



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 290 290**

51 Int. Cl.:  
**A23C 19/05** (2006.01)  
**A23C 19/08** (2006.01)  
**A23C 19/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02725943 .1**  
86 Fecha de presentación : **07.05.2002**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1416803**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2004**

54 Título: **Procedimiento de fabricación de quesos y otros productos lácteos y de productos derivados.**

30 Prioridad: **07.05.2001 EP 01110166**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.02.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2008**

73 Titular/es: **Kraft Foods R&D, Inc.**  
**Bayerwaldstrasse 8**  
**81737 München, DE**

72 Inventor/es: **Koka, Rathna;**  
**Mehnert, David, W.;**  
**Fritsch, Rudolf, J.;**  
**Steffan, Wolfram;**  
**Habermeier, Peter;**  
**Bradbury, Allan, G., W.;**  
**Wolfschoon-Pombo, Alan;**  
**Rose, Mehran;**  
**Lynglev, Gitte Budolfson y**  
**Heldt-Hansen, Hans Peter**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 290 290 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).

# ES 2 290 290 T3

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fabricación de quesos y otros productos lácteos y de productos derivados.

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a un procedimiento para la fabricación de quesos y otros productos lácteos, y más particularmente, a un procedimiento para la fabricación de quesos y otros productos lácteos utilizando ácido lactobiónico y los productos resultantes de los mismos.

### 10 **Antecedentes de la invención**

Generalmente, los quesos se preparan por adición a la leche de un microorganismo que es capaz de metabolizar la lactosa para producir ácido láctico y desarrollar acidez. Usualmente, la leche se prepara añadiendo una enzima que aglomera o coagula la leche, tal como cuajo, o bien mediante el desarrollo de la acidez hasta el punto isoeléctrico de la caseína. La coagulación enzimática de la leche también requiere de un medio ácido. La leche se inocula con un cultivo bacteriano o un cultivo iniciador que produce suficiente ácido láctico para que el cuajo trabaje. El coágulo o grumo que se origina incorpora generalmente caseína transformada, grasas que incluyen grasa de mantequilla natural, y aromas que se originan (especialmente cuando se usa un cultivo de bacterias). La leche coagulada se corta, se separa el lactosuero y a continuación se recupera a partir del grumo resultante. El grumo se puede presionar para proporcionar un bloque de queso; la curación puede tener lugar a lo largo de un periodo de tiempo bajo condiciones controladas. Por ejemplo, un queso duro tal como el queso cheddar se puede curar durante, aproximadamente, desde 10 días hasta un año o más, dependiendo del aroma de queso deseado y de la dureza del mismo.

También resulta conocido el obtener un queso que tenga algunas de las características de queso natural mediante la división fina de uno o más quesos naturales, y calefacción del queso con un agente emulsionante. El nombre dado al producto resultante depende de los ingredientes usados y de su composición y, en algunos casos, se determina mediante Regulaciones promulgadas por la U.S. Food and Drug Administration, conocidas como Standares de Identidad. Por ejemplo, el término “queso elaborado pasteurizado” se refiere a un producto que comprende una mezcla de quesos a la que se añade un agente emulsionante y posiblemente ácidos y, a continuación, la mezcla se trabaja y se calienta hasta obtener una masa homogénea y plástica. Bajo los Standares de Identidad actuales, el nivel de humedad del queso elaborado no excede en general de aproximadamente el 44 por ciento y tiene un nivel mínimo de grasa de aproximadamente el 40 por ciento respecto al peso seco.

También resulta conocido que el queso natural se puede fabricar usando leche concentrada que se ha preparado mediante un procesamiento con membrana, tal como ultrafiltración, en el que la leche se recicla a través de una membrana semi permeable a una presión elevada de manera que el agua y los componentes de bajo peso molecular pasan a través de la membrana, mientras que algunas proteínas y grasas quedan retenidas por dicha membrana. A la leche concentrada obtenida se le añaden cultivos para preparar quesos, y a continuación se fermenta, generalmente en presencia de una enzima coagulante de la leche, tal como cuajo, para proporcionar un coágulo. El coágulo resultante se corta o se rompe para dar lugar a sinéresis que origina la separación del lactosuero. El lactosuero se drena y el grumo se procesa. El tipo de cultivos de queso usados y el procedimiento varían con el tipo de queso deseado. A continuación, el queso se puede salar, colocar en moldes y prensar para permitir un drenaje adicional del lactosuero. El queso se deja madurar a continuación hasta el punto deseado.

La crema de queso es un queso coagulado con ácido, sin curar, preparado a partir de componentes lácteos que incluyen la nata. La crema de queso, que normalmente se almacena bajo condiciones refrigeradas, presenta una consistencia suave y similar a la mantequilla, con un perfil de aroma lácteo delicado, que no retiene aromas externos. Generalmente, la textura y el cuerpo de la crema de queso a las temperaturas de refrigeración es tal que permite que la crema de queso se pueda cortar en rodajas y ser extendido. En la preparación de crema de queso, de manera típica se mezclan nata dulce y sólidos secos derivados de la leche o leche con una mezcla seca de goma vegetal y sal en proporciones preseleccionadas para formar una mezcla de crema de queso. La mezcla de crema de leche normalmente tiene un contenido de grasa de mantequilla desde 10 hasta 14 por ciento (y en algunos procedimientos de fabricación, contiene tanto como el 20 por ciento), de manera que, después de la elaboración, el producto de crema de queso finalizado tiene un contenido en grasa de mantequilla de por lo menos un 33 por ciento del producto, y un contenido total en sólidos de leche de por lo menos 45 por ciento que corresponde a la presencia de no más del 55 por ciento de humedad en el producto de crema de leche.

La mezcla de crema de queso se inocula con un cultivo de ácido láctico. Para ayudar a la coagulación de la mezcla se puede usar cuajo. La mezcla se cultiva manteniéndola a la temperatura de inoculación hasta que ha madurado y se ha formado un coágulo. La acidez del coágulo puede estar típicamente en el rango desde 0,6 hasta 0,9 (calculado como porcentaje equivalente de ácido láctico), y el pH del coágulo cultivado puede estar de manera típica en el margen desde aproximadamente 4,2 hasta 5. El coágulo resultante se expone a una temperatura de 180°F durante un corto periodo de tiempo y, a continuación, se centrifuga para separar el lactosuero del grumo y, después, el producto de crema de queso se enfría y se empaqueta. La crema de queso generalmente contiene de 2 a 3 por ciento de lactosa.

La lactosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranososa), comúnmente llamada azúcar de la leche, es el carbohidrato principal de la misma. La lactosa es un azúcar de bajo valor en los sistemas de alimentación debido a la intolerancia

a la lactosa y también debido a su contribución a las reacciones de oscurecimiento y cristalización. El uso de sustitutos de la leche o un contenido lácteo reducido en las mezclas de quesos para reducir el contenido en lactosa en el queso preparado puede proporcionar productos no aceptables desde el punto de vista de las regulaciones de Standards de Identidad, de la procesabilidad, y/o las propiedades físicas y las características de aroma del producto acabado.

5 El ácido lactobiónico, ácido (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucónico; CAS Reg. N° 96-82-2) es un compuesto cristalino blanco soluble en agua y se puede sintetizar a partir de lactosa por oxidación del grupo aldehído libre de la misma, y se puede llevar a cabo de manera catalítica, químicamente, electrolíticamente o enzimáticamente. Harju, Bulletin of the IDF 289, ch 6, pag. 27-30, 1993; Sartory *et al.*, Biotechnology Letters, 19(12), 1205-08, 1997. El uso del ácido lactobiónico o sus sales como aditivos en los productos para alimentación, ya ha sido sugerido previamente en algunas aplicaciones específicas. Se han descrito quelatos de calcio o hierro del ácido lactobiónico en suplementos minerales para alimentación. Riviera *et al.*, Amer. J. Clin. Nutr.; 36(6), 1162-69, 1982. La patente US n° 5851578 describe una bebida clara que tiene fibra que no forma gel, y sales de calcio solubles en agua, con o sin vitaminas solubles en agua, con o sin suplementos de sales minerales adicionales y tamponada con ácidos para alimentación. Los agentes tamponantes de ácidos para alimentación incluyen los ácidos cítrico, láctico, maléico, adípico, succínico, acético, acético glucónico, lactobiónico, ascórbico, pirúvico, y fosfórico, así como combinaciones de los mismos. El lactobionato de calcio, una sal del ácido lactobiónico, ha sido aprobado para uso como agente de fijación en mezclas de bizcocho seco. 21 C.F.R. § 172.720 (1999). También, se ha propuesto el posible uso del ácido lactobiónico como acidulante general en alimentación, aunque sin exploración o ilustración. Timmermans, Lactosuero: Actas de la 2ª Conf. Intern. Sobre Lactosuero, Federación Intern. de Lácteos, Chicago, Octubre 1997, pag. 233, 249. Este artículo describe en general al ácido lactobiónico como útil para ser usado como un soporte para antibióticos, como conservante para órganos para trasplantes, como suplemento mineral, para promoción del crecimiento de bifidobacterias, o como co-constructor en detergentes en su forma de sal de lactobionato de K.

25 Sería deseable fabricar quesos con un contenido en lactosa reducido y que al mismo tiempo conservasen sus características de aroma, textura y apariencia comparables con los tipos de queso convencionales. También sería deseable reducir los requerimientos del cultivo iniciador y el tiempo asociado con los mismos en la producción de queso, y al mismo tiempo mantener propiedades organolépticas aceptables. Asimismo, sería deseable aumentar los niveles de sólidos en los quesos fabricados a la vez que se usan cantidades reducidas de cultivos iniciadores en comparación con la práctica convencional. También sería deseable ser capaces de usar concentrados de lactosuero que contengan más lactosa en las formulaciones de crema de queso sin la necesidad de aumentar el uso de los cultivos. La presente invención proporciona dichos procedimientos y productos en los que se proporciona ácido lactobiónico en una mezcla de queso.

### 35 **Resumen de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de quesos y otros productos lácteos, y los productos resultantes de los mismos, en los que se añade el ácido lactobiónico, o se genera *in situ*, en combinación con un componente lácteo en el curso del procedimiento. Los quesos y otros productos lácteos preparados según esta invención presentan propiedades organolépticas plenamente aceptables, a la vez que permiten reducciones en el tiempo de la elaboración, y/o en los requerimientos de otros ingredientes, tales como cultivos de inicio y/o cuajo. De este modo se proporciona flexibilidad en el procedimiento, así como mayores rendimientos de producción y posibles ahorros en los costes de los ingredientes. Para los propósitos de esta invención, el término "ácido lactobiónico" se quiere que incluya el ácido lactobiónico así como las sales comestibles del mismo (p.e., las sales de los metales alcalinos y alcalino térreos, las sales de amonio, y similares).

50 Se ha encontrado de manera sorprendente que el ácido lactobiónico se puede usar para la coagulación ácida directa de los quesos, tales como las cremas de queso, sin la necesidad de usar cultivos y/o cuajo. El ácido lactobiónico también tiene un efecto de disminución del pH en las mezclas de quesos, ya que acidifica los componentes lácteos usados en la producción de quesos, tales como leche, nata dulce y lactosuero. Además, el ácido lactobiónico tiene un sabor ácido dulce que se ha encontrado que es compatible con los productos de queso. Los productos de queso resultantes preparados con el ácido lactobiónico presentan unas propiedades de aroma, apariencia, textura y gusto en boca plenamente aceptables.

55 En otra realización, el ácido lactobiónico se usa para reducir, y opcionalmente incluso eliminar, la cantidad del cultivo de inicio usado en la fabricación del queso, tal como la fabricación de queso duro o ultrafiltrado (UF). Un cultivo de inicio, tal como se usa en este contexto, significa generalmente una bacteria de ácido láctico. En el caso de la preparación de un queso duro, tal como la fabricación de queso cheddar, el ácido lactobiónico introducido en la mezcla de queso se usa para reemplazar parcialmente y reducir la cantidad de cultivo de inicio que, por otro lado, se usaría normalmente, lo que ayuda efectivamente a la acidificación de la mezcla de queso. Este procedimiento proporciona un producto de queso que incluye una mezcla de ácido láctico y de ácido lactobiónico, lo que mejora el rendimiento. El ácido lactobiónico también se puede usar como un ingrediente en el procedimiento de producción del queso, proporcionando productos aceptables.

65 El ácido lactobiónico se puede añadir a una mezcla de quesos, en un procedimiento según una cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, para proporcionar estos efectos en su forma de ácido libre, o en una forma de sal comestible, o en una forma de pH neutralizado. Para los propósitos de este documento, una forma neutralizada significa que el ácido lactobiónico se neutraliza, previamente a su adición a la mezcla de quesos, con un hidróxido de

## ES 2 290 290 T3

un metal alcalino tal como hidróxido sódico o hidróxido potásico, o con un hidróxido de un metal alcalino térreo tal como hidróxido cálcico, o con un carbonato de un metal alcalino térreo tal como carbonato cálcico.

5 En otra realización ventajosa de la invención, que se puede aplicar a todas las diversas realizaciones de fabricación de queso y otras fabricaciones de productos lácteos descritos en este documento que emplean uno o más componentes lácteos que contienen lactosa en la mezcla de quesos, el ácido lactobiónico se puede introducir en la mezcla de quesos a través de su generación *in situ* mediante acción catalítica de una enzima carbohidrato oxidasa añadida en la lactosa presente en el (los) componente(s) de la mezcla de quesos. Las enzimas carbohidrato oxidasa adecuadas incluyen, por ejemplo, la lactosa oxidasa, glucosa oxidasa, hexosa oxidasa y similares, así como mezclas de las mismas. En  
10 general, se prefiere la lactosa oxidasa.

La generación *in situ* de ácido lactobiónico en una mezcla de quesos durante la fabricación del queso da lugar a una multitud de efectos beneficiosos. En primer lugar, reduce de manera efectiva el contenido en lactosa del (los) componente(s) lácteo original de las mezclas de queso, permitiendo la obtención de productos con un contenido en lactosa reducido. Por tanto, entre otras cosas, este aspecto de la invención se puede usar para la preparación de productos de queso con un contenido en lactosa reducido. Alternativamente, permite el uso de ingredientes relativamente ricos en lactosa en la mezcla de quesos original, debido a la conversión a ácido lactobiónico de una parte del contenido en lactosa, tal como ocurre durante el curso de la fabricación del queso después de que el ácido lactobiónico se haya generado. Además, el ácido lactobiónico tiene una masa molecular que es, aproximadamente, cuatro veces mayor que la del ácido láctico. En consecuencia, el ácido lactobiónico retenido en el producto de queso, que se ha derivado de la conversión catalítica de la lactosa, tiene una masa mucho mayor, en una base equimolar, que la lactosa convertida en ácido láctico. Este efecto mejora la apariencia, la textura y el gusto en boca del producto de queso. De esta manera, el ácido lactobiónico puede actuar como un agente de volumen. Para los propósitos de este documento, el término “agente de volumen” significa un agente que imita los efectos de la grasa y/o la proteína natural en composiciones de queso en lo que se refiere a sus efectos sobre las cualidades de la apariencia (p.e., firmeza, opacidad) y textura (p.e.,  
20 lubricidad, melosidad, gusto en boca) del queso.

En general, la proporción de ácido lactobiónico añadido a la mezcla de queso, o generado *in situ* a través de la conversión enzimática de la lactosa al ser catalizada por la adición de la carbohidrato oxidasa, para proporcionar uno o más de estos efectos ventajosos, va desde 0,1 hasta 10 por ciento, en particular desde 2 hasta 6 por ciento, y más particularmente desde 3 hasta 5 por ciento, en base al peso total de la mezcla de quesos antes de la separación del grumo y el lactosuero.  
30

Los productos del suero de los quesos preparados usando el ácido lactobiónico según esta invención, y que por tanto retienen una parte del ingrediente ácido lactobiónico, también se pueden reciclar, en lugar de ser descartados completamente como desecho, para su uso como ingredientes de partida en lotes o series separados de producción de quesos para fabricar quesos o cremas de queso elaborado. Alternativamente, el producto de lactosuero de un procedimiento de fabricación de un queso natural puede tener el ácido lactobiónico o la lactosa oxidasa añadidos al mismo, y el producto de lactosuero así tratado se puede usar como un ingrediente de partida en la producción separada de queso, crema de queso u otros productos lácteos (incluyendo, por ejemplo, bebidas de lactosuero, barras o polvo de bombón que contiene lactosuero, y similares).  
40

La invención resulta remarcable en su versatilidad. Los estudios experimentales, tal como se describe en este documento más adelante, demuestran su aplicabilidad en la fabricación de tipos muy variados de quesos incluyendo la crema de queso, quesos duros, y los quesos elaborados pasteurizados. La invención también ha demostrado que tiene éxito en la fabricación de los denominados quesos UF preparados a partir de leche concentrada ultrafiltrada (UF). La invención también ha demostrado que tiene éxito en la fabricación de otros productos lácteos tales como, por ejemplo, nata fermentada, yogur, leche, leche con cantidad reducida de lactosa, y similares. Los quesos y otros productos lácteos preparados con, y/o que contienen, ácido lactobiónico según esta invención tienen sabores y texturas similares a los quesos convencionales y otros productos lácteos del tipo correspondiente.  
50

Los productos de queso que contienen ácido lactobiónico también presentan una mejor estabilidad del producto debido al efecto conservador del ácido lactobiónico. Como una ventaja añadida, las propiedades de quelación del ácido lactobiónico se pueden utilizar como un vehículo para la administración de un derivado de leche en suplementos de calcio en productos para la alimentación.  
55

### Breve descripción de los dibujos

Otros hechos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención, con referencia a los dibujos, en los que:  
60

Figura 1, es un diagrama de flujo de las etapas usadas en una realización de la invención para la producción de crema de queso;

65 Figura 2, es un diagrama de flujo de las etapas usadas en otra realización de la invención para la producción de crema de queso;

## ES 2 290 290 T3

Figura 3, es un diagrama de flujo de las etapas usadas en una realización de la invención para la producción de queso cheddar;

Figura 4, es un diagrama de flujo de las etapas usadas en otra realización de la invención para la producción de queso cheddar;

Figura 5, es un diagrama de flujo de las etapas usadas en una realización de la invención para la producción de queso UF;

Figura 6, contiene diagramas de flujo de las etapas usadas en realizaciones de la invención para la producción de queso elaborado en el que se añade ácido lactobiónico de varias fuentes (6A, 6B y 6C) a una mezcla de quesos elaborados;

Figura 7, es un esquema de flujo de reacción que muestra un mecanismo de reacción teórico para la oxidación enzimática de la lactosa usando lactosa oxidasa;

Figura 8, es una gráfica que muestra las curvas de ajuste posterior de la nata (viscosidad como una función del tiempo) para los quesos elaborados (invención y control) tal como se prepara en el Ejemplo 7, y

Figura 9, es una gráfica que muestra las curvas de ajuste posterior de la nata (viscosidad como una función del tiempo) para los quesos elaborados (invención y control) tal como se prepara en el Ejemplo 8.

### Descripción detallada de la invención

En referencia a la Figura 1, se ilustra un esquema del procedimiento general según una realización de la invención en el que el ácido lactobiónico se usa para la coagulación ácida directa de una crema de queso, sin adición de cultivo o de cuajo. La crema de queso preparada es un queso suave, blando, coagulado con ácido y no curado, preparado a partir de productos lácteos, que incluyen nata, tales como mezclas de nata y concentrado de proteínas de lactosuero. Tal como se indica en la etapa 101, la consistencia de la composición de la crema de queso, que permite su extensión a la vez que retiene la firmeza, se modula por adición de una goma vegetal tal como goma de haba de algarrobo. Se añade sal y un conservante. Cualquier señal de falta de cultivo en el queso acidificado directamente se puede superar opcionalmente usando sistemas de aromatización para crear el sabor de queso deseado. El fluido lácteo y el concentrado de proteína de lactosuero se añaden en proporciones deseables para proporcionar una mezcla de queso que se pueda procesar según la invención para proporcionar una crema de queso que tenga un contenido de grasa de leche de por lo menos un 33 por ciento, y un contenido en humedad que no exceda del 55 por ciento en base al peso del producto de la crema de queso.

El ácido lactobiónico se añade en una cantidad efectiva para reducir el pH hasta el punto isoeléctrico (es decir, aproximadamente 4,52) de la caseína en los ingredientes lácteos. La proporción de ácido lactobiónico añadido a la mezcla de la crema de queso generalmente va desde 0,1 hasta 10 por ciento, en particular del 2 al 6 por ciento, y más particularmente del 3 al 5 por ciento, en base al peso total de la mezcla de queso antes de la separación del grumo y el lactosuero.

El ácido lactobiónico se puede añadir a la mezcla de queso directamente como un ingrediente externo en su forma ácida libre o, alternativamente, en forma de sal o en su forma ácida neutralizada. La forma de ácido libre reduce el pH de la mezcla de queso. La composición de la mezcla de queso se puede ajustar para compensar cualquier reducción del pH que sea mayor que el deseado para una coagulación y unas propiedades físicas óptimas en el producto. La forma neutralizada del ácido lactobiónico no impacta en el pH del producto. En forma de sal, el ácido lactobiónico generalmente se proporciona en forma de sal alcalina o sal de metal alcalino térreo, tal como sal sódica, sal potásica o sal cálcica del mismo. Por descontado, también se pueden usar, si se desea, otras sales del ácido lactobiónico, siempre que sean aceptables para su uso en productos alimenticios. La forma neutralizada del ácido lactobiónico se puede preparar por neutralización del ácido lactobiónico disuelto en una solución acuosa, mediante adición al mismo de un agente alcalino, tal como hidróxido sódico o potásico, suficiente para ajustar el pH de la solución hasta aproximadamente 7.

Tal como se muestra en la Figura 1, diversos quesos se mezclan íntimamente y coagulan debido a la acidez del ácido lactobiónico (etapa 103), o de otro ácido añadido, en el caso de usar ácido lactobiónico neutralizado. A continuación, se calienta la mezcla a 180°F (82,2°C) durante 5 minutos para un tratamiento de pasteurización de corta duración (etapa 105), y después se homogeneiza (etapa 107). En la etapa 109 se puede separar los grumos y el lactosuero mediante cualquier técnica convencional, incluyendo, por ejemplo, la centrifugación, filtración, tratamiento mecánico y similares. El grumo se puede empaquetar frío o caliente, y después se almacena en frío. El producto de crema de queso (111) y el lactosuero (113) contiene ácido lactobiónico. El lactosuero que contiene el ácido lactobiónico se puede usar de nuevo como un ingrediente inicial en las siguientes mezclas de crema de queso. Ello reduce la cantidad de desechos y hace que la operación del procedimiento sea más eficiente. La introducción del ácido lactobiónico (ya sea como ácido libre, en forma de sal o neutralizado) no origina ningún atributo organoléptico indeseable, tal como aroma, en el producto de crema de queso, mientras que la textura, apariencia y gusto en boca es comparable a la crema de queso fabricada de manera convencional.

## ES 2 290 290 T3

En referencia ahora a la Figura 2, la crema de queso se prepara según otro aspecto de la invención en el que el ácido lactobiónico se genera *in situ* en la mezcla de crema de queso mediante la conversión de la lactosa al ser catalizada por adición de la lactosa oxidasa. En este esquema del procedimiento se prepara la mezcla de la crema de queso (etapa 201) y a continuación se pasteuriza (etapa 203) y después se homogeneiza (etapa 205). En este punto (etapa 207), se añade una enzima oxidasa que cataliza la oxidación *in situ* de la lactosa presente en los líquidos lácteos hasta el ácido lactobiónico. El ácido lactobiónico generado tiene un efecto reductor del pH en la mezcla de queso. Las oxidasas adecuadas en este respecto incluyen, por ejemplo, la lactosa oxidasa, celobiosa deshidrogenasa, glucosa-fructosa oxidoreductasa, hexosa oxidasa y cualesquiera otras oxidasas que tengan la funcionalidad anteriormente mencionada.

Una enzima particularmente adecuada para la oxidación de la lactosa ha sido desarrollada por Novozymes A/S y se describe en la patente WO 9931990. Tal como se ilustra en la Figura 7, la lactosa oxidasa se puede introducir y usar en forma de una flavo-enzima. Esta flavo-enzima de Novozymes A/S contiene dinucleótido de adenina flavina (FAD) y, por tanto, no requiere un acceptor de electrones externo o una segunda enzima para regenerar el cofactor. Esta carbohidrato oxidasa se produce en un microorganismo modificado genéticamente. El FAD (dinucleótido de adenina flavina) se usa como un cofactor de transferencia de electrones con la enzima carbohidrato oxidasa. La enzima incluye actividad entre un pH de 5 a 9, y a temperaturas que van hasta, aproximadamente, 190°F (88°C). Los sustratos preferidos son di-, tri- y tetrasacáridos. Entre los disacáridos, la lactosa es el sustrato más adecuado. La oxidación en la posición C1 de la parte glucosa de la lactosa da lugar a la formación de ácido lactobiónico y peróxido de hidrógeno en una única etapa de reacción. En general, nos referiremos a esta enzima como "lactosa oxidasa". El valor de las unidades de actividad es 146 U/ml, medido como mMoles de glucosa oxidada por minuto a pH 6 y 77°F (25°C). Tal como se indica en el paso de reacción ilustrado esquemáticamente en la Figura 7, la FAD se reduce a una forma intermedia y a continuación se deoxida al completarse la conversión de la lactosa a ácido lactobiónico. El peróxido de hidrógeno es un subproducto de la reacción.

La celobiosa deshidrogenasa es también una enzima útil para la conversión de la lactosa a ácido lactobiónico. Canevascini *et al.*, Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 175, 125-129, (1982). Sin embargo, esta enzima es compleja y requiere el uso de un cofactor relativamente caro (p.e., quinonas, citocromo C, Fe(III) y similares): También requiere inmovilización. Además, se requiere una segunda enzima, laccasa, para regenerar el cofactor usado con la celobiosa deshidrogenasa. El uso de glucosa-fructosa oxidoreductasa para oxidar la lactosa da lugar a dos productos, sorbitol y ácido lactobiónico, y es necesario un procedimiento adicional de separación para recuperar el ácido lactobiónico. Nidetzky *et al.*, Biotechnology and Bioengineering, vol. 53, (1997). No obstante, la glucosa-fructosa oxidoreductasa es también una enzima adecuada para la práctica de esta realización de la invención. Alternativamente, también se pueden usar sistemas de enzimas menos eficientes. Por ejemplo, se puede usar la lactasa para hidrolizar en primer lugar la lactosa a glucosa y galactosa seguido de la oxidación de la glucosa y la galactosa usando glucosa oxidasa y galactosa deshidrogenasa.

La cantidad de la enzima oxidasa añadida es una cantidad efectiva para reducir el pH o para ayudar a reducir el pH de la mezcla de queso de manera que coagule. Preferiblemente, la cantidad de oxidasa añadida es suficiente para generar un contenido de ácido lactobiónico en la mezcla de queso desde 0,1 hasta 10 por ciento, en particular desde 2 hasta 6 por ciento y más preferiblemente, desde 3 hasta 5 por ciento, en base al peso total de la mezcla de queso antes de la separación del grumo y el lactosuero.

También se puede añadir un cultivo de ácido láctico en la etapa 207. Puesto que el cultivo de ácido láctico también tiene el efecto de convertir la lactosa en ácido láctico y reducir el pH de la mezcla de queso, la cantidad de lactosa oxidasa añadida se puede ajustar a la baja hasta una cantidad relativamente pequeña para acomodar cualquier adición de cultivo con esta perspectiva.

Todavía en referencia a la Figura 2, en la etapa 209, la mezcla de queso se incuba a continuación a 72°F (22,2°C) durante 12 a 20 horas. Este periodo de incubación, o fermentación, se deja que continúe hasta que el pH de la mezcla de queso se encuentre entre 4,5 y 4,6. A continuación, se calienta a 180°F para inactivar cualquier cultivo añadido (etapa 211). Después de la homogeneización (etapa 213), se separa el grumo de la crema de queso (217) del lactosuero (219).

En estudios experimentales, tales como los descritos más adelante, la adición de carbohidrato oxidasa permite el uso de mayores cantidades de lactosa o bien aumenta la cantidad de sólidos derivados de la lactosa en los ingredientes lácteos líquidos que se convierten en ácido lactobiónico, en comparación con los controles preparados con los cultivos pero no con la oxidasa. El grado de conversión de la lactosa que se consigue en los ingredientes líquidos lácteos en esta realización puede alcanzar hasta aproximadamente el 85 por ciento o más. Esto permite que se puedan preparar quesos que tengan un contenido en lactosa altamente reducido o, alternativamente, se puede usar en la mezcla de quesos unos ingredientes lácteos con un mayor contenido en lactosa.

En referencia a la Figura 3, se ilustra otra realización de la invención en la que el ácido lactobiónico se usa como ingrediente activo en una mezcla de queso cheddar. Además, en esta ilustración, se omite completamente las bacterias de ácido láctico, u otro cultivo, de manera que la mezcla de queso se acidifica directamente usando sólo ácido lactobiónico en la etapa 301. La mezcla de queso se prepara, generalmente, mezclando leche entera, agua, y ácido lactobiónico en las cantidades que se describen en relación a la discusión de la Figura 1. A continuación, se añade cuajo (p.e., quimosina) y la mezcla se incuba a 88°F (31,1°C) durante 30 minutos. El coágulo se corta con un cuchillo para permitir la sinéresis (etapa 307). La temperatura se aumenta hasta 102°F (38,9°C) con agitación y se

## ES 2 290 290 T3

mantiene durante 60 minutos. En este punto, el pH del coágulo puede ser de aproximadamente 5.8. Se elimina el lactosuero (314) del grumo (etapa 313), seguido de adición de sal (315), aplicación de presión (317) y empaquetado del grumo de queso (319). El lactosuero del subproducto (314) contiene ácido lactobiónico y se puede usar de nuevo como un ingrediente de partida en la producción de queso.

5 En cuanto al cuajo de la etapa (303), el procedimiento más común de coagulación enzimática es la proteólisis mediante aspartato proteinasas, que son enzimas que hidrolizan las proteínas. La fuente principal de estas enzimas es el cuajo, que se puede obtener de fuentes animales, de plantas o de hongos. El ingrediente activo del cuajo es la fracción de la enzima llamada renina. El cuajo más importante es la quimosina. La principal fuente tradicional del  
10 cuajo ha sido el cuajar de terneros jóvenes pero, actualmente, la quimosina se produce a partir de microorganismos modificados genéticamente.

El producto de queso cheddar hecho con, y que contiene, ácido lactobiónico presenta propiedades organolépticas y de textura satisfactorias sin ningún aroma extraño, y es comparable al queso cheddar convencional en términos de  
15 estas características. Esta realización, aunque se ilustra en relación al queso cheddar, también se puede aplicar a la producción de otros quesos duros.

En referencia a la Figura 4, esta realización es una variación de la realización de la Figura 3 en cuanto que se usa la lactosa oxidasa con el fin de reemplazar parcialmente los cultivos para ayudar a la acidificación del queso cheddar. En  
20 la etapa 401, la mezcla de queso cheddar se prepara con sólo el 10 por ciento de la cantidad convencional de cultivo (es decir, aproximadamente 0,001 por ciento de cultivo). A la mezcla de queso también se le añade una enzima oxidasa tal como la lactosa oxidasa. La función y cantidad de la lactosa oxidasa añadida aquí es similar a la que se describe anteriormente en relación a la realización descrita en conexión con la Figura 2. Después, se llevan a cabo las etapas  
25 403-419 que son similares a las etapas 303-319 descritas en relación a la Figura 3.

El producto de queso cheddar presenta propiedades organolépticas y de textura satisfactorias sin aromas extraños y es comparable al queso cheddar convencional en términos de estas características. La oxidasa convierte una parte importante del contenido de lactosa original del ingrediente lácteo (es decir, leche) en ácido lactobiónico, el cual  
30 también ayuda a acidificar la mezcla. En general, del 10 al 50 por ciento de la lactosa se puede convertir en ácido lactobiónico, más preferiblemente se convierte del 20 al 40 por ciento.

En referencia ahora a la Figura 5, la generación *in situ* del ácido lactobiónico por la enzima oxidasa para la acidificación directa del queso filtrado por membrana en lugar de cultivo se ilustra según otra realización de la invención. La mezcla de queso UF se prepara incluyendo una oxidasa (etapa 501). En este aspecto, las oxidasas útiles incluyen  
35 aquellas tal como las descritas anteriormente relativas a la discusión de la Figura 2. La leche entera se ultrafiltra o se microfiltra usando aparatos convencionales para este fin (etapa 503). La leche se pasa a través de una membrana semipermeable a una presión elevada, de manera que el agua y los componentes de bajo peso molecular pasan a través de la membrana, mientras que algunas proteínas y grasas quedan retenidas por la misma. La membrana semipermeable, por ejemplo, se puede seleccionar para restringir el paso de moléculas que tengan un peso molecular mayor de 10000.  
40 En la etapa 505 se añade nata dulce y cuajo, seguido de coagulación (etapa 507) y evaporación (etapa 509) para formar el producto 511 que se envasa a continuación.

La lactosa oxidasa se añade en una cantidad efectiva para oxidar por lo menos una parte de la lactosa a ácido lactobiónico, y para reducir el pH de la mezcla de queso de manera suficiente para que el cuajo añadido separadamente  
45 pueda inducir la coagulación. Generalmente, la cantidad de oxidasa añadida es suficiente para oxidar por lo menos el 10 por ciento de la lactosa presente, más preferiblemente del 10 al 95 por ciento de la lactosa presente, e incluso más preferiblemente del 20 al 40 por ciento de la lactosa presente.

El uso de dicha oxidasa para generar ácido lactobiónico *in situ* usando la lactosa presente en la mezcla ofrece la  
50 ventaja añadida de reducir de manera significativa los niveles de lactosa en el queso fabricado o en otros productos lácteos en comparación con los niveles presentes en el caso de ausencia de adición de la oxidasa, con todas las otras cosas iguales. De nuevo, esto permite alcanzar ya sea niveles de lactosa menores en el queso u otros productos lácteos o bien la capacidad de usar ingredientes lácteos en la mezcla de queso que tengan un mayor contenido en lactosa que los ingredientes que de otro modo se usarían normalmente. El ácido lactobiónico también sirve para desplazar y  
55 disminuir los requerimientos del cultivo iniciador, ya sea parcialmente o plenamente, que por otro lado se aplica a la fabricación de queso, a la vez que se mantiene una textura adecuada y sin la aparición de aromas extraños. En el caso de que la adición del ácido lactobiónico sólo substituya una parte del cultivo, la coagulación de la mezcla de queso se puede conseguir a través de solamente la coagulación ácida usando ácido láctico y ácido lactobiónico añadidos en una cantidad combinada. De esta manera, se mejoran los rendimientos ya que se ahorra tiempo al reducir por lo menos los  
60 requerimientos del cultivo. Se puede usar opcionalmente la co-adición de concentrado de aroma a la mezcla de queso, incluyendo el ácido lactobiónico, para compensar de manera adecuada el aroma debido al uso reducido u omitido de cualquier cultivo iniciador así como cualesquiera notas de cultivo deseadas.

En una realización importante de la presente invención, se incorpora ácido lactobiónico al queso elaborado. En  
65 referencia a la Figura 6, se añade ácido lactobiónico en varias formas a una mezcla de queso elaborado que, por otra parte, incluye los ingredientes convencionales tales como emulsionante, sal, conservante, colorante, queso duro finamente dividido, y componentes lácteos tales como concentrados de proteína de lactosuero y lactosuero seco (etapa 601). La mezcla de queso se calienta hasta tener una masa homogénea plástica (etapa 603) y a continuación

## ES 2 290 290 T3

se empaqueta y se enfría (etapa 605). En la Figura 6A, se añade el ácido lactobiónico directamente a la preparación de la mezcla de queso elaborado. En la figura 6B, el ácido lactobiónico se añade usando queso que contiene ácido lactobiónico biogenerado. En la Figura 6C, el ácido lactobiónico se añade usando lactosuero concentrado o permeado de lactosuero que contiene ácido lactobiónico biogenerado. Dicho concentrado de lactosuero se podría obtener, por ejemplo, tratando lactosuero con una lactosa oxidasa apropiada. El producto de queso elaborado preparado con, y que contiene, ácido lactobiónico presenta propiedades organolépticas y de textura satisfactorias sin ningún aroma extraño, y es comparable con cualquier queso elaborado convencional en términos de estas características.

En la fabricación de queso elaborado, a menudo se desea reducir el contenido en grasa y/o materia seca del mismo. Esta necesidad se basa, *inter alia*, en las preferencias del consumidor por los productos con bajas calorías y en el objetivo de ahorrar costes por unidad de queso elaborado. Sin embargo, si se reduce el contenido en grasa o en materia seca en el queso elaborado, a menudo existe un problema que concierne a la textura del producto resultante con un contenido reducido en materia grasa y/o seca. Principalmente, en general dicho producto tendría una textura degradada y un fallo en la evaluación sensorial (es decir, el gusto en boca). Se ha encontrado que la adición de ácido lactobiónico y/o una sal del mismo al procedimiento proporciona un queso elaborado capaz de tener un contenido reducido de grasa y/o materia grasa a la vez que conserva las propiedades de textura y sensoriales características asociadas al mismo. Específicamente, se ha encontrado que el ácido lactobiónico o una sal del mismo potencia las propiedades del queso elaborado tras el ajuste de la nata (es decir, aumenta la viscosidad del queso caliente durante el ajuste de la nata que sigue al tratamiento en caliente de la formulación del queso elaborado). Se ha encontrado que el ácido lactobiónico es efectivo para potenciar el ajuste posterior de la nata en el queso procesado (es decir, aumenta la viscosidad del queso caliente) o para mantenerlo en un contenido reducido de grasa y/o materia seca, pero no retarda el procedimiento de ajuste de la nata. Muchos agentes reafirmantes (p.e., dextrano, goma de haba de falsa acacia y similares) también aumentan la viscosidad del queso caliente durante el ajuste de la nata, pero generalmente originan un retraso de todo el procedimiento de ajuste. Además, las gomas y almidones dan lugar a propiedades sensoriales negativas (p.e., gusto en boca y brillo en superficie) incluso en cantidades de menos del 2 por ciento. Las gomas, por ejemplo, no se pueden usar en absoluto en algunos procedimientos de quesos para untar debido a esta razón.

De acuerdo con ello, la presente invención proporciona un queso elaborado que comprende de 0,1 a 10 por ciento de ácido lactobiónico y/o una sal del mismo. Preferiblemente, la cantidad de ácido lactobiónico o de una sal del mismo en el queso elaborado de la presente invención se encuentra en el rango desde 0,5 hasta 7 por ciento, y más preferiblemente, del 1 al 5 por ciento.

El ácido lactobiónico se puede introducir en la formulación del queso elaborado como tal o en la forma de su sal o mezclas de los mismos. Se puede usar cualquier sal, siempre y cuando sea aceptable para un producto alimentario y por otro lado no deteriore las características del queso elaborado. Ejemplos de sales respectivas son las sales de metales alcalinos y metales alcalino térreos tales como sodio, potasio, calcio y magnesio así como sales amónicas. Entre estas sales, se prefiere las sales de sodio y calcio.

El contenido en materia seca en el queso elaborado preferiblemente va del 25 al 60 por ciento, y más preferiblemente del 30 al 50 por ciento. El contenido en grasa en el queso elaborado según la presente invención preferiblemente va del 5 al 40 por ciento, y más preferiblemente del 7 al 30 por ciento. En este contexto, la expresión "contenido reducido en grasa y/o materia seca" se debe entender en relación a una correspondiente formulación de queso que no contiene ácido lactobiónico. De acuerdo con ello, la persona experta en la técnica apreciará que pueden existir formulaciones de queso elaborado sin ácido lactobiónico y que tienen un menor contenido en grasa y/o materia seca que un queso elaborado según la presente invención. Sin embargo, estas formulaciones convencionales de queso elaborado no tendrán en consecuencia las características del correspondiente queso elaborado de la invención, tales como estabilidad de la textura y mejora de las propiedades sensoriales.

Un queso elaborado de la presente invención, incluyendo uno que tenga un contenido reducido en grasa y/o materia seca, se puede fabricar mezclando los ingredientes de una formulación convencional de queso elaborado con ácido lactobiónico y/o una sal del mismo. Los ingredientes usados convencionalmente en la fabricación de un queso elaborado comprenden queso, mantequilla, grasa de leche anhidra, caseína, leche en polvo descremada, polvo de lactosuero, carbohidratos (tales como almidón, lactosa, ácido láctico y agente enlazante), sales (tales como cloruro sódico) y sales emulsionantes o para fusión (p.e., sales de ácido cítrico y de ácido fosfórico) y agua. Es decir, las formulaciones de queso elaborado usadas convencionalmente se pueden emplear en el procedimiento de la presente invención.

En el procedimiento de la invención, el ácido lactobiónico se añade preferiblemente en forma de una solución acuosa en la que el ácido se introduce como tal o en forma de sus sales. Una sal del ácido lactobiónico se puede formar añadiendo una base tal como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido magnésico o hidróxido cálcico o los respectivos carbonatos, a una solución del ácido lactobiónico. La sal también se puede formar ajustando el pH en la formulación del queso elaborado. Por tanto, se debe entender que normalmente la sal del ácido lactobiónico se forma mezclando los ingredientes de la formulación del queso elaborado con el ácido lactobiónico. Preferiblemente, el pH de la formulación del queso elaborado resultante se ajusta en el rango de 5,5 a 5,9, más preferiblemente de 5,6 a 5,8.

En una realización preferida del procedimiento de la presente invención para la preparación de queso elaborado, el ácido lactobiónico y/o su sal reemplaza parcial o totalmente la lactosa en la formulación del queso elaborado. Un beneficio adicional de la invención es que el oscurecimiento debido a la reacción de Maillard no aumenta en las

## ES 2 290 290 T3

formulaciones con un contenido igual de lactosa y se reduce drásticamente en las formulaciones en que se reemplaza parcialmente la lactosa por ácido lactobiónico o su sal.

5 En la etapa de mezcla del procedimiento según la presente invención, se puede usar cualquier procedimiento de mezcla empleado en la práctica para la fabricación de queso elaborado. Típicamente, es una mezcla hasta la homogeneidad bajo condiciones de agitación/cizallamiento a temperaturas entre 15 y 30°C, y más preferiblemente entre 20 y 25°C. Se puede usar un equipo convencional de mezclado tal como cualquier tipo de mezclador (p.e., agitador, de única o doble cinta, y similares). La etapa de mezcla como tal dará lugar a la textura deseada (es decir, pasta similar a gel). El producto resultante se puede empaquetar como producto final o se puede tratar adicionalmente si se desea o es necesario dependiendo de las regulaciones importantes del gobierno. Por ejemplo, en algunos países o regiones (p.e., 10 Unión Europea) se requiere legalmente un tratamiento UHT (temperatura ultra alta) para asegurar una reducción de microorganismos específicos (p.e., *Clostridia*). En general, la estructura de la mezcla de queso elaborado se destruye en una etapa de tratamiento en caliente dando lugar a una solución de ingredientes altamente hidratados, independientemente del dispositivo o procedimiento particular aplicado. Dicho tratamiento requiere normalmente un subsiguiente ajuste de la nata de la mezcla para volver a obtener las propiedades de textura deseadas (es decir, una estructura de gel firme). Un queso elaborado que no sufre dicho tratamiento destructor de la textura, tal como ocurre en los Estados Unidos, en general no se somete a un posterior tratamiento de ajuste de la nata.

20 A continuación se describe un procedimiento detallado para la preparación de queso elaborado con un procedimiento de ajuste posterior de la nata. Si la mezcla resultante de los ingredientes de la formulación de queso elaborado y ácido lactobiónico o su sal se trata en caliente, este tratamiento se puede llevar a cabo bajo las condiciones empleadas de manera general en la esterilización o tratamiento UHT. Esto es, la temperatura va preferiblemente de 105 a 150°C. Si el tratamiento en caliente es un tratamiento UHT, la temperatura más preferiblemente va de 135 a 140°C (en caso de calentamiento indirecto, p.e., con una placa intercambiadora de calor) o 140 a 150°C (en el caso de calentamiento directo, p.e., por inyección de vapor). Si el tratamiento en caliente es un tratamiento de esterilización, una temperatura más preferida está en el rango de 110 a 120°C. El tratamiento en caliente se efectúa preferiblemente durante un tiempo que va de 2 segundos a 20 minutos para el tratamiento de esterilización. En general, el tratamiento en caliente se efectúa con medios para la inyección directa de vapor o usando un intercambiador de calor de superficie rugosa o cualquier tipo de horno por lotes (p.e., Stephan cooker) tal como se usa de manera convencional en esta técnica.

30 En el caso de tratamiento en caliente, la mezcla tratada se enfría a continuación hasta una temperatura preferiblemente inferior a 100°C y superior a 15°C (p.e., de 25 a 98°C). Por descontado, resulta económicamente adecuada una temperatura que esté próxima a una de la siguiente etapa de post-ajuste de la nata. Por tanto, un rango particularmente preferido va de 70 a 95°C. El enfriamiento se puede llevar de manera súbita (por descarga de la presión) o mediante el uso de cualquier tipo de intercambiador de calor u otro dispositivo de enfriamiento tal como una placa intercambiadora de calor, intercambiador de calor de placa rugosa o similares, o cualquier combinación de los mismos.

40 A continuación, la mezcla enfriada se somete al ajuste posterior de la nata, ajuste que se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura entre 70 y 95°C, y más preferiblemente entre 80 y 85°C. El tratamiento de post-ajuste de la nata se puede efectuar en cualquier recipiente o tanque convencional con un dispositivo que permita una acción delicada y suave de agitación/cizallamiento. El tratamiento de post-ajuste de la nata se efectúa preferiblemente hasta que se consigue el grado de viscosidad de un correspondiente queso elaborado que no contiene ácido lactobiónico o su sal. En las Figuras 8 y 9 se muestran las curvas de la viscosidad dependiente del tiempo en los procedimientos convencionales de post-ajuste de la nata. Tal como resulta evidente a partir de estas curvas, después de una fase de iniciación, 45 la viscosidad alcanza una meseta. Preferiblemente, el tratamiento de post-ajuste de la nata se continúa hasta que se alcanza dicha meseta. Para los propósitos de esta invención, se considera que esta meseta es “el grado de viscosidad independiente del tiempo”.

50 Aunque puede ser deseable para un mejor control del procedimiento, no resulta necesario medir la viscosidad o parámetro relacionado para beneficiarse del efecto de la invención. Pueden ser suficientes unos pocos ensayos y la evaluación de la correspondiente textura del producto para identificar rápidamente el tiempo óptimo de ajuste de la nata (que generalmente se corresponderá con la meseta) para una formulación que contenga ácido lactobiónico o su sal. Se puede llevar a cabo una fabricación en planta con un tiempo identificado de esta manera. El tiempo de tratamiento del ajuste posterior de la nata puede durar preferiblemente hasta 90 minutos, y más preferiblemente de 10 a 40 minutos. La velocidad de cizallamiento empleada en el tratamiento de post ajuste de la nata en general afecta al tiempo y varía dependiendo del equipo de la planta (p.e., tamaño, operaciones en continuo o por lotes, y similares). Sin embargo, las características tales como la velocidad de cizallamiento no se tienen que usar como un parámetro de control.

60 En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, la reacción de post-ajuste de la nata se inicia (“se cataliza”) por adición de producto finalizado bien ajustado (es decir, queso pre-cocido) en una cantidad de hasta el 10 por ciento, preferiblemente más del 0,1 por ciento, más preferiblemente en el rango de 0,5 a 5 por ciento y todavía más preferiblemente el 2 por ciento. El queso pre-cocido puede ser un material preparado *ad hoc* o, como en los Ejemplos 8 y 9, un producto comercial. En planta, puede resultar conveniente usar reciclado como el queso pre-cocido para el inicio de la reacción de ajuste posterior de la nata. La cantidad de queso pre-cocido afectará al tiempo de ajuste de la nata hasta un cierto punto (es decir, cuanto más queso pre-cocido menor tiempo de ajuste de la nata). En los Ejemplos 8 y 9, para este propósito sirven porciones de producto comercial cremoso. La adición de dicho “catalizador” (es decir, queso pre-cocido) es importante para conseguir los cortos tiempos de creación de nata de los Ejemplos 8 y 65

## ES 2 290 290 T3

9. Si no se utiliza queso pre-cocido, el post-ajuste de la nata en general dura un tiempo considerablemente más largo (p.e., algunas veces dura el doble). Las Figuras 8 y 9 son gráficos que muestran las curvas de ajuste posterior de la nata (es decir, la viscosidad en función del tiempo) para las muestras descritas en los Ejemplos 7 y 8, respectivamente.

5 El queso elaborado tratado en caliente y con ajuste posterior de la nata se puede tratar adicionalmente de la manera convencional (p.e., enfriado, empaquetado y almacenado). El queso elaborado que se obtiene resulta mejor en relación a los productos convencionales en cuanto conserva comparables la textura y las propiedades sensoriales y con un contenido menor de grasa y/o materia seca o, alternativamente, es mejor cuando tiene el mismo contenido en grasa y materia seca.

10 Después de haber descrito en general las realizaciones del procedimiento ilustrado en las figuras así como otras realizaciones, la invención se describe a continuación usando ejemplos específicos que ilustrarán mejor diversos hechos de la presente invención pero no se pretende limitar el alcance de la invención, que se define en las reivindicaciones que se adjuntan. Todos los porcentajes usados en este documento son en peso, a menos que se indique lo contrario.

### 15 Ejemplo 1

Se prepara una composición experimental que incorpora hechos de una realización de la invención para demostrar el uso de ácido lactobiónico para la acidificación directa en la fabricación de la crema de queso. En la Tabla 1 se presenta la composición de la mezcla de queso preparado en esta referencia.

20 Con el fin de preparar la mezcla de crema de queso, se disuelve el ácido lactobiónico, obtenido comercialmente de Lonza Inc. (Fairlawn, NJ) como un polvo blanco cristalino, con agitación en el agua usada en la composición. En este experimento, el ácido lactobiónico se añade en forma de ácido libre. La solución que contiene el ácido lactobiónico se mezcla, a continuación, con el resto de los ingredientes que comprenden nata dulce, leche ultrafiltrada, sal (NaCl) y goma de algarrobo. La mezcla coagula y el pH de la mezcla resultante es aproximadamente 4,52. A continuación, la mezcla se cocina a 180°F (82,2°C) y se homogeniza a 2500 psi (17,24 Mpa). Durante este procedimiento no se deja que el componente lácteo líquido se enfríe por debajo de 140°F (60,0°C). A continuación, el producto de crema de queso obtenida se empaqueta en copas individuales de ocho onzas y se almacena en frío.

TABLA 1

*Ingredientes de una composición de crema de queso de la invención*

Componente	Cantidad (%)
Nata dulce	77,69
Leche UF (5X)	17,0
Ácido lactobiónico	4,0
Sal	0,7
Goma	0,3
Sorbato potásico	0,03
Aromatizantes	0,08

50 Se evalúa el producto de crema de queso por parte de evaluadores entrenados. No se detectan aromas extraños. La apariencia global, sabor, textura y gusto en boca son aceptables. También, la falta de notas de cultivo en la crema de queso acidificado directamente se puede superar usando sistemas de aromas para crear un aroma de crema de queso deseado.

### 55 Ejemplo 2

Se prepara una composición experimental que incorpora hechos de otra realización de la invención para demostrar el uso de la enzima lactosa oxidasa para generar ácido lactobiónico *in situ* para la acidificación de la crema de queso. En la Tabla 2 se presenta la composición de la mezcla de la crema de queso. Esta composición se compara con una composición control representativa de una crema de queso convencional.

60 En este experimento, se usa un ingrediente enzimático, la lactosa oxidasa, para generar ácido lactobiónico *in situ* durante la fabricación de la crema de queso. La lactosa oxidasa se obtiene de Novozymes A/S (Franklinton, NC). Esta lactosa oxidasa es una flavo-enzima que tiene FAD (dinucleótido flavina adenina) presente como cofactor con la lactosa oxidasa.

## ES 2 290 290 T3

Con el fin de preparar la mezcla de la crema de queso, se mezclan la nata dulce, WPC80, sal, goma de algarrobo, concentrado de aroma de crema de queso y sorbato potásico. A continuación se cuece la mezcla a 180°F (82,2°C) calentando y manteniendo durante 5 minutos, seguido de la homogenización de la mezcla cocida a aproximadamente 2500 psi (17,24 Mpa). En este punto, la mezcla homogenizada se inocula con enzima lactosa oxidasa y con un cultivo iniciador de crema de queso. El cultivo iniciador es un cultivo de DVS *Lactococcus lactis* que se obtiene comercialmente de Chris Hansen, Inc., Milwaukee, Wisconsin. Tras incubar a 72°F (22,2°C) durante toda la noche (16 horas), el pH ha bajado a 4,4. Después de ajustar el pH a 4,7 usando mezcla de crema de queso no inoculado, la mezcla se somete a continuación a una etapa de calentamiento hasta 180°F (82,2°C) y se homogeniza a 2500 psi (17,24 Mpa). A continuación, el producto de queso obtenido se empaqueta en copas de 8 onzas (236,59 ml) y se almacena en frío.

Como control, se prepara otra mezcla de queso según la formulación descrita en la Tabla 2 y el procedimiento descrito anteriormente, con la excepción de que se omite el ingrediente lactosa oxidasa. En la Tabla 2 también se presentan los porcentajes mezclados en el control.

TABLA 2

*Ingredientes de las composiciones de la crema de queso de la invención y del control*

Ingrediente	Cantidad de la Muestra de la Invención (%)	Cantidad de la Muestra de control (%)
Nata dulce	77,83	79,41
Agua	3,23	2,43
Leche UF (5X)	17,0	17,0
Lactosa oxidasa (258U/ml)	0,82	0
Cultivo	0,01	0,01
Sal	0,70	0,73
Goma	0,30	0,31
Sorbato potásico	0,03	0,03
Aromatizantes	0,08	0,08

Se determina que el producto de la crema de queso del control no tratado contiene 2,5 por ciento de lactosa. Como contraste, el producto de la crema de queso tratado con la enzima lactosa oxidasa representativo de la invención contiene solamente 0,3 por ciento de lactosa. El contenido en ácido lactobiónico de los productos de la crema de queso se determina empleando cromatografía líquida de alta resolución y usando un protocolo de intercambio iónico. En el caso del producto tratado con la enzima lactosa oxidasa, aproximadamente el 88 por ciento de la lactosa original se ha convertido en ácido lactobiónico.

Como también se observa en estos resultados, esta invención permite y facilita el uso de concentrados de proteína de lactosuero que contienen mayor contenido en lactosa en las formulaciones de la mezcla de crema de queso en adición a la generación *in situ* de la acidez para ayudar a la acidificación.

### Ejemplo 3

Se prepara una composición experimental que incorpora hechos de todavía otra realización de la invención para demostrar el uso del ácido lactobiónico para la acidificación directa en la fabricación del queso cheddar.

Se prepara una mezcla de queso cheddar que contiene 20 g de ácido lactobiónico disuelto en 475 ml de leche y 5 ml de agua en un recipiente estéril, a continuación se añade 500 µl de CHY-MAX® doble fuerte a la mezcla. El CHY-MAX® es un rango de productos de quimosina producidos por fermentación, y se obtiene comercialmente de Chr. Hansen, Inc., Milwaukee, Wisconsin. La mezcla resultante se incuba a 88°F (31,1°C) durante 30 minutos. El coágulo se corta con un cuchillo para permitir la sinéresis. El coágulo se calienta para aumentar su temperatura desde aproximadamente 88°F (31,1°C) hasta 102°F (aproximadamente 38,9°C) con agitación frecuente en un baño de agua. Una vez el coágulo ha alcanzado aproximadamente los 102°F (38,9°C), se incuba durante 60 minutos adicionales a

## ES 2 290 290 T3

un pH de 5,8, se decanta y se presiona para eliminar el lactosuero. El grumo se sala con aproximadamente 0,7 por ciento de cloruro sódico. El grumo salado se presiona durante toda la noche (es decir, 16 horas) y a continuación se empaqueta el queso en bolsas al vacío.

5 El producto de queso cheddar tiene propiedades organolépticas y de textura satisfactorias, sin que se detecten aromas extraños. Esta realización ofrece ahorro de tiempo en la producción de queso cheddar y, por consiguiente, mayores rendimientos de producción, debido a la eliminación del procedimiento que implica los cultivos bacterianos de ácido láctico.

### 10 Ejemplo 4

Se prepara una composición experimental que incorpora hechos de otra realización de la invención relacionada con la fabricación de quesos duros para demostrar el uso de lactosa oxidasa para reemplazar parcialmente los cultivos y para ayudar a la acidificación en la preparación de queso cheddar.

15 Con el fin de preparar una mezcla de queso cheddar, 950 unidades de lactosa oxidasa, del mismo tipo que la descrita en el Ejemplo 2, se añaden a 475 ml de leche y 5 ml de agua en un recipiente estéril y se mezcla con 0,001 por ciento de cultivo iniciador. El cultivo iniciador es un cultivo DVS *Lactococcus lactis* que se obtiene de Chris Hansen, Inc., Milwaukee, Wisconsin. La cantidad de cultivo usado normalmente en la fabricación de queso cheddar es aproximadamente el 0,01 por ciento de la mezcla de queso. Por tanto, este ejemplo utiliza sólo aproximadamente el 20 10 por ciento de la cantidad típica del contenido de cultivo iniciador en una mezcla de queso.

A continuación se añade 500  $\mu$ l de CHY-MAX<sup>®</sup> doble fuerte y la mezcla resultante se incuba a 88°F (31,1°C) durante 30 minutos. El coágulo se corta con un cuchillo para permitir la sinéresis. El coágulo se calienta para aumentar su temperatura desde aproximadamente 88°F (31,1°C) hasta 102°F (38,9°C) con agitación frecuente en un baño de agua. Una vez el coágulo ha alcanzado aproximadamente 102°F (38,9°C), se incuba durante 60 minutos adicionales a un pH de 5,8, se decanta y se presiona para eliminar el lactosuero. El grumo se sala con 0,7 por ciento de cloruro sódico. El grumo salado se presiona durante toda la noche (es decir, 16 horas) y a continuación se empaqueta el queso en bolsas al vacío.

30 Los resultados demuestran que la producción *in situ* del ácido lactobiónico en el queso cheddar preparado en este experimento según una realización de la invención reduce la cantidad de cultivo que hace falta añadir a la mezcla de queso para bajar el pH tal como se necesita.

35 También, el producto de queso cheddar tratado con la enzima lactosa oxidasa representativo de la invención contiene menos del 0,2 por ciento de lactosa. Una prueba separada de control del producto de queso cheddar, preparado de la misma manera con la excepción de que se usa el 0,01 por ciento de cultivo iniciador y sin el ingrediente lactosa oxidasa, se determina que contiene menos del 0,3 por ciento de lactosa. El producto de queso cheddar tiene propiedades organolépticas y de textura satisfactorias sin que se detecten aromas extraños, y es comparable a la muestra control de queso cheddar en términos de estas características.

### 40 Ejemplo 5

En otro experimento, se usa una enzima lactosa oxidasa para generar ácido lactobiónico *in situ* para la acidificación en la producción de queso UF en lugar del cultivo. La composición de la mezcla de queso UF se presenta en la Tabla 3.

Para este procedimiento, 1000 ml de leche desnatada fresca se concentra hasta cinco veces a 145°F (aproximadamente 62,8°C) usando un dispositivo de ultrafiltración que tiene un tamaño de poro de membrana que restringe el paso de moléculas de un peso molecular mayor de 10000. Antes de iniciar la ultrafiltración, se añade una enzima lactosa oxidasa del mismo tipo de la descrita en el Ejemplo 2, en una cantidad de 0,2 unidades por gramo de leche, y al mismo tiempo se añade también 5,4 g de sal. La concentración se considera completa por el procedimiento de ultrafiltración cuando se ha eliminado el 80 por ciento del volumen original de leche. A continuación, se añade 103 g de nata dulce (40 por ciento) a la leche concentrada para alcanzar una relación de proteína a grasa de aproximadamente 0,8. Se añaden 10  $\mu$ l de cuajo a la mezcla de nata/leche descremada y la mezcla resultante se agita lentamente hasta que la enzima lactosa oxidasa ha convertido suficiente lactosa en ácido lactobiónico, de manera que la mezcla alcance un pH de aproximadamente 5. Se efectúa una evaporación para alcanzar el nivel final de humedad deseada en el queso mediante un procedimiento de evaporación convencional usado para este propósito.

60

65

## ES 2 290 290 T3

TABLA 3

*Ingredientes de una composición de queso UF de la invención*

Ingrediente	Cantidad
Leche descremada	1000 ml
Nata dulce (40%)	103 g
Enzima	2000 unidades
Sal	5,4 g
Cuajo	10 $\mu$ l

Mediante la determinación del contenido en lactosa en el producto de queso UF y la comparación de este valor con el de la prueba control, en la que el queso UF se ha preparado de la misma manera con la excepción de que la adición de la lactosa oxidasa se ha omitido, se confirma que la lactosa presente en la leche descremada se convierte en ácido lactobiónico cuando se procesa en presencia de la enzima lactosa oxidasa. Adicionalmente, se necesita menos diafiltración para el retenido reaccionado en comparación con la que se usa típicamente en la producción de queso UF convencional, debido a la conversión de la lactosa en ácido lactobiónico. Es decir, esta realización captura muchos más sólidos derivados de la lactosa que lo que hubiese hecho el mismo procedimiento usando cultivos de inicio. Debido a que el ácido lactobiónico (de peso molecular 358,3) tiene un peso de la masa/mol que es aproximadamente cuatro veces el peso de la masa/mol del ácido láctico (de peso molecular 90,08), en base molar, se retiene una masa mayor, derivada de la lactosa sobre una base equimolar, cuando la lactosa se convierte en ácido lactobiónico, tal como ocurre en esta realización de la invención, que cuando se convierte en ácido láctico.

### Ejemplo 6

En este experimento se preparan quesos elaborados a partir de composiciones de mezcla de quesos que contienen una de las tres diferentes formas del ácido lactobiónico. En la Tabla 4 se presentan las composiciones básicas de las tres mezclas de queso elaborado. La única diferencia es la forma particular del ácido lactobiónico usado. Como prueba de control, se prepara otra mezcla de queso según la formulación descrita en la Tabla 4 y el procedimiento descrito a continuación, con la excepción de que se omite el ácido lactobiónico.

Las mezclas de queso que representan esta invención comprenden los siguientes ingredientes: concentrado de proteína de lactosuero (WPC34, Wisconsin Whey International, Juda, Wisconsin) que contiene el 34 por ciento de proteína de lactosuero, concentrado de proteína de leche (NZ MPC-70, New Zealand Milk Products, Wellington, New Zealand, lactosuero seco (que contiene 71,78 por ciento de lactosa; Kafren, Kraft Foods, Glenview III), agua, queso finamente dividido, grasa de leche seca (AMF), los colorantes APO y achiote, ácido sórbico, agentes emulsionantes (p.e., fosfato monosódico y fosfato disódico), sal (NaCl), condensado, y ácido lactobiónico. El condensado es el agua añadida a la masa de queso durante la cocción mediante la condensación del vapor usado en el procedimiento de inyección directa de vapor usado en el procedimiento de fabricación del queso. La cantidad del condensado depende del tiempo, de la temperatura de cocción, y de la temperatura inicial de la mezcla del queso. Esta cantidad se determina y se usa para ajustar el agua en la formulación. La prueba de control tiene la misma composición con la excepción de que no contiene ácido lactobiónico (todos los otros ingredientes se incluyen usando las mismas proporciones).

El procedimiento para la fabricación del queso es tal como sigue. Se añaden queso, AMF, sal emulsionante, ácido sórbico, fosfato mono y disódico, APO y achiote a un balón mezclador Hobart y se mezcla durante aproximadamente 2 minutos. Se prepara una mezcla húmeda con el resto de los ingredientes en la solución del ácido lactobiónico (descrito a continuación) y se adiciona al mezclador. El proceso se continúa hasta que todos los componentes se encuentren bien mezclados. Para la prueba control, se prepara una mezcla húmeda con el resto de los ingredientes en el agua sin el ácido lactobiónico, y esta mezcla húmeda se añade al balón mezclador.

La mezcla se transfiere a un calentador donde se calienta mediante inyección directa de vapor. La mezcla se calienta hasta 184°F (84,4°C) a una velocidad de calentamiento de 1°F/min (0,6°C/min). La temperatura se mantiene a 184°F (84,4°C) y se continúa la mezcla durante aproximadamente 2 minutos. El producto se vierte en copas de 8 onzas (236,59 ml), se enfría y se almacena refrigerado hasta su posterior uso:

# ES 2 290 290 T3

TABLA 4

*Ingredientes de una composición de queso elaborado de la invención*

Ingrediente	Cantidad (%)	Cantidad (%)
MPC-70	344,74	15,22
WPC34	94,80	2,18
Lactosuero seco	21,55	6,95
Agua	679,04	29,94
Queso	340,20	15,0
AMF	378,76	16,70
APO	0,46	0,02
Achiote	0,46	0,02
Ácido sórbico	2,29	0,10
MSP <sup>1</sup>	7,20	0,32
DSP <sup>1</sup>	55,63	2,45
Sal emulsionante	34,38	1,52
Condensado <sup>2</sup>	204,12	9,0
Forma de ácido lactobiónico <sup>3</sup>	90,72	4,0

<sup>1</sup> Cuando el ácido lactobiónico se usa directamente no se añade fosfato monosódico. En su lugar se añade una cantidad equivalente de fosfato disódico, adicionalmente a la cantidad del ingrediente ya especificado para el mismo en la Tabla 4 en la formulación.

<sup>2</sup> El "condensado" es el agua añadida a la masa del queso durante el calentamiento por condensación del vapor usado en el procedimiento de inyección directa de vapor empleado en el procedimiento para la fabricación del

queso. La cantidad del condensado depende del tiempo, de la temperatura de calentamiento, y de la temperatura inicial de la mezcla. Esta cantidad se determina y se usa para ajustar el agua en la composición del queso.

<sup>3</sup> Se añade una de las tres diferentes formas de ácido lactobiónico respectivamente a las tres diferentes muestras de mezcla de queso que tienen la composición anterior. Estas tres diferentes formas de ácido lactobiónico se añaden en solución tal como sigue: (a) ácido lactobiónico disuelto en agua y usado directamente; (b) solución de ácido lactobiónico, preparada disolviendo el ácido libre en el agua seguido de neutralización de la solución ácida con hidróxido sódico hasta un pH de aproximadamente 7, antes de la adición a la mezcla de queso de la solución que contiene el ácido lactobiónico; y (c) sal cálcica del ácido lactobiónico, lactobionato de calcio, que se disuelve en agua.

Las muestras adicionales de queso elaborado de cada una de las tres formulaciones básicas descritas anteriormente se preparan ajustando la velocidad de adición del ácido lactobiónico de manera que su nivel varía desde el 1 al 6 por ciento, en incrementos aproximados del 1 por ciento a través de este rango. Se ha encontrado que un nivel del 4 por ciento de ácido lactobiónico es óptimo en los productos de queso elaborado ensayados.

La apariencia, aroma, textura y gusto en boca se han evaluado organolépticamente de manera cualitativa para cada una de las muestras por parte de cinco evaluadores usando una escala de valoración de cuatro puntos: no aceptable, igual al producto de referencia, marginalmente mejor que el producto de referencia y significativamente mejor que el producto de referencia.

Según los resultados de esta evaluación, el queso elaborado que contiene el ácido lactobiónico neutralizado se ha encontrado que tiene una apariencia similar a la del producto control. La textura y el gusto en boca de este producto de queso también se ha encontrado que están a la par con el control. El uso de la forma libre del ácido lactobiónico no contribuye a ningún aroma extraño y algunos evaluadores comentan que potencia las notas del tipo queso/lácteas en el producto.

Los productos de queso elaborado que contiene el ácido lactobiónico no neutralizado y lactobionato cálcico se ha encontrado que tienen un aroma de queso aceptable. La apariencia, textura y gusto en boca de estas muestras declinan a mayores niveles de adición (mayor de aproximadamente 4 por ciento).

#### Ejemplos 7 y 8

Estos ejemplos también ilustran la inclusión del ácido lactobiónico en los quesos elaborados. Todos los ingredientes de la formulación del queso elaborado deseado se mezclan y se emulsionan previamente durante 3 minutos usando un Thermomix TM21 (Vorwek) a una velocidad regulada de 6 y a temperatura ambiente. En el Ejemplo 7, la mezcla resultante se calienta en un aparato Roversi a 60°C mediante calentamiento indirecto seguido de calentamiento con vapor directo durante 80 segundos. En el Ejemplo 8, la mezclase calienta en el aparato Roversi a 50°C mediante calentamiento indirecto seguido de calentamiento con vapor directo durante 105 segundos. En ambos ejemplos, la mezcla se enfría a 80°C, se mezcla con el 2 por ciento de queso pre-cocido ("retrabajado"; producto comercial cremoso) y se ajusta posteriormente la nata en un Brabender-Farinograph-Resistograph, a una velocidad regulada de 2, a 80°C hasta que se alcanza la meseta de la viscosidad (aproximadamente 1 hr en ambos ejemplos). El producto se introduce en contenedores, se deja enfriar a temperatura ambiente, después se enfría y se almacena a 4°C por lo menos durante 2 semanas.

## ES 2 290 290 T3

El Brebender Farinograph usado en los Ejemplos 7 y 8 registra el impulso rotativo (100 unidades Farino = 1 Nm) que está relacionado con la viscosidad del queso caliente. Este dispositivo se usa para la experimentación a pequeña escala ya que imita el tanque de ajuste de la nata que se usa en una planta y lo combina con un dispositivo de registro de viscosidad. Dicho dispositivo no es, por descontado, obligatorio en la planta. Los ensayos se llevan a cabo para asegurar que las curvas de ajuste de la nata obtenidas en ambos dispositivos, el Brabender Farinograph y el de medida de la viscosidad usados en la planta piloto son comparables (es decir, representativo). El Farinograph se describe con más detalle en "The Farinograph Handbook", 3ª ed., B.L.D'Appolonia and W.H. Kunerth, eds, Asociación Americana de Químicos del Grano, St. Paul, U.S.A., 1984.

En el Ejemplo 7 se preparan las composiciones del queso elaborado de las siguientes formulaciones finales:

	Control 1	Ejemplo 7 de la Invención
Materia seca	42,0	40,9
Grasa	17,8	15,0
Proteína	9,9	9,5
Lactosa	5,8	5,7
Ácido lactobiónico	0,0	2,0

Todos los parámetros del procedimiento son idénticos en ambas formulaciones. La incorporación del 2 por ciento de ácido lactobiónico permite una reducción de sólidos del 1,1 por ciento y al mismo tiempo una reducción de la grasa del 2,8 por ciento.

Los ingredientes detallados de las muestras del Ejemplo 7 son los siguientes:

	Control 1	Ejemplo 7 de la Invención
Mantequilla	16,87	13,40
Proteína de leche	14,58	14,02
Queso	17,50	17,50
Sales de fusión	3,15	3,28
Agua	45,38	47,28
Cloruro sódico	0,90	0,90
Agente de enlace	1,62	1,62
Ácido lactobiónico	0,0	2,0

Ambas formulaciones presentan, o se ajustan finalmente a, un pH entre 5,6 y 5,9, más preferiblemente entre 5,6 y 5,8.

## ES 2 290 290 T3

En el Ejemplo 8, se preparan las composiciones de queso elaborado de las siguientes formulaciones finales:

	Control 2	Ejemplo 8 de la Invención
Materia seca	40,7	40,1
Grasa	22,2	18,9
Proteína	12,3	12,3
Lactosa	0,2	0,2
Ácido lactobiónico	0,0	3,0

Todos los parámetros del procedimiento son idénticos en ambas formulaciones. La incorporación del 3 por ciento de ácido lactobiónico permite una reducción de sólidos del 0,6 por ciento y al mismo tiempo una reducción de la grasa del 3,3 por ciento.

Los ingredientes detallados de las muestras del Ejemplo 8 son los siguientes:

	Control 2	Ejemplo 8 de la Invención
Mantequilla	18,94	15,59
Proteína de leche	10,96	10,96
Queso	11,44	11,44
Sales de fusión	3,45	3,45
Agua	53,81	54,56
Cloruro sódico	1,0	1,0
Ácido láctico	0,4	0
Ácido lactobiónico	0,0	3,0

Ambas formulaciones presentan, o se ajustan finalmente a, un pH entre 5,6 y 5,9, más preferiblemente entre 5,6 y 5,8.

Las curvas de ajuste de la nata (es decir, los cambios en la viscosidad del queso caliente) para las muestras del Ejemplo 7 se muestran en la Figura 8 y para las muestras del Ejemplo 8 en la Figura 9. Las curvas de ajuste de la nata de ambas muestras de la invención son muy similares a las de las muestras de referencia (técnica anterior) que representan la viscosidad del queso caliente deseada. Mediante una valoración sensorial informal no se han podido identificar diferencias en las propiedades sensoriales (p.e., brillo en superficie, pegajosidad a la lámina, ajuste de la nata, grado de salación y acidez) entre las muestras de la invención y las de control.

### Ejemplo 9

Este ejemplo ilustra la preparación de leche con lactosa reducida usando lactosa oxidasa para convertir la lactosa en ácido lactobiónico. La leche entera se pasteuriza a 161°F (71,7°C) durante 15 segundos y a continuación se enfría a 113°F (45,0°C). La lactosa oxidasa se añade a un nivel de aproximadamente 4 unidades/ml de leche. La mezcla de reacción se agita cuidadosamente para dispersar la enzima. La mezcla resultante se incuba a continuación a 113°F (45,0°C) durante toda la noche para permitir que tenga lugar la reacción enzimática. Una muestra de control se expone a las mismas condiciones con la excepción de que no se añade enzima. Las muestras se analizan para su contenido en lactosa y ácido lactobiónico:

	Control	Invención
Lactosa	4,45 %	1,5 %
Ácido lactobiónico	0	3,2 %

## ES 2 290 290 T3

### Ejemplo 10

Este ejemplo ilustra la biogeneración de ácido lactobiónico en nata ácida usando lactosa oxidasa. Las formulaciones de la nata ácida de control y de la invención son las siguientes:

Ingrediente	Cantidad	
	Control	Invención
Leche descremada	52%	52 %
Nata	45 %	45 %
Agua	1 %	1 %
Cultivo	0,1 %	0,1 %
Cuajo	0,01 %	0,01 %
Lactosa oxidasa	0	4 unidades/ml

Una mezcla de leche desnatada, nata y agua se calienta a 72°F (22,2°C) seguido de adición del cultivo (p.e., *Lactococcus lactis subsp., diacetylactis* y *Leuconosfoc*) y cuajo para la muestra de control o adición de cultivo (p.e., *Lactococcus lactis subsp., diacetylactis* y *Leuconosfoc*), cuajo y lactosa oxidasa para la muestra de la invención. Las muestras se incuban a 72°F (22,2°C) durante toda la noche para obtener la nata ácida. Usando el tratamiento enzimático, la cantidad de lactosa se reduce desde aproximadamente 2,5 por ciento en la muestra control hasta aproximadamente 1,7 por ciento en la muestra de la invención.

### Ejemplo 11

Estos ejemplos ilustran la biogeneración de ácido lactobiónico en yogur usando lactosa oxidasa para generar acidez y reducir los niveles de lactosa. Leche standarizada hasta un contenido en grasa de leche del 2% se calienta a 187°F (86,1°C) y se mantiene a esta temperatura durante 20 minutos. Después de la homogenización a 150°F (65,6°C), la mezcla se enfría a 115°F (46,1°C). Se añade el cultivo (muestra de control) o el cultivo y la lactosa oxidasa (muestra de la invención) y la mezcla se incubaba a 113°F (45,0°C) durante 4 horas hasta un pH de 4,6. Se adiciona lactosa oxidasa hasta un nivel de aproximadamente 4 unidades/ml de leche. El cultivo es una mezcla de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. El yogur de control contiene aproximadamente 3,4 por ciento de lactosa en comparación con aproximadamente 0,1-4 por ciento en el yogur tratado con la enzima.

### Ejemplo 12

Este ejemplo ilustra el uso de ácido lactobiónico (ya sea añadido directamente o generado *in situ*) para modificar las proteínas del lactosuero. Las proteínas del lactosuero modificadas usando ácido lactobiónico son más funcionales como ingredientes para el queso elaborado en comparación con las proteínas del lactosuero modificadas usando los ácidos tradicionales. Dichas proteínas de lactosuero modificado se pueden usar como un ingrediente en los quesos y otros productos lácteos.

#### Muestra A

WPC-35 (30,5 libras (13,83 kg); concentrado de proteína de lactosuero que contiene 35 por ciento de proteína) se mezcla con 51,2 libras (23,22 kg) de agua y se acidifica hasta un pH de 3,78 usando 3,7 lb (1,68 kg) de ácido lactobiónico. La mezcla resultante se calienta a 80°C, se mantiene en estas condiciones durante 180 minutos y se seca por rociado para dar lugar a un polvo que contiene 26 por ciento de proteína. El WPC modificado se incorpora a la fórmula del queso elaborado al 16 por ciento en peso. El queso elaborado resultante tiene un valor de firmeza del penetrómetro de 8,6 mm en comparación con los 11,9 mm del queso elaborado que incorpora el mismo nivel de proteína de lactosuero modificada usando ácido láctico, y 15,4 mm del queso elaborado que usa WPC-35 sin modificar.

#### Muestra B

El WPC-35 se reconstituye en agua hasta una concentración de sólidos total del 33 por ciento y una concentración final de lactosa del 15 por ciento. Esta solución se pasteuriza a 70,4°C durante 15 minutos y se enfría a 55°C. Se añade lactosa oxidasa a razón de 2 unidades/ml. Se incuban tres litros de la mezcla de reacción en un recipiente de

## ES 2 290 290 T3

un bioreactor de 5 litros (New Brunswick) a 55°C. El pH se mantiene constante a 7,0 y se proporciona aireación con suministro constante de aire filtrado y agitación a 75 rpm. Se deja proceder la bioconversión durante 48 horas dando lugar a la formación de la sal sódica del ácido lactobiónico. El pH de la solución resultante se ajusta a 3,35 con ácido láctico. A continuación se calienta a 176°F (80,0°C) durante 180 minutos. La suspensión tratada en caliente se liofiliza.

El WPC modificado y liofilizado se incorpora a la fórmula de un queso elaborado al 16 por ciento. El queso elaborado resultante tiene un valor de firmeza del penetrómetro de 8,2 mm en comparación con los 12,6 mm del queso elaborado que incorpora el mismo nivel de proteína de lactosuero modificada usando ácido láctico, y 16,5 mm del queso elaborado que usa WPC-35 sin modificar.

### Muestra C

El WPC-35 se reconstituye en agua hasta una concentración total de sólidos del 33 por ciento y una concentración final de lactosa del 15 por ciento. Esta solución se pasteuriza a 70,4°C durante 15 minutos y se enfría a 55°C. Se añade lactosa oxidasa a razón de 2 unidades/ml. Se incuban tres litros de la mezcla de reacción en un recipiente de bioreactor de 5 litros (New Brunswick) a 55°C. El pH se mantiene constante a 7,0 usando un estabilizador del pH y se proporciona aireación con suministro constante de aire filtrado y agitación a 75 rpm. Se deja proceder la bioconversión durante 48 horas dando lugar a la formación de la sal sódica del ácido lactobiónico. El pH de la solución resultante se ajusta a 3,35 con ácido láctico. A continuación se calienta a 176°F (80,0°C) durante 180 minutos. La dispersión tratada en caliente se enfría a 40°F (4,4°C) y se almacena para su uso como un ingrediente líquido.

El WPC líquido modificado se incorpora a la fórmula de un queso elaborado en una cantidad que proporciona el 12% de proteína de lactosuero en peso. El queso elaborado resultante tiene un valor de firmeza del penetrómetro de 3,9 mm en comparación con los 14,9 mm del queso elaborado que incorpora el mismo nivel de proteína de lactosuero modificada usando ácido láctico, y 17,5 mm del queso elaborado que usa WPC-35 sin modificar.

Este ejemplo ilustra el uso de ácido lactobiónico para incrementar los sólidos derivados de la lactosa en el queso elaborado. Debido a la tendencia de la lactosa a formar cristales indeseables, los contenidos en lactosa se limitan en general a valores entre 6 y 9 por ciento en los productos de queso elaborado, dependiendo de la formulación específica. El uso de ácido lactobiónico añadido a la lactosa presente normalmente, permite el uso de más sólidos derivados de la lactosa en los productos de queso elaborado.

Se combina 0,7 lb (0,32 kg) de ácido lactobiónico con 2,9 lb (1,32 kg) de MPC-70, 0,5 lb (0,23 kg) de WPC-35, 4,7 lb (2,13 kg) de lactosuero seco dulce y 11 lb (4,99 kg) de agua. Esta mezcla se añade a una mezcla fundida de 40 lb (18,14 kg) de queso cheddar, 2 lb (0,91 kg) de grasa de leche anhidra y 1,7 lb (0,77 kg) de sales emulsionantes. El queso elaborado resultante se empaqueta en lonchas. Las lonchas de queso elaborado que contienen 1 por ciento de ácido lactobiónico no son diferentes de las lonchas de queso elaborado del control que no contienen ácido lactobiónico, pero que tienen la ventaja de reemplazar aproximadamente el 1 por ciento de los sólidos de proteína y grasa con ácido lactobiónico.

### Ejemplo 14

Estos ejemplos ilustran el uso de ácido lactobiónico para reemplazar la grasa de leche en el queso elaborado. El ácido lactobiónico puede reemplazar hasta el 25 por ciento de la grasa de la leche en el queso elaborado con un ligero aumento en la firmeza del producto y una ligera restricción en la sustancia derretida.

Las siguientes formulaciones se usan para preparar diversos productos de queso elaborado.

(Tabla pasa a página siguiente)

## ES 2 290 290 T3

	Ingrediente	Cantidad		
		Control	2% ácido lactobiónico	4% ácido lactobiónico
5	Queso cheddar	26%	26%	26%
	Grasa de leche	12,6%	10,6%	8,6%
10	MPC-70	7,1%	7,1%	7,1%
	WPC-34	13,9%	13,9%	13,9%
15	Lactosuero dulce seco	0,2%	0,2%	0,2%
	Ácido láctico	0,6%	0,6%	0,6%
20	Ácido lactobiónico (neutralizado con NaOH)	0%	2,0%	4,0%
25	Agua	35,2%	35,2%	35,2%
	Firmeza penetrómetro	26,5 mm	21,1 mm	23,1 mm
30	Punto de fusión	50,9°C	64,7°C	66,8°C

35 La sustitución de la grasa de la leche por ácido lactobiónico aumenta ligeramente la firmeza y reduce la restricción en la sustancia derretida en una pequeña cantidad.

40 Aunque se ha ilustrado en este documento el uso de ácido lactobiónico en la fabricación de varios tipos de quesos y de productos lácteos, se apreciará que la presente invención también contempla el uso del ácido lactobiónico como un acidulante alimentario general, como un agente emulsionante, como un fortificante o quelante del calcio, como antioxidante y como agente de volumen para otros tipos de alimentos además de los productos lácteos.

### Referencias citadas en la descripción

45 La lista de referencias citadas por el solicitante está indicada solamente para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido mucho cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rehusa cualquier responsabilidad en este respecto.

### Patentes citadas en la descripción

- 50
- US 5851578 A [0008]
  - WO 9931990 A [0026]

### 55 Literatura, diferente de patentes, citada en la descripción

**HARJU**, *Bulletin of the IDF*, 1993, vol. 289, 27-30 [0008]

60 **SATORY et al.**, *Biotechnology Letters*, 1997, vol. 19(12), 1205-08 [0008]

**RIVIERA et al.**, *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1982, vol. 36(6), 1162-69 [0008]

Lactosuero: Actas de la 2ª Conf. Intern. sobre Lactosuero. **TIMMERMANS**. Federación Láctea Intern., Octubre 1997, 233, 249 [0008]

65 **CANESVACINI et al.**, *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 1982, vol. 175, 125-129 [0027]

## ES 2 290 290 T3

**NIDETZKY** *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 53 [0027]

The Farinograph Handbook, American Association of Cereal Chemists [0085]

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 290 290 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de fabricación de un producto lácteo que contiene ácido lactobiónico, y que comprende las etapas de:
- preparación de una mezcla líquida que comprende un componente lácteo, lactosa y ácido lactobiónico o una sal aceptable desde el punto de vista alimentario o una forma neutralizada del mismo, y
  - 10 - tratamiento de la mezcla líquida para obtener un producto lácteo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el componente lácteo se selecciona entre leche de consumo, leche concentrada, permeado de UF, concentrado de proteínas de lactosuero, nata, nata dulce, sólidos de leche, flujos de subproductos lácteos y mezclas de los mismos.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el ácido lactobiónico se añade a la mezcla líquida en forma de una solución de sal de lactobionato disuelto en agua y neutralizado a pH 7 por adición de una sustancia alcalina.
4. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el ácido lactobiónico se genera por oxidación catalítica de por lo menos una parte de la lactosa a ácido lactobiónico utilizando una oxidasa.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la oxidasa es la lactosa oxidasa.
6. Procedimiento según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la oxidasa es la lactosa oxidasa en combinación con un cofactor que comprende FAD.
- 25 7. Procedimiento según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la oxidasa es una mezcla de lactosa oxidasa y glucosa oxidasa.
8. Procedimiento según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la oxidasa es una mezcla de lactosa oxidasa y hexosa oxidasa.
- 30 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que el producto lácteo comprende queso.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la etapa de tratamiento de la mezcla líquida para obtener el producto lácteo comprende la coagulación de la mezcla de queso para dar lugar al producto de queso.
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el ácido lactobiónico está presente en una cantidad desde 0,1 hasta 10 por ciento de la mezcla líquida, preferiblemente del 2 al 6 por ciento de la mezcla líquida, y más preferiblemente del 3 al 5 por ciento de la mezcla líquida.
- 40 12. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el ácido lactobiónico está presente en una cantidad efectiva para inducir la coagulación de la mezcla líquida.
- 45 13. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el ácido lactobiónico está presente en una cantidad efectiva para reducir el pH de la mezcla líquida hasta el punto isoeléctrico de la caseína presente en la misma.
14. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el ácido lactobiónico está presente en una cantidad efectiva para reducir el pH de la mezcla líquida.
- 50 15. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el ácido lactobiónico es una sal alcalina o una sal de un metal alcalino térreo del ácido lactobiónico.
16. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el ácido lactobiónico es una sal de sodio, de potasio o de calcio del ácido lactobiónico.
- 55 17. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el ácido lactobiónico es un ácido libre.
18. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la mezcla líquida comprende además un coagulante enzimático.
- 60 19. Procedimiento según la reivindicación 10, que comprende además las etapas de formación de un grumo y de un lactosuero a partir de la mezcla coagulada, y la separación del grumo y el lactosuero para obtener el producto de queso.
- 65 20. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la mezcla líquida comprende además un cultivo iniciador.

## ES 2 290 290 T3

21. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la mezcla líquida comprende además bacterias de ácido láctico en una cantidad efectiva para realizar el cultivo de la mezcla líquida.

22. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el producto de queso es un queso cremoso.

23. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el producto de queso es un queso cheddar.

24. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el producto lácteo comprende yogur

25. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el producto lácteo comprende nata ácida.

26. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el producto lácteo comprende queso de granja.

27. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el producto lácteo comprende mantequilla de leche.

28. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el producto lácteo comprende leche.

29. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el producto lácteo comprende un producto que contiene lactosuero.

30. Procedimiento de fabricación de un producto de queso elaborado que contiene ácido lactobiónico, y que comprende las etapas de:

- preparación de una mezcla para queso que comprende lactosa, queso sólido finamente dividido y ácido lactobiónico o una sal aceptable desde el punto de vista alimentario o una forma neutralizada del mismo;

- calentamiento de la mezcla de queso a una temperatura y durante un tiempo con el fin de obtener una mezcla de queso fundido;

- calentamiento de la mezcla de queso a una temperatura entre 170°F (76,7°C) y 200°F (93,3°C) durante aproximadamente entre uno y diez minutos para proporcionar el producto de queso elaborado; y

- empaquetamiento del producto de queso elaborado.

31. Procedimiento de fabricación de un queso elaborado, dicho procedimiento comprende las etapas de:

(a) mezcla de los ingredientes de la formulación del queso elaborado con ácido lactobiónico y/o una sal del mismo para formar una mezcla;

(b) tratamiento térmico de la mezcla;

(c) enfriamiento de la mezcla tratada térmicamente; y

(d) ajuste de la nata en la mezcla enfriada hasta el nivel de viscosidad deseado.

32. Procedimiento según la reivindicación 31, en el que la mezcla de la etapa (b) se calienta a una temperatura de 105 a 150°C durante un tiempo de 2 segundos a 20 minutos y en el que la mezcla tratada térmicamente de la etapa (c) se enfría a una temperatura de 70 a 95°C.

33. Procedimiento según la reivindicación 32, en el que el nivel de viscosidad deseado que se ha obtenido en la etapa (d) es un nivel de viscosidad independiente del tiempo.

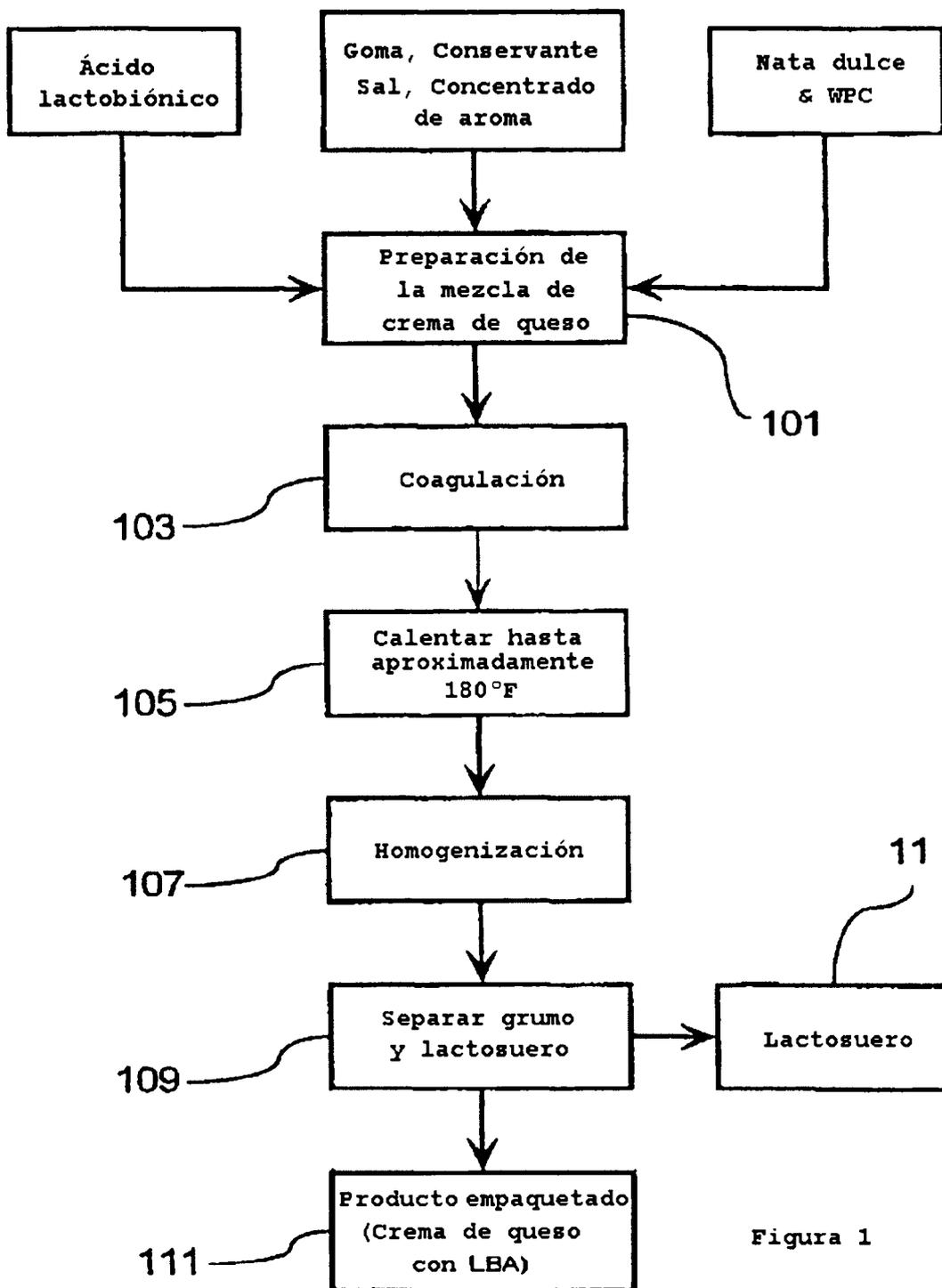
34. Producto de queso que comprende queso y ácido láctobiónico o una sal aceptable desde el punto de vista alimentario o una forma neutralizada del mismo, en el que el ácido láctobiónico o una sal aceptable desde el punto de vista alimentario o una forma neutralizada del mismo se encuentra presente en una cantidad de 0,1 a 10 por ciento del producto de queso.

35. Producto de queso según la reivindicación 34, en el que el producto de queso es un producto de queso elaborado.

36. Queso elaborado que comprende de 0,1 a 10 por ciento de ácido láctobiónico y/o una sal del mismo, en el que el queso elaborado posee un contenido en materia seca del 25 al 60 por ciento y un contenido en materia grasa del 5 al 40 por ciento.

37. Queso elaborado según la reivindicación 36, en el que la cantidad de ácido láctobiónico y/o de una sal del mismo es de 0,5 a 7 por ciento.

38. Queso elaborado según la reivindicación 37, en el que la cantidad de ácido láctobiónico y/o de una sal del mismo es de 1 a 5 por ciento.



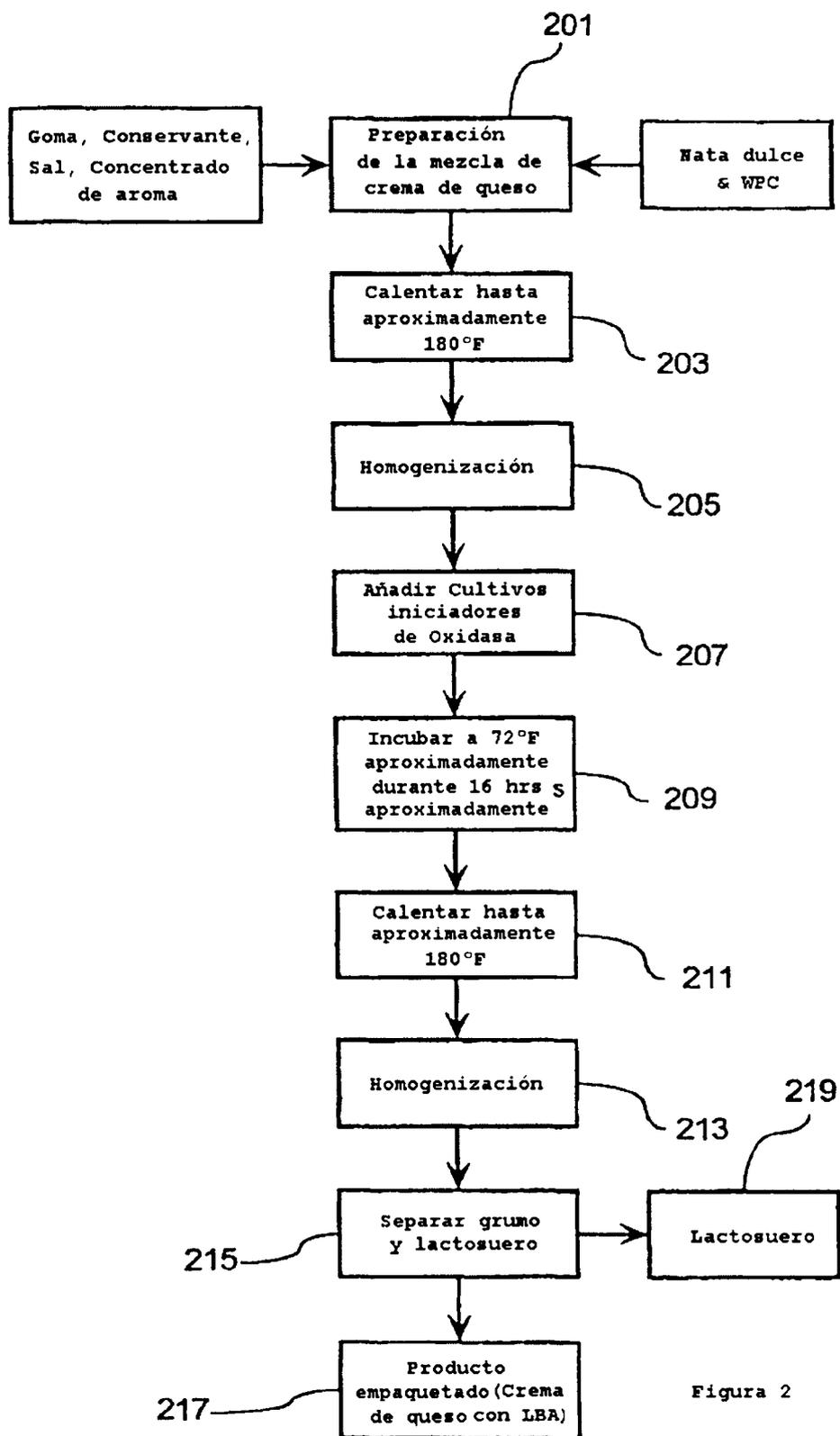


Figura 2

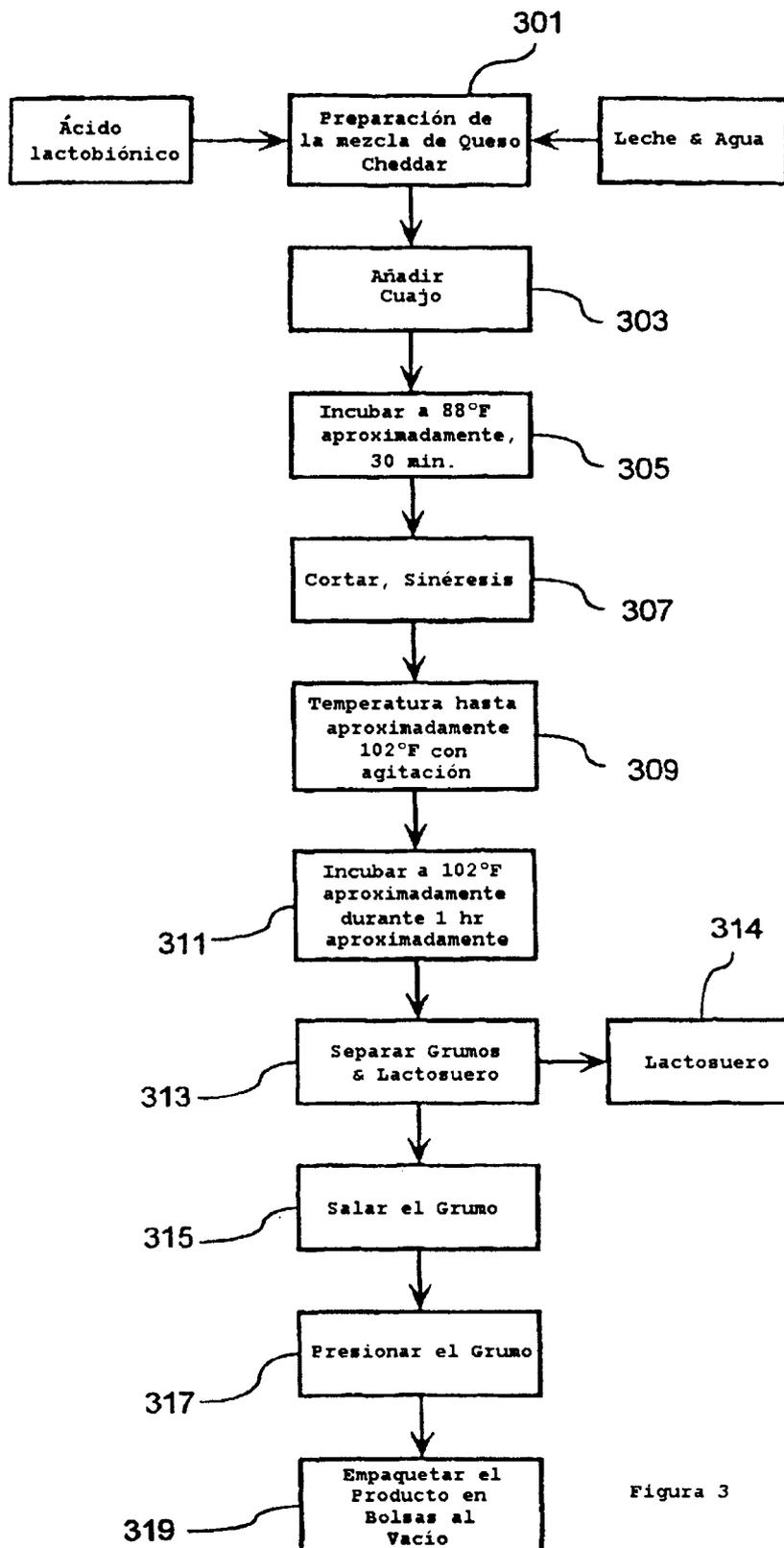


Figura 3

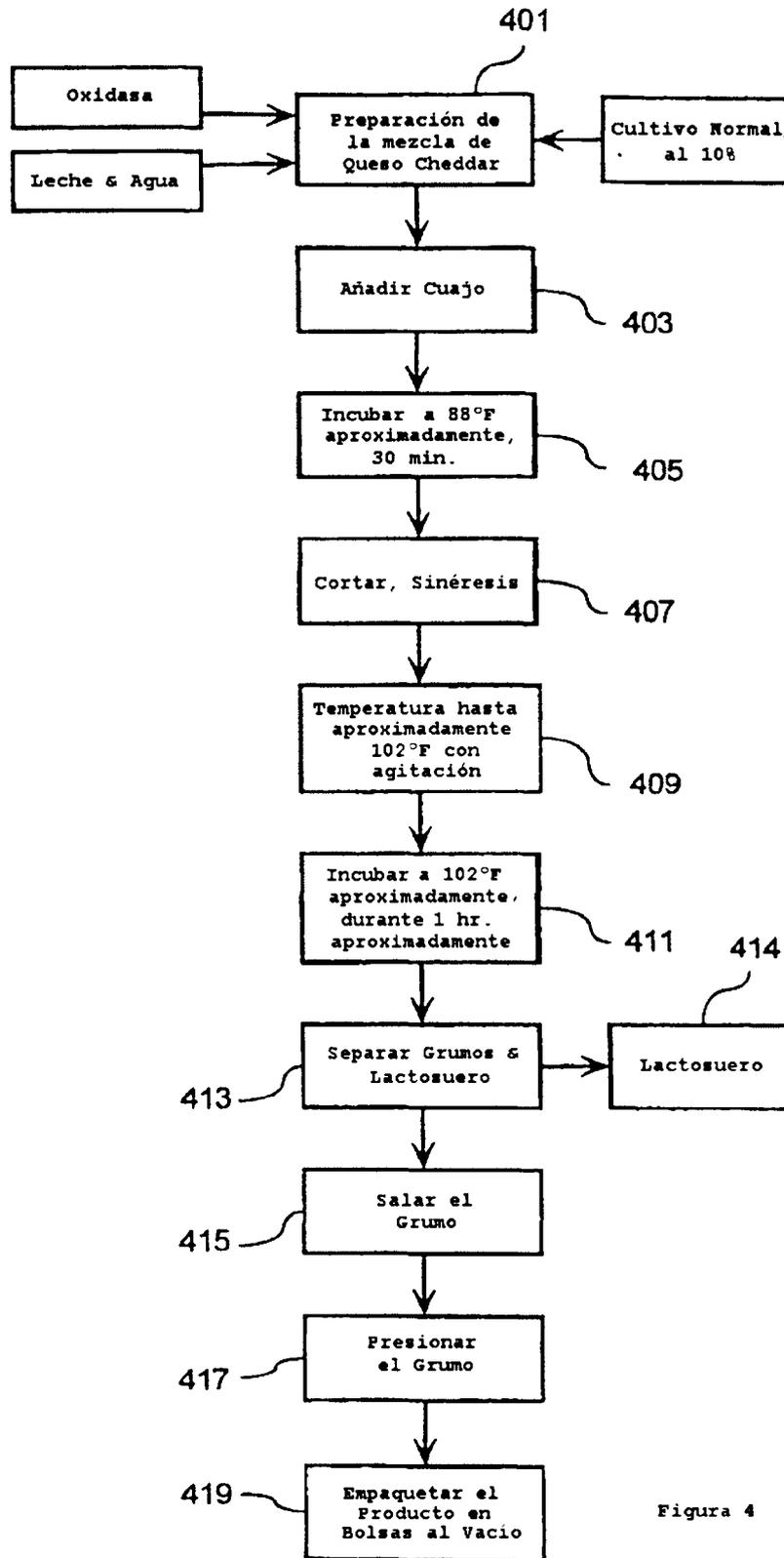


Figura 4

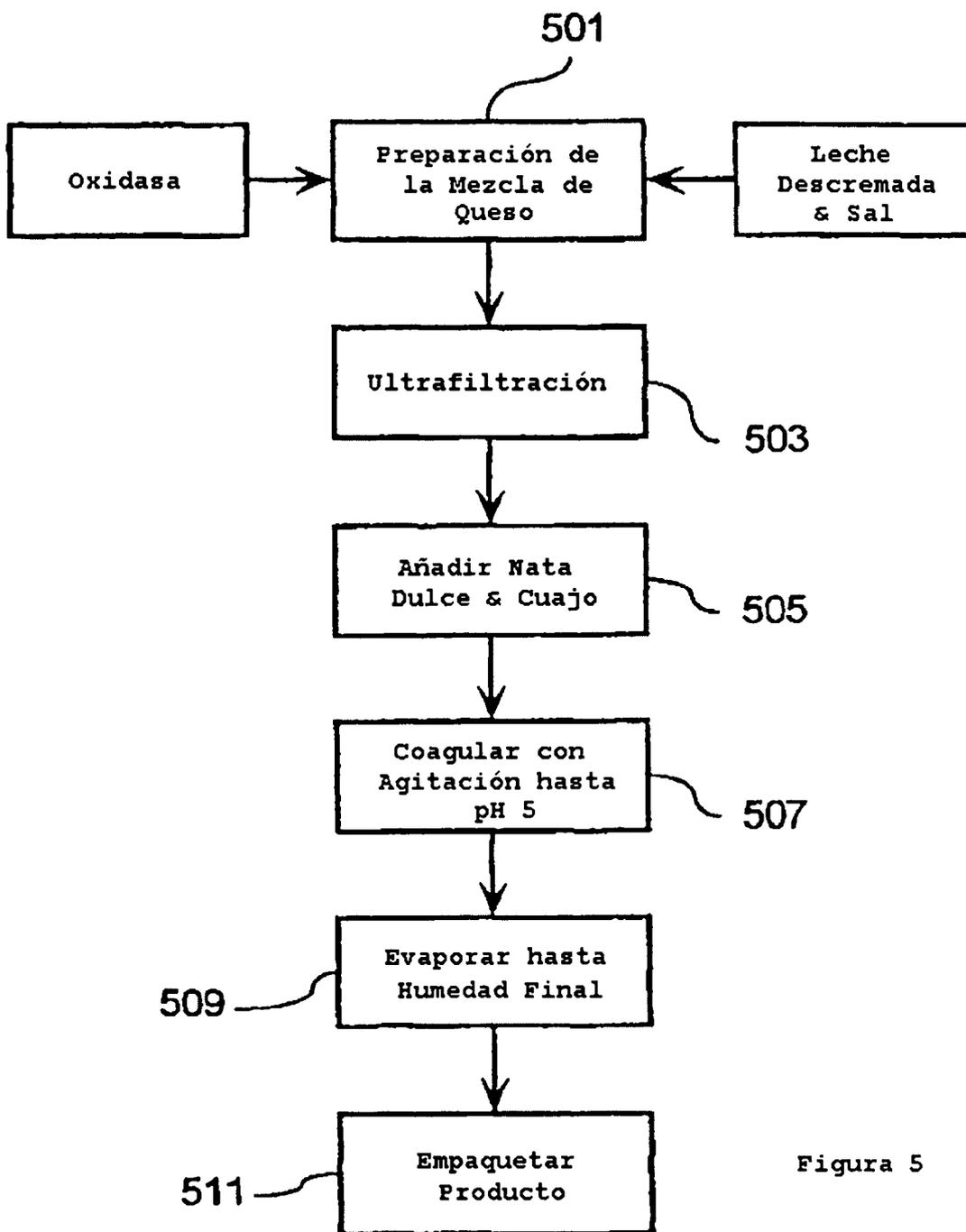


Figura 5

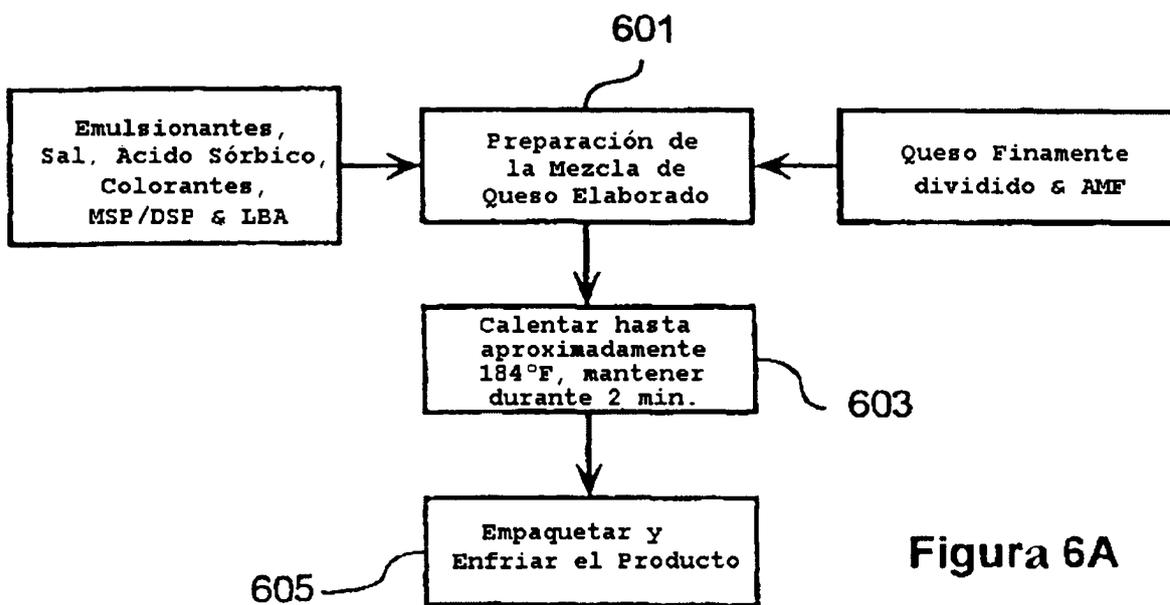


Figura 6A

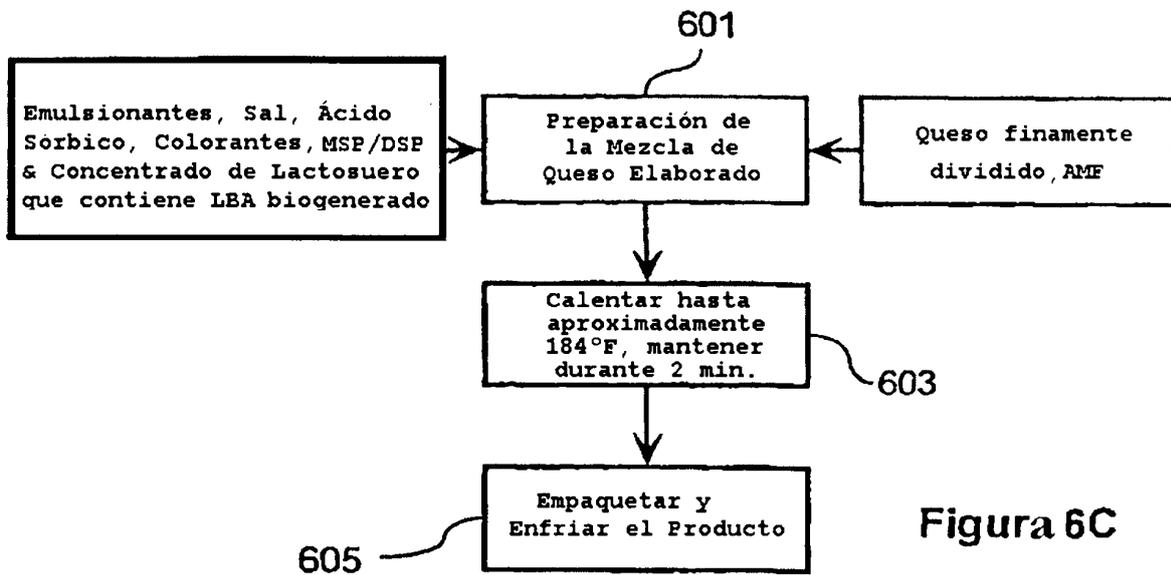
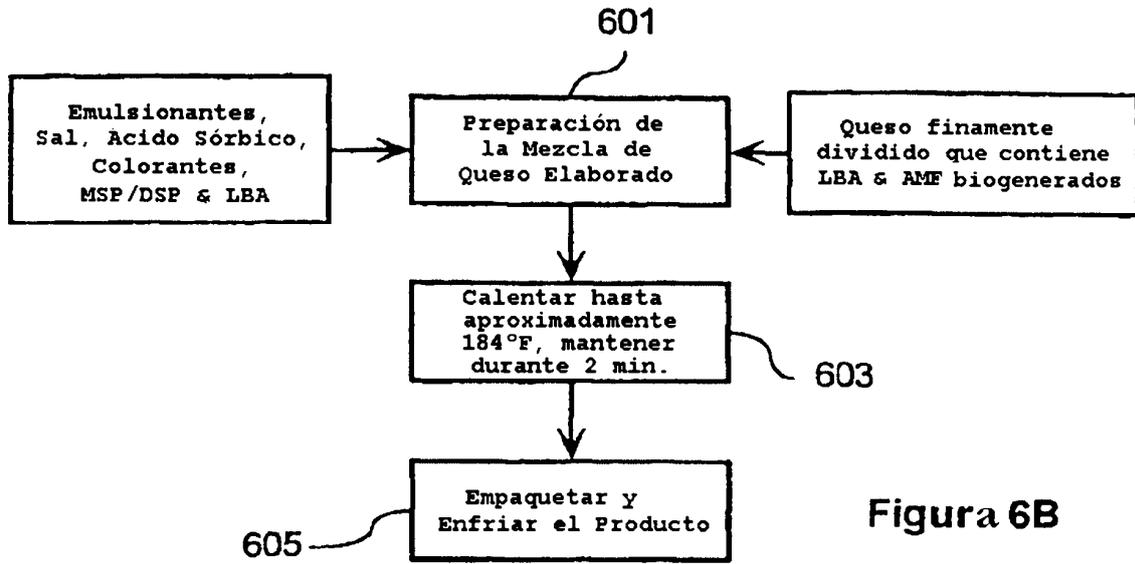
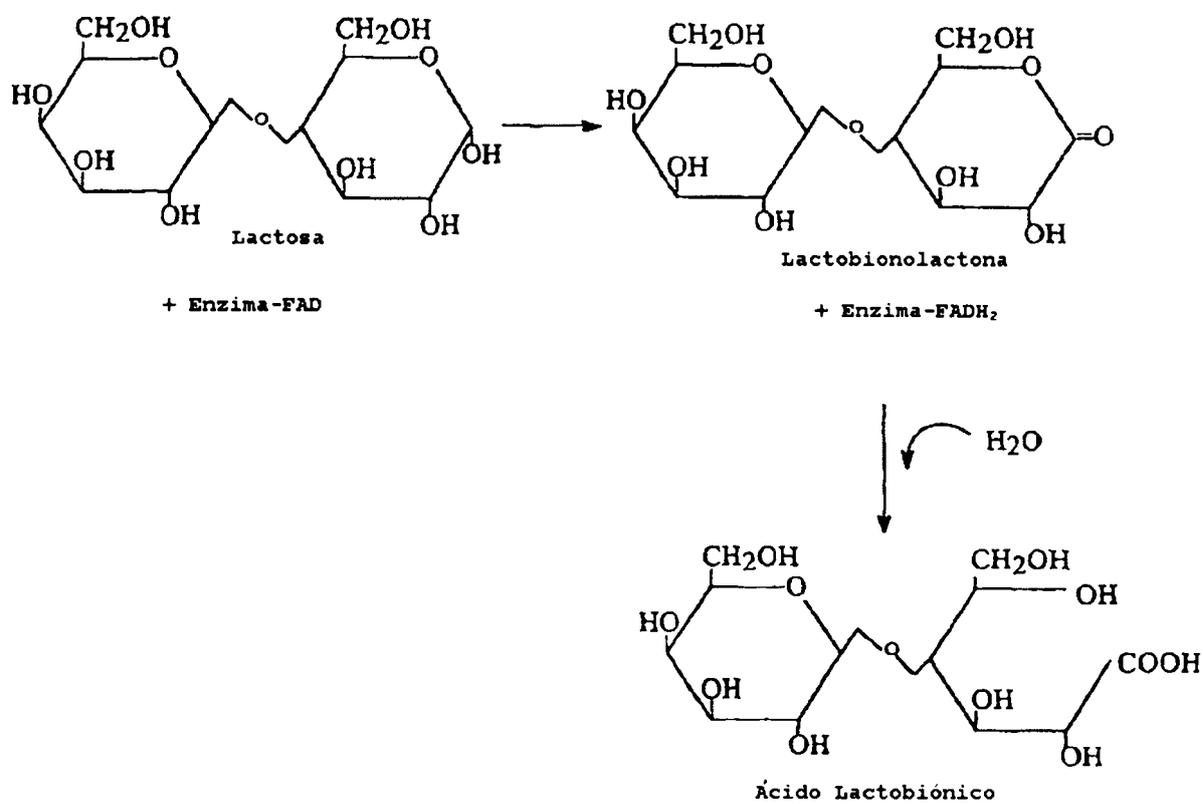
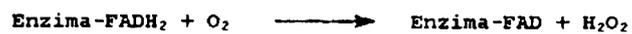


Figura 7



Regeneración de la enzima



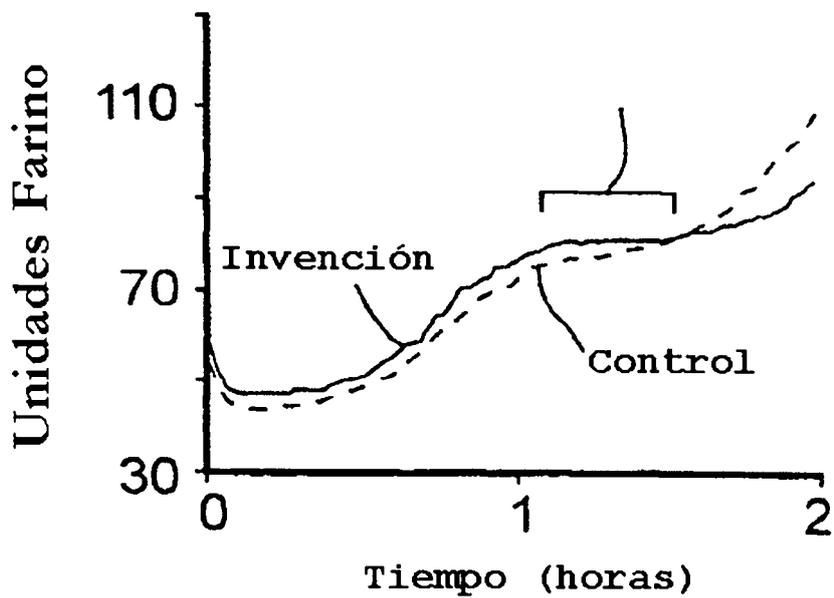


Figura 8

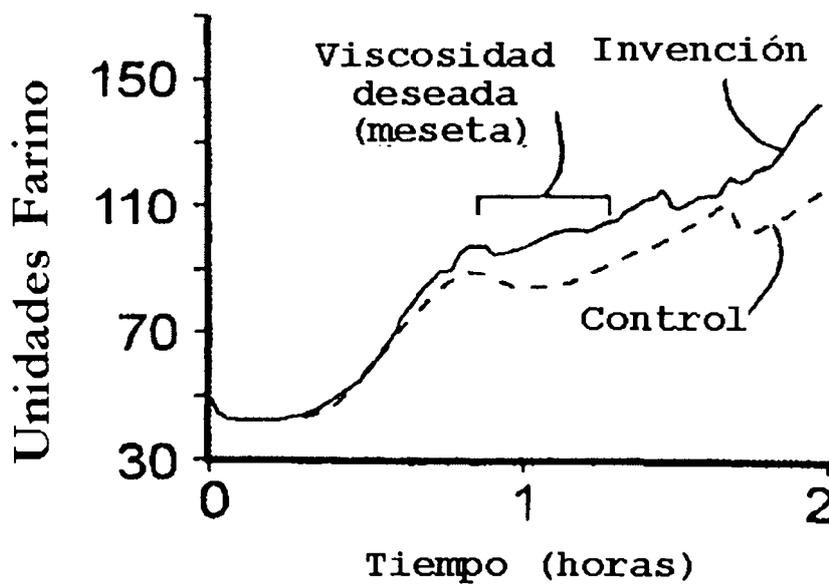


Figura 9