productos lácteos fermentados.

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

40 Una solicitud de patente internacional con el nº de publicación WO 2008/049581, del solicitante Nestec SA, se titula "Modulación del sabor y del aroma en productos lácteos por biotransformación". La solicitud de patente internacional con el nº de publicación WO 2008/049581 revela un método para desarrollar un sabor no salado en un producto alimenticio.

45 Una solicitud de patente internacional con el nº de publicación WO 02/085131, del solicitante New Zealand Dairy Board, se titula "Método para preparar productos de gusto sabroso por fermentación de proteínas". La solicitud de patente internacional con el nº de publicación WO 02/085131 revela un método para elaborar un producto de gusto sabroso a partir de una fuente proteica, utilizando una combinación de dos cepas bacterianas distintas. La fuente de proteína puede ser soja, trigo, arroz, leche o suero de leche. Una primera cepa bacteriana se selecciona del grupo formado por los géneros Macrocooccus, Micrococcus, Enterococcus, Staphylococcus, Brevibacterium, Anthrobacter y Corynebacterium, preferentemente de la especie Macrocooccus caseolyticus. Una segunda cepa bacteriana se elige del grupo de bacterias de ácido láctico - Lactococcus, Lactobacillus, Pediococcus o Leuconostoc. El producto de gusto sabroso se puede combinar con otros ingredientes para formar productos tales como quesos, geles acuosos de proteína, yogures, cremas, natillas, salsas y productos de repostería.

50

55 Una solicitud de patente internacional con el nº de publicación WO 02/00845, del solicitante Nizo Food Research, se titula "Potenciación del sabor en alimentos o en relación con ellos por cultivo de varios microorganismos de calidad alimentaria". La solicitud de patente internacional con el nº de publicación WO 02/00845 revela unos nuevos cultivos mixtos de dos o más cepas de microorganismos, en los cuales al menos una de las cepas de microorganismo está seleccionada individualmente en función de su capacidad para desarrollar parte de una vía enzimática, y dichas dos o más cepas de microorganismos forman en conjunto una vía completa hacia un componente de sabor deseado. El cultivo mixto sirve para elaborar un producto fermentado tal como un yogur, un queso o una salsa. Dichas dos o más cepas de microorganismos se cultivan preferiblemente de manera conjunta. Las formas de ejecuciones particulares y preferidas son cultivos iniciadores para la elaboración de queso. El cultivo mixto comprende una combinación de varias cepas de Lactococcus y una combinación de una cepa de Brevibacterium y una cepa de Staphylococcus respectivamente.

60

65

- 5 Un artículo de Monnet y otros en el Journal of Microbiological Methods 37 (1999) p. 183-185, titulado "An improved method for screening alpha-acetolactate producing mutants" [*Método mejorado para detectar mutantes productores de alfa-acetolactato*], revela el empleo de la cepa bacteriana Lactococcus Lactis ssp. Lactis Biovar diacetylactis en la industria láctea para producir diacetilo. El diacetilo es un componente principal del sabor en los productos lácteos cultivados.
- 10 Un artículo de Boumerdassi y otros en el Journal of Dairy Science vol. 80, publicación 4 (1997) p. 634-639, se titula "Effect of citrate on production of diacetyl and acetoin by Lactococcus Lactis ssp. Lactis CNRZ 483 cultivated in the presence of oxygen" [*Efecto del citrato en la producción de diacetilo y acetoína por Lactococcus Lactis ssp. Lactis CNRZ 483 cultivado en presencia de oxígeno*]. El artículo de Monnet y otros revela los efectos de la adición de citrato trisódico en el crecimiento y la formación de diacetilo y acetoína por Lactococcus Lactis ssp. Lactis CNRZ 483 en un medio a base de suero de leche.
- 15 El artículo "Characterisation of a malty-compound producing Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis C1 strain isolated from naturally fermented milk" [*Caracterización de una cepa bacteriana Lactococcus Lactis subsp. Lactis Biovar diacetylactis C1, productora de compuestos maltosos, aislada de leche fermentada naturalmente*] de Mutukumira y otros (2009) Milchwissenschaft 64(1) p. 26-29, se refiere a una cepa que produjo leche fermentada aceptable para un panel sensorial, a pesar de la presencia de un ligero sabor a malta.
- 20 El artículo "Diacetyl production by different strains of Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis and Leuconostoc spp" [*Producción de diacetilo por distintas cepas de Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis y Leuconostoc spp.*] de Hugenholtz y Starrenburg (1992) Appl. Microbiol. Biotechnol 38, p. 17-22, se refiere a la comparación de varias cepas para la formación de producto a partir de citrato en cultivos lácteos.
- 25 Los productos lácteos fermentados tienen una gran variedad de sabores y aromas, dependiendo de la fuente láctea y de las cepas bacterianas de ácido láctico empleadas para fermentar la fuente láctea.
- 30 Sin embargo, debido a la cantidad de cepas bacterianas de ácido láctico y a sus interacciones con las personas, no hay una selección fiable de determinadas cepas bacterianas de ácido láctico para la producción de ciertos sabores y aromas en los productos lácteos fermentados.
- Hay necesidad de proporcionar métodos y cepas bacterianas de ácido láctico que sean responsables de sabores y aromas específicos en los productos lácteos fermentados.
- 35 Por otro lado los aditivos artificiales son percibidos negativamente por el consumidor. Hay necesidad de proporcionar sabores y aromas de manera natural, evitando los aditivos artificiales.
- También hay necesidad de proporcionar sabores y aromas utilizables en una amplia variedad de alimentos.
- 40 Por consiguiente hay necesidad de superar los problemas del estado técnico mencionados anteriormente.
- Resumen de la presente invención
- 45 En un primer aspecto la presente invención se refiere a una combinación de la bacteria de ácido láctico Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis (CNCM nº 1-4404) con la bacteria de ácido láctico Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis (CNCM nº 1-1962).
- 50 En otro aspecto la presente invención se refiere a una combinación de la bacteria de ácido láctico Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis (CNCM nº 1-4405) con la bacteria de ácido láctico Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis (CNCM nº 1-1962).
- 55 En otro aspecto la presente invención se refiere al empleo de cualquiera de las combinaciones anteriormente citadas para impartir al menos un sabor y un aroma de malta-chocolate-miel-mantequilla-nata a una fuente láctea.
- 60 Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para elaborar un producto lácteo fermentado. El producto lácteo fermentado tiene al menos un sabor y un aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata. El método consiste en aportar una fuente láctea, que se suplementa con aminoácidos y a la cual se le añade citrato trisódico. A continuación se agrega un Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis (CNCM nº 1-4404) o un Lactococcus lactis subsp. lactis diacetylactis (CNCM nº 1-4405). Luego se añade un Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis (CNCM nº 1-1962) con el fin de formar una mezcla que finalmente se fermenta para elaborar el producto lácteo fermentado.
- 65 En otro aspecto la presente invención se refiere a un producto lácteo fermentado que tiene al menos un sabor y un aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata, obtenible mediante dicho método.
- En otro aspecto la presente invención se refiere a un producto de consumo para un mamífero, que lleva el producto lácteo fermentado.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un producto alimenticio que lleva un *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404) y un *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (CNCM nº 1-1962) o a un producto alimenticio que comprende un *Lactococcus lactis* subsp. *lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405) y un *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (CNCM nº 1-1962), de manera que el producto alimenticio lleva al menos diacetilo, acetoína o 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanediona y al menos 2-metilpropanal, 2/3-metilbutanal, fenilacetaldehído o 2/3-metilbutanol. Los presentes inventores se sorprendieron al ver que una única combinación de cepas bacterianas de este tipo era responsable de proporcionar tal perfil de sabor y aroma a los productos lácteos fermentados.

10 Descripción detallada de la presente invención

Para una comprensión completa de la presente invención y de sus ventajas se remite a la siguiente descripción detallada de la presente invención.

15 Debe apreciarse que varios aspectos de la presente invención son meramente ilustrativos de los métodos concretos para realizar y usar la presente invención.

Estos varios aspectos de la presente invención se pueden combinar con otros aspectos de la misma y no limitan su alcance al tomarlos en consideración con las reivindicaciones y la siguiente descripción detallada.

20 La presente invención se refiere a productos lácteos fermentados. Los productos lácteos fermentados se elaboran por fermentación de una fuente láctea con un cóctel de bacterias de ácido láctico, a fin de aportar sabor y aroma a los productos lácteos fermentados.

25 El cóctel de bacterias de ácido láctico puede ser una combinación de la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404) con la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (CNCM nº 1-1962).

30 El cóctel de bacterias de ácido láctico también puede consistir en una combinación de la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405) con la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (CNCM nº 1-1962).

35 Las bacterias de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4404) y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis diacetylactis* (CNCM nº 1-4405) se depositaron el 25 de noviembre de 2010 en la Colección nacional de cultivos de microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur.

La bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (CNCM nº 1-1962) se depositó en 1997 en la Colección nacional de cultivos de microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur.

40 La fuente láctea puede ser cualquier tipo de leche, como por ejemplo la de vaca, oveja, cabra y búfalo, o cualquier mezcla de las mismas. La fuente láctea puede ser leche sometida a un tratamiento UHT, leche pasteurizada o leche no pasteurizada. La fuente láctea puede ser una leche entera, descremada o semidescremada. La fuente láctea también puede ser una leche fresca, recombinada o con contenido de grasa vegetal y cualquier mezcla de ellas.

45 La conversión de aminoácidos en compuestos volátiles saborizantes y aromatizantes tiene un papel importante en la tecnología alimentaria. La conversión de aminoácidos en compuestos volátiles saborizantes y aromatizantes puede lograrse mediante el cóctel de bacterias de ácido láctico. Por lo tanto es necesario suplementar la fuente láctea con aminoácidos, es decir incorporar aminoácidos a la fuente láctea además de cualquier aminoácido que por naturaleza esté presente en ella. Para suplementar la fuente láctea se le añade al menos uno o más aminoácidos, una proteasa o una peptidasa o cualquier mezcla de ellos. Los aminoácidos son al menos L-fenilalanina, L-leucina, L-isoleucina o L-valina. Es preferible que las peptidasas sean exo-peptidasas utilizadas como preparación enzimática (por ejemplo, producidas por *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Rhizopus oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Ananas comosus*) o como cepas microbianas con acción exoproteolítica (por ejemplo *L. helveticus*, *S. thermophilus*, *L. plantarum*, *L. lactis* subespecies). Las peptidasas o proteasas liberan aminoácidos como L-fenilalanina, L-leucina, L-isoleucina o L-valina mediante una interacción con péptidos y proteínas presentes por naturaleza en la fuente láctea.

55 Los aminoácidos se transforman en compuestos volátiles saborizantes y aromatizantes parecidos a los compuestos volátiles de sabor y aroma a miel, a malta o a chocolate, tal como se discute a continuación.

60 Las peptidasas o proteasas liberan se pueden añadir sin o con el o los aminoácidos. Como mínimo un aminoácido, la proteasa o la peptidasa, o cualquier mezcla de ellos, se añade a la fuente láctea en una proporción del 0,01 al 5% en peso, preferiblemente del 0,01-2% en peso, con mayor preferencia del 0,03-1,0% en peso, sobre todo del 0,05-0,3% en peso.

65 La conversión de citrato en compuestos volátiles saborizantes y aromatizantes también tiene un papel importante en la tecnología alimentaria. La conversión de citrato en compuestos volátiles saborizantes y aromatizantes se puede

lograr mediante el cóctel de bacterias de ácido láctico. Por lo tanto es necesario suplementar la fuente láctea con un compuesto de citrato, p.ej. citrato trisódico.

5 Al fermentar, el citrato se convierte en compuestos volátiles saborizantes y aromatizantes. Los compuestos volátiles saborizantes y aromatizantes tienen al menos un sabor y un aroma similares a los de la nata, tal como se discute a continuación.

10 El citrato trisódico se añade a la fuente láctea en una proporción del 0,01 al 5% en peso, preferiblemente del 0,01-2% en peso, con mayor preferencia del 0,03-1,0% en peso, sobre todo del 0,05-0,3% en peso.

15 A la fuente láctea también se le puede añadir lipasa, antes o en el curso de la fermentación, para potenciar el sabor y el aroma 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, los monoglicéridos y los ácidos grasos imparten al producto lácteo fermentado un sabor similar al de la nata. Por lo tanto el uso de lipasa intensifica el sabor a nata del producto lácteo fermentado.

20 A la fuente láctea también se le puede añadir lactasa, antes o en el curso de la fermentación, para potenciar el sabor y el aroma en los productos lácteos fermentados. La lactasa hidroliza el disacárido lactosa a galactosa y glucosa en la fuente láctea. La glucosa y la galactosa se emplean como precursores del sabor a caramelo y a leche condensada edulcorada.

25 Si la fuente láctea, con o sin suplementos, es una leche no pasteurizada, ésta se puede pasteurizar, someter a un tratamiento a temperatura ultra elevada (leche UHT) o esterilizar bajo las condiciones conocidas del estado técnico. La pasteurización, el tratamiento a temperatura ultra elevada y la esterilización se efectúan a una temperatura entre 70°C y 150°C durante un tiempo comprendido entre 2 s y 20 min. Como alternativa, la fuente láctea se puede tratar térmicamente antes de suplementarla.

30 Una vez suplementada con los aminoácidos, a la fuente láctea se le añade el citrato trisódico. Después se agrega el cóctel de bacterias de ácido láctico para formar una mezcla. No importa el orden de adición de estos componentes, sino que todos ellos estén presentes en la mezcla.

35 Luego la mezcla se fermenta para elaborar el producto lácteo fermentado. Éste tiene sorprendentemente un sabor y aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata. Se deja fermentar a una temperatura aproximada de 30°C durante un tiempo comprendido entre 6 y 24 horas.

Antes o después de la etapa de fermentación también se pueden añadir cofactores que la mejoren, tales como alfa-cetoglutarato y sales de manganeso o de magnesio.

40 Dependiendo del tipo de fuente láctea, el producto lácteo fermentado, con el sabor y aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata, puede ser una suspensión o lechada (como un yogur) o un líquido.

45 El producto lácteo fermentado, con el sabor y aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata, se puede secar o concentrar. El producto lácteo fermentado con el sabor y aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata se puede secar, preferiblemente por atomización y luego convertir en polvo.

50 El producto lácteo fermentado, con el sabor y aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata, puede tener aplicación en productos alimenticios y en la elaboración de los mismos. Por ejemplo, el polvo con el sabor y aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata puede tener aplicación en la industria de bebidas para impartirles el sabor y aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata. Asimismo, el polvo con el sabor y aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata puede tener aplicación en la industria alimentaria para dar sabor y aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata a los productos alimenticios.

Ejemplos

55 Los productos lácteos fermentados, con el sabor y aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata, se analizaron con una nariz electrónica basada en espectrometría de masas y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

60 El análisis con una nariz electrónica basada en espectrometría de masas es un método directo de análisis en que el producto lácteo fermentado se coloca directamente en la fuente iónica, sin necesidad de procesos de separación y por tanto ahorra tiempo. La determinación de compuestos volátiles a partir de los espectros de masas resultantes contiene información limitada para la identificación de los componentes del aroma. La identificación inequívoca de cada uno de los compuestos presentes es imposible sin una separación previa y una fragmentación selectiva, es decir una GC-MS.

65

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) proporciona la separación necesaria y la detección de los compuestos volátiles. La GC-MS se usa para obtener fragmentos pertenecientes a un componente específico del aroma. La identificación inequívoca de las moléculas mediante GC-MS en combinación con el análisis olfatométrico es preceptiva para analizar los compuestos volátiles que tiene un olor concreto.

Los métodos de extracción empleados habitualmente para aislar los compuestos volátiles de los productos lácteos fermentados son la destilación al vacío seguida de extracción del disolvente y las técnicas de purga y trampa (PT) y de espacio de cabeza, como la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (MEFS-EC). Los métodos basados en técnicas de purga y trampa (PT) y de espacio de cabeza identifican compuestos volátiles con distintos rendimientos, pero con una reproducibilidad comparable. La PT resultó ser una técnica más sensible, mientras que la MEFS es más rápida y económica.

Cuando se emplearon, los reactivos fueron utilizados tal como se recibieron, sin ningún tratamiento previo, a no ser que se indique lo contrario.

Ejemplo 1

A - Reactivación de las bacterias de ácido láctico y del cóctel de bacterias de ácido láctico

La bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* diacetylactis (CNCM nº 1-4404) en ampollas se reactivó con 1 ml de leche reconstituida bajo condiciones estériles, se transfirió a tubos de vidrio esterilizados que contenían 9 ml de leche reconstituida y se incubó aeróbicamente a 30°C durante 24 h en la oscuridad. Luego las bacterias se conservaron a 6°C durante dos semanas y después se inocularon al 0,5% ((v/v) 0,05/10 ml de medio) en un cultivo. El cultivo fue en M17x (caldo M17 según Terzaghi, Merck 1.15029) y 5 g/l de glucosa (Merck 8342). Terminada la fase de crecimiento (3 días) los frascos se conservaron a 6°C para formar la bacteria de ácido láctico reactivada.

La bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis (CNCM nº 1-1962) en ampollas se reactivó con 1 ml de leche reconstituida bajo condiciones estériles, se transfirió a tubos de vidrio esterilizados que contenían 9 ml de leche reconstituida y se incubó aeróbicamente a 30°C durante 24 h en la oscuridad. La bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis (CNCM nº 1-1962) se conservó a 6°C durante dos semanas y después se inoculó al 0,5% ((v/v) 0,05/10 ml de medio) en un cultivo. El cultivo fue en M17x (caldo M17 según Terzaghi, Merck 1.15029) y 5 g/l de glucosa (Merck 8342). Tras la fase de crecimiento (3 días) los frascos se conservaron a 6°C para formar una bacteria de ácido láctico reactivada.

El cóctel de bacterias de ácido láctico se preparó mezclando en relación 1:1 las dos bacterias de ácido láctico arriba reactivadas.

Como alternativa el cultivo puede ser de leche descremada.

B – Suplementación de la fuente láctea con citrato trisódico y aminoácidos

Se preparó una solución acuosa 100 mM de citrato trisódico. La disolución de citrato trisódico se filtró a través de un tamaño de poro de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Whatmann, FP 30/0,45 µm, 7 bar max. CA-S).

Se preparó una solución de aminoácidos a una concentración de 100 mM. Se disolvió 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) y L-valina (Merck, Darmstadt, Alemania) (1,17 g/100 ml) en agua esterilizada. La solución de aminoácidos se filtró por un tamaño de poro de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Whatmann, FP 30/0,45 µm, 7 bar max. CA-S).

A 4,5 ml de leche UHT se añadieron 250 µl de la solución de citrato trisódico y 250 µl de la solución de aminoácidos.

C - Fermentación

La fermentación en leche UHT se llevó a cabo por dos métodos (I - II).

I: Muestreo Index (Inside needle dynamic extraction [*Extracción dinámica con una aguja revestida internamente*]; Hamilton) en espacio de cabeza de fragmentos de compuestos volátiles en leche UHT no suplementada.

II: Muestreo Tenax (adsorbente acumulativo, Marin-Epagnier, Suiza) en espacio de cabeza de compuestos volátiles en leche UHT suplementada.

Un alícuota de 50 µl del cóctel de bacterias de ácido láctico se transfirió a 5 ml de leche UHT suplementada (1% de inoculación) en condiciones estériles y se incubó aeróbicamente a 30°C durante 22 horas en la oscuridad.

Una adición de 2,8 g de NaCl a los viales de espacio de cabeza favoreció la expulsión de los compuestos volátiles del producto lácteo fermentado hacia el espacio de cabeza para intensificar el desprendimiento de los mismos.

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

10 Se realizó el análisis de componentes principales (ACP) usando el programa informático "The Unscrambler" (versión 9.7). Los resultados se calcularon con logaritmos de los datos primarios, excluyendo los blancos con agua y leche. Los cálculos se hicieron con todas las variables (fragmentos de MS) incluidas, a fin de agrupar las cepas en relación con patrones similares de fragmentos de MS y con la abundancia de los compuestos.

D – Mediciones con nariz electrónica

15 El producto lácteo fermentado se analizó efectuando mediciones con nariz electrónica en leche UHT suplementada. II: Medición Tenax en espacio de cabeza con leche UHT suplementada. Las masas de los fragmentos $[M]^+$ de GC-MS fueron 27, 29, 43, 45, 60, 70, 86, 87, 88 y 135.

E – Valoración sensorial del producto lácteo fermentado

20 Después de la fermentación los viales de vidrio se guardaron cerrados hasta el inicio de la valoración sensorial. A la valoración sensorial del producto lácteo fermentado asistieron siete personas. La valoración sensorial se basó en los siguientes atributos, que se marcaron con una X. Como referencia se usó una muestra en blanco (leche incubada).
25 Para comprobar la influencia del citrato trisódico también se prepararon muestras sin él (solo con adición de agua esterilizada) y se presentaron al panel. Los resultados se muestran a continuación. Una X indicó una percepción sensorial del producto lácteo fermentado por parte del panelista.

	Mantecoso	XXXX
	Almendras amargas	X
30	Floral	X
	A pan	X
	Cremoso	XXX
	Caramelo	-
	Fresa	-
35	Fresco	-
	Frutal	-
	Levadura	X
	Miel	XXX
	Yogur	-
40	A queso	-
	A leche	-
	A malta	XXX
	Almendra	XX
	A nueces	X
45	A papel	-
	Dulce	X
	Ácido	X
	Salado	-
50	A chocolate	XXX

Los resultados de la valoración sensorial del producto lácteo fermentado demuestran que tiene un sabor y un aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata.

55 El sabor y el aroma a malta pueden atribuirse a la presencia de 2-metilpropanal, 2/3-metilbutanal, fenilacetaldehído y 2/3-metilbutanol, que fueron determinados por las mediciones con nariz electrónica. El sabor y el aroma mantecoso/cremoso es debido a la presencia de diacetilo, acetoina y 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona. La combinación de las cepas bacterianas es responsable del sabor y aroma global del producto lácteo fermentado.

Ejemplo 2

60 A - Reactivación de las bacterias de ácido láctico y del cóctel de bacterias de ácido láctico

65 La bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* diacetylactis (CNCM nº 1-4405) en ampollas se reactivó con 1 ml de leche reconstituida bajo condiciones estériles, se transfirió a tubos de vidrio esterilizados que contenían 9 ml de leche reconstituida y se incubó aeróbicamente a 30°C durante 24 h en la oscuridad. Luego las bacterias se conservaron a 6°C durante dos semanas y después se inocularon al 0,5% ((v/v) 0,05/10 ml de medio) en un cultivo.

El cultivo fue en M17x (caldo M17 según Terzaghi, Merck 1.15029) y 5 g/l de glucosa (Merck 8342). Terminada la fase de crecimiento (3 días) los frascos se conservaron a 6°C para formar la bacteria de ácido láctico reactivada.

5 La bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (CNCM n° 1-1962) en ampollas se reactivó con 1 ml de leche reconstituida bajo condiciones estériles, se transfirió a tubos de vidrio esterilizados que contenían 9 ml de leche reconstituida y se incubó aeróbicamente a 30°C durante 24 h en la oscuridad. La bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (CNCM n° 1-1962) se conservó a 6°C durante dos semanas y después se inoculó al 0,5% ((v/v) 0,05/10 ml de medio) en un cultivo. El cultivo fue en M17x (caldo M17 según Terzaghi, Merck 1.15029) y 5 g/l de glucosa (Merck 8342). Tras la fase de crecimiento (3 días) los frascos se conservaron a 6°C para formar una bacteria de ácido láctico reactivada.

Como alternativa el cultivo puede ser de leche descremada.

15 El cóctel de bacterias de ácido láctico se preparó mezclando en relación 1:1 las dos bacterias de ácido láctico arriba reactivadas.

B – Suplementación de la fuente láctea con citrato trisódico y aminoácidos

20 Se preparó una solución acuosa 100 mM de citrato trisódico. La disolución de citrato trisódico se filtró a través de un tamaño de poro de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Whatmann, FP 30/0,45 µm, 7 bar max. CA-S).

25 Se preparó una solución de aminoácidos a una concentración de 100 mM. Se disolvió 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) y L-valina (Merck, Darmstadt, Alemania) (1,17 g/100 ml) en agua esterilizada. La solución de aminoácidos se filtró por un tamaño de poro de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Whatmann, FP 30/0,45 µm, 7 bar max. CA-S).

A 4,5 ml de leche UHT se añadieron 250 µl de la solución de citrato trisódico y 250 µl de la solución de aminoácidos.

C - Fermentación

La fermentación en leche UHT se llevó a cabo por dos métodos (I - II).

35 I: Muestreo Index (Inside needle dynamic extraction [*Extracción dinámica con una aguja revestida internamente*]; Hamilton) en espacio de cabeza de fragmentos de compuestos volátiles en leche UHT no suplementada.

II: Muestreo Tenax (adsorbente acumulativo, Marin-Epagnier, Suiza) en espacio de cabeza de compuestos volátiles en leche UHT suplementada.

40 Un alícuota de 50 µl del cóctel de bacterias de ácido láctico se transfirió a 5 ml de leche UHT suplementada (1% de inoculación) en condiciones estériles y se incubó aeróbicamente a 30°C durante 22 horas en la oscuridad.

45 Una adición de 2,8 g de NaCl a los viales de espacio de cabeza favoreció la expulsión de los compuestos volátiles del producto lácteo fermentado hacia el espacio de cabeza para intensificar el desprendimiento de los mismos.

Una nariz electrónica detectó los fragmentos de compuestos volátiles en un intervalo *m/z* de 40 - 100 para el ensayo con leche UHT no suplementada y en un intervalo *m/z* de 10 - 160 para el ensayo con leche UHT suplementada.

50 Se realizó el análisis de componentes principales (ACP) usando el programa informático "The Unscrambler" (versión 9.7). Los resultados se calcularon con logaritmos de los datos primarios, excluyendo los blancos con agua y leche. Los cálculos se hicieron con todas las variables (fragmentos de MS) incluidas, a fin de agrupar las cepas en relación con patrones similares de fragmentos de MS y con la abundancia de los compuestos.

D – Mediciones con nariz electrónica

55 El producto lácteo fermentado se analizó efectuando mediciones con nariz electrónica en leche UHT suplementada. II: Medición Tenax en espacio de cabeza con leche UHT suplementada. Las masas de los fragmentos [M]⁺ de GC-MS fueron 43, 55, 71, 77, 60, 88, 89, 99, 114, 120 y 131.

E – Valoración sensorial del producto lácteo fermentado

65 Después de la fermentación bacteriana los viales de vidrio se guardaron cerrados hasta el inicio de la valoración sensorial. A la valoración sensorial del producto lácteo fermentado asistieron siete personas. La valoración sensorial consistió en un dictamen del sabor para tener información sobre el efecto y gusto en boca de los productos lácteos fermentados resultantes.

En cada caso las muestras se pasteurizaron (a 85°C durante 15 minutos en un baño de agua) y se diluyeron al 1% en leche UHT (a una temperatura de 20-25°C). Los resultados indicados en la tabla siguiente detallan las inferencias de los panelistas.

Panelista	Blanco incubado con leche UHT	Producto lácteo fermentado
1	Ligeramente lechoso	malta-chocolate-miel-mantequilla-nata
2	Lechoso, leche UHT	malta-chocolate-miel-nata
3	Ligeramente ácido	malta-miel-mantequilla-nata
4	Lechoso, ligero	malta-chocolate-miel-mantequilla-nata
5	Lechoso	malta-chocolate-miel-mantequilla
6	Lechoso, grasiento	malta-miel-mantequilla-nata
7	Leche en polvo, dulce	malta-chocolate-miel-mantequilla-nata

5 Los resultados de la valoración sensorial del producto lácteo fermentado demuestran que tiene un sabor y un aroma muy parecido a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata.

10 El sabor y el aroma a malta pueden atribuirse a la presencia de 2-metilpropanal, 2/3-metilbutanal, fenilacetaldéhid y 2/3-metilbutanol, que fueron determinados por las mediciones con nariz electrónica. El sabor y el aroma mantecoso/cremoso es debido a la presencia de diacetilo, acetoina y 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona. La combinación de las cepas bacterianas es responsable del sabor y aroma global del producto lácteo fermentado.

15 Ejemplo 3

A - Reactivación de las bacterias de ácido láctico y del cóctel de bacterias de ácido láctico

Véase el ejemplo 2.

20 B – Suplementación de la fuente láctea con citrato trisódico y aminoácidos

Se preparó una solución acuosa 100 mM de citrato trisódico. La disolución de citrato trisódico se filtró a través de un tamaño de poro de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Whatmann, FP 30/0,45 µm, 7 bar max. CA-S).

25 Se preparó una solución de aminoácidos a una concentración de 100 mM. La solución de aminoácidos constaba de L-fenilalanina, L-isoleucina y L-valina. La solución se preparó disolviendo los aminoácidos en agua esterilizada. La disolución de aminoácidos se filtró a través de un tamaño de poro de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Whatmann, FP 30/0,45 µm, 7 bar max. CA-S).

30 A 4,5 ml de leche UHT se añadieron 250 µl de la solución de citrato trisódico y 250 µl de la solución de aminoácidos.

C - Fermentación

35 La fermentación en leche UHT se llevó a cabo por dos métodos (I - II).

I: Muestreo Index (Inside needle dynamic extraction [*Extracción dinámica con una aguja revestida internamente*]; Hamilton) en espacio de cabeza de fragmentos de compuestos volátiles en leche UHT no suplementada.

40 II: Muestreo Tenax (adsorbente acumulativo, Marin-Epagnier, Suiza) en espacio de cabeza de compuestos volátiles en leche UHT suplementada.

Un alícuota de 50 µl del cóctel de bacterias de ácido láctico se transfirió a 5 ml de leche UHT suplementada (1% de inoculación) en condiciones estériles y se incubó aeróbicamente a 30°C durante 18 horas en la oscuridad.

45 Una adición de 2,8 g de NaCl a los viales de espacio de cabeza favoreció la expulsión de los compuestos volátiles del producto lácteo fermentado hacia el espacio de cabeza para intensificar el desprendimiento de los mismos.

Una nariz electrónica detectó los fragmentos de compuestos volátiles en un intervalo *m/z* de 40 - 100 para el ensayo con leche UHT no suplementada y en un intervalo *m/z* de 10 - 160 para el ensayo con leche UHT suplementada.

50 Se realizó el análisis de componentes principales (ACP) usando el programa informático "The Unscrambler" (versión 9.7). Los resultados se calcularon con logaritmos de los datos primarios, excluyendo los blancos con agua y leche. Los cálculos se hicieron con todas las variables (fragmentos de MS) incluidas, a fin de agrupar las cepas en relación con patrones similares de fragmentos de MS y con la abundancia de los compuestos.

55

D – Mediciones con nariz electrónica

5 El producto lácteo fermentado se analizó efectuando mediciones con nariz electrónica en leche UHT suplementada. II: Medición Tenax en espacio de cabeza con leche UHT suplementada. Las masas de los fragmentos [M]⁺ de GC-MS fueron 43, 55, 71, 77, 60, 88, 89, 99, 114, 120 y 131.

E – Valoración sensorial del producto lácteo fermentado

10 Después de la fermentación bacteriana los viales de vidrio se guardaron cerrados hasta el inicio de la valoración sensorial. A la valoración sensorial del producto lácteo fermentado asistieron siete personas. La valoración sensorial consistió en un dictamen del sabor para tener información sobre el efecto y gusto en boca de los productos lácteos fermentados resultantes.

15 En cada caso las muestras se pasteurizaron (a 85°C durante 15 minutos en un baño de agua) y se diluyeron al 1% en leche UHT (a una temperatura de 20-25°C). Los resultados indicados en la tabla siguiente detallan las inferencias de los panelistas.

Panelista	Blanco incubado con leche UHT	Producto lácteo fermentado
1	Ligeramente lechoso	malta-chocolate-miel-mantequilla-nata
2	Lechoso, leche UHT	chocolate-miel-nata
3	Ligeramente ácido	malta-miel-mantequilla-nata
4	Lechoso, ligero	malta-chocolate-miel-mantequilla-nata
5	Lechoso	malta-chocolate-miel-mantequilla
6	Lechoso, grasiento	malta-miel-mantequilla-nata
7	Leche en polvo, dulce	malta-chocolate-miel-mantequilla-nata

20 Los resultados de la valoración sensorial del producto lácteo fermentado demuestran que tiene un sabor y un aroma muy parecido a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata.

25 El sabor y el aroma a malta pueden atribuirse a la presencia de 2-metilpropanal, 2/3-metilbutanal, fenilacetaldehído y 2/3-metilbutanol, que fueron determinados por las mediciones con nariz electrónica. El sabor y el aroma mantecoso/cremoso es debido a la presencia de diacetilo, acetoina y 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona. La combinación de las cepas bacterianas es responsable del sabor y aroma global del producto lácteo fermentado.

Una vez expuesta detalladamente la presente invención, debe tenerse en cuenta que esta descripción concreta no pretende limitar el alcance de la presente invención.

30 Lo que se desea proteger por patente de invención está establecido en las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *diacetylactis*, depositada como CNCM n° 1-4404, con la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, depositada como CNCM n° 1-1962, o una combinación de la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *diacetylactis*, depositada como CNCM n° 1-4405, con la bacteria de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, depositada como CNCM n° 1-1962.
2. Uso de la combinación según la reivindicación 1 para impartir al menos un sabor y aroma de malta-chocolate-miel-mantequilla-nata a una fuente láctea.
3. Método para elaborar un producto lácteo fermentado con al menos un sabor y un aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata, que consiste en:
 - Proporcionar una fuente láctea,
 - Formar una fuente láctea suplementada con aminoácidos y añadirle opcionalmente citrato,
 - Agregar una bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *diacetylactis*, depositada como CNCM n° 1-4404, o una bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *diacetylactis*, depositada como CNCM n° 1-4405,
 - Agregar una bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, depositada como CNCM n° 1-1962 para formar una mezcla, y
 - Fermentar la mezcla para elaborar el producto lácteo fermentado.
4. Método según la reivindicación 3, en el cual la formación de la fuente láctea suplementada con aminoácidos incluye la adición de al menos un aminoácido, la adición de una proteasa o la adición de una peptidasa a la fuente láctea.
5. Método según la reivindicación 4, en el cual el aminoácido añadido como mínimo se elige entre L-fenilalanina, L-leucina, L-isoleucina y L-valina.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que además incluye la concentración del producto lácteo fermentado y la formación de un concentrado de producto lácteo fermentado.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, que además incluye el secado del producto lácteo fermentado o del concentrado de producto lácteo fermentado y su transformación en polvo.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el cual la fuente láctea se elige al menos entre leche entera, leche descremada, leche semidescremada, leche fresca, leche recombinada, nata, leche cortada, suero de leche y leche que contiene grasa vegetal.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, que además comprende la adición de al menos un enzima lipasa y de un enzima lactasa a la fuente láctea.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, que además comprende la adición de un cofactor de fermentación a la fuente láctea.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en el cual la proporción total de citrato y de aminoácido es del 0,01 al 5% en peso respecto a la fuente láctea.
12. Producto lácteo fermentado con al menos un sabor y un aroma a malta-chocolate-miel-mantequilla-nata, que se puede obtener por el método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11.
13. Producto de consumo para un mamífero, que incluye el producto lácteo fermentado de la reivindicación 12.
14. Producto alimenticio que contiene una bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *diacetylactis*, depositada como CNCM n° 1-4404, y una bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, depositada como CNCM n° 1-1962, o producto alimenticio que contiene una bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *diacetylactis*, depositada como CNCM n° 1-4405, y una bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, depositada como CNCM n° 1-1962, de manera el producto alimenticio comprende al menos diacetilo, acetoina o 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona y al menos 2-metilpropanal, 2/3-metilbutanal, fenilacetaldehído o 2/3-metilbutanol.