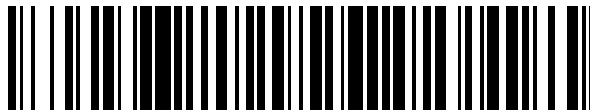


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 165**

51 Int. Cl.:

**A23C 9/127** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2008 PCT/EP2008/060150**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2009 WO09016257**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2008 E 08786770 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2175737**

54 Título: **Método para la producción de una bebida láctea acidificada**

30 Prioridad:

**02.08.2007 EP 07113688**

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

**05.07.2017**

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)  
Boege Allé 10-12  
2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

**TAMS, JEPPE, WEGENER;  
JOERGENSEN, CHRISTEL, THEA;  
ERNST, STEFFEN y  
NIELSEN, PER, MUNK,**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 622 165 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método para la producción de una bebida láctea acidificada

5 LISTADO DE SECUENCIAS

[0001] La presente invención comprende un listado de secuencias.

CAMPO TÉCNICO

10

[0002] La presente invención se refiere a un método para la producción de una bebida láctea acidificada que utiliza una enzima con actividad de transglutaminasa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

[0003] El mercado de las bebidas lácteas acidificadas, que incluye bebidas lácteas fermentadas y yogur líquido, está aumentando a nivel mundial y existe un interés en mejorar la calidad y economía de este producto.

20

[0004] Las bebidas lácteas acidificadas se producen generalmente mediante la mezcla de leche acidificada con una solución de jarabe, y sometiendo la mezcla a un tratamiento de homogeneización. La acidificación puede producirse a través de la adición de una sustancia química, tal como glucono-delta-lactona (GDL), o puede ser provocada por la fermentación de la leche con bacterias del ácido láctico. Sin embargo, cuando tales productos se almacenan, la caseína, un ingrediente de la leche, frecuentemente se precipita o se asocia y se agrega y, como resultado, las bebidas tienden separarse de modo que el suero de leche líquido se acumula en la superficie. Este proceso, al que normalmente se le denomina sinéresis, reduce la calidad de las bebidas lácteas acidificadas.

25

30

[0005] La pectina, el almidón, el almidón modificado, la CMC, etc., se usan frecuentemente como estabilizantes en las bebidas lácteas acidificadas pero, debido al coste relativamente alto de tales estabilizantes, existe un interés en encontrar soluciones diferentes y quizás aún mejores.

35

[0006] El uso de enzimas con actividad de transglutaminasa para la modificación de proteínas alimentarias, incluyendo proteínas de productos lácteos, se conoce en el estado de la técnica. Por ejemplo, JP2835940-B2 describe la fabricación de una bebida ácida que contiene proteína de la leche, y muestra que una bebida láctea que comprende leche desnatada en polvo disuelta tratada con transglutaminasa, seguida de una acidificación química, retiene una turbidez blanca opaca al ser sometida a esterilización térmica debido a una menor precipitación de proteína de la leche.

40

EP0671885 describe un método para la producción de un producto análogo lácteo que comprende un tratamiento con transglutaminasa seguido de acidificación. En este caso, se muestra que un producto análogo lácteo tratado con transglutaminasa donde la acidificación se realiza como una fermentación biológica muestra la consistencia de un yogur semisólido. Además, se muestra que un yogur reconstituido obtenido a partir de leche desnatada tratada con transglutaminasa tiene una consistencia más homogénea en comparación con un control no tratado.

45

[0007] Se sabe que el tratamiento con transglutaminasa durante la fabricación de productos lácteos fermentados aumenta la viscosidad del producto. WO2007/060288 demuestra que la adición de transglutaminasa durante la producción de productos lácteos fermentados tales como yogur permite la reducción del contenido de proteína del sustrato de leche para obtener igualmente un yogur con una alta viscosidad.

50

[0008] Lorenzen, P. C. et al. (2005): "Impact of enzymatic crosslinking of milk protein on the properties of stirred yogurt and stirred cultured milk products.", Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 57 (2) 97-115, han descrito la preparación de un producto lácteo fermentado que conlleva la adición de leche en polvo tratada con transglutaminasa o de producto proteínico de suero de leche a leche baja en grasa y la fermentación con un cultivo de leche agria.

55

[0009] En un proceso industrial para la fabricación de una bebida láctea fermentada, sería deseable concentrar el sustrato de leche antes de llevar a cabo la fermentación, y luego diluir el sustrato de leche fermentado en una etapa posterior en el proceso de fabricación para obtener una bebida láctea con el contenido deseado de sólidos de leche.

60

La concentración antes de la fermentación y la dilución posterior reduce el requisito de capacidad del tanque de fermentación, y por lo tanto, reduce los costes de fabricación. Sin embargo, el estado de la técnica enseña que el aumento del contenido de proteína en un sustrato de leche que se va a fermentar dará lugar a un producto fermentado con una viscosidad más alta (véase, por ejemplo, WO2007/060288), y el tratamiento con transglutaminasa aumentará aún más la viscosidad.

65

[0010] Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para la fabricación de una bebida láctea

fermentada estable, donde la sinéresis durante el almacenamiento es reducida.

También es un objeto proporcionar un método para la fabricación, a partir de un sustrato de leche concentrada, de una bebida láctea fermentada estable, que sea potable, es decir un líquido de flujo libre.

## 5 RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que una bebida láctea fermentada producida a partir de un sustrato de leche con un alto contenido de proteínas se puede estabilizar con transglutaminasa y seguir reteniendo la baja viscosidad que se desea para un producto que se va a consumir como bebida.

[0012] En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para la producción de una bebida láctea acidificada, dicho método que comprende:

- a) proporcionar un sustrato de leche con un contenido de proteínas superior al 5%;
- b) tratar el sustrato de leche con una enzima con actividad de transglutaminasa;
- c) fermentar el sustrato de leche con un microorganismo; y
- d) diluir el sustrato de leche fermentada al menos 1,5 veces para obtener la bebida láctea acidificada; donde la etapa b) se realiza antes, durante o después de la etapa c).

[0013] La bebida láctea acidificada producida mediante cualquier método de la presente invención es potable, es decir, apta para ser consumida como bebida.

[0014] En una forma de realización preferida, el sustrato de leche fermentada se mezcla con un jarabe y la mezcla se somete a homogeneización para obtener la bebida láctea acidificada.

[0015] En otra forma de realización preferida, el sustrato de leche se somete a pasteurización antes de la fermentación y el tratamiento con transglutaminasa se lleva a cabo antes de la pasteurización

[0016] En otra forma de realización preferida, el sustrato de leche se somete a un tratamiento térmico antes del tratamiento con transglutaminasa. Preferiblemente, tal tratamiento térmico tiene como resultado una desnaturalización de más del 50% de la proteína de suero de leche en el sustrato de leche.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### 35 Bebidas lácteas acidificadas

[0017] "Bebidas lácteas acidificadas" en el contexto de la presente invención incluye cualquier producto potable basado en sustratos de leche acidificada, incluyendo, por lo tanto, bebidas lácteas fermentadas y bebidas de yogur líquido. En los métodos de la presente invención, la acidificación se realiza como una fermentación con un microorganismo.

[0018] Las bebidas lácteas acidificadas en el contexto de la invención son potables en el sentido de que están en forma líquida y se consumen como bebidas, es decir, son adecuadas para ser bebidas en lugar de ser comidas con cuchara. "En forma líquida" significa que los productos están en el estado fluido de la materia, mostrando por lo tanto una disposición característica a fluir. De este modo, la forma de un líquido normalmente es determinada por el contenedor en el que se encuentra, a diferencia de, por ejemplo, una sustancia de tipo gel, que es blanda pero no fluye fácilmente, tal como, por ejemplo, un yogur o pudín. Las bebidas lácteas acidificadas en el contexto de la invención pueden tener una viscosidad que permita al consumidor beber los productos utilizando una pajita, si lo desea.

[0019] En un aspecto preferido, las bebidas lácteas acidificadas en el contexto de la invención tienen una viscosidad medida como tiempo de descarga a partir de una pipeta de 10 ml que es sustancialmente la misma que el tiempo de descarga de una bebida láctea acidificada producida sin transglutaminasa. En este contexto, un tiempo de descarga que es sustancialmente el mismo significa que es aumentado en menos de un 20%, preferiblemente aumentado en menos de un 15% y más preferiblemente aumentado en menos de un 10%.

[0020] Una bebida láctea acidificada en el contexto de la presente invención puede tener un pH inferior a 4.6, preferiblemente menos de 4.4, más preferiblemente menos de 4.2 e incluso más preferiblemente alrededor de pH 4 o menos. En un aspecto, la bebida láctea acidificada tiene un pH inferior a 3.8, por ejemplo inferior a 3.6.

[0021] Una bebida láctea acidificada en el contexto de la invención puede tener un contenido de grasa de 0 a 2%, preferiblemente inferior al 1,5%, inferior al 1% o inferior al 0,5%, más preferiblemente de aproximadamente 0,1% o menos. La bebida láctea acidificada puede tener un contenido de sólido de leche no graso inferior al 20%, preferiblemente inferior al 8,5%, inferior al 8%, inferior al 7,5%, inferior al 7%, inferior al 6,5% o inferior al 6%, y más preferiblemente de aproximadamente 5%.

[0022] Una bebida láctea acidificada en el contexto de la invención puede tener un contenido de proteína de entre 0,5 y 4%. En un aspecto preferido, la bebida láctea acidificada tiene un contenido de proteína inferior al 1%. En otro aspecto preferido, la bebida láctea acidificada tiene un contenido de proteína de entre 2% y 3%.

5

[0023] Una bebida láctea acidificada en el contexto de la invención puede tener una vida útil de más de 7 días, preferiblemente más de 14 días, más preferiblemente más de 28 días, como por ejemplo más de 3 meses.

[0024] Una bebida láctea acidificada en el contexto de la presente invención tiene una estabilidad aumentada. La estabilidad se puede determinar después de haber almacenado la bebida láctea acidificada durante un número apropiado de días mediante la medición de la altura del suero de leche acumulado en la superficie debido a la sinéresis. También se puede determinar después de sinéresis acelerada, tal como por centrifugación.

10

Método para producir una bebida láctea acidificada

15

[0025] Como se ha mencionado anteriormente, el método para la producción de una bebida láctea acidificada según la presente invención comprende:

20

- a) proporcionar un sustrato de leche con un contenido de proteína superior al 5%;
  - b) tratar el sustrato de leche con una enzima con actividad de transglutaminasa;
  - c) fermentar el sustrato de leche con un microorganismo; y
  - d) diluir el sustrato de leche fermentada al menos 1,5 veces para obtener la bebida láctea acidificada;
- donde la etapa b) se realiza antes, durante o después de la etapa c).

25

[0026] "Sustrato de leche", en el contexto de la presente invención, puede ser cualquier material lácteo crudo y/o procesado que se pueda someter a acidificación según el método de la invención.

30

Así, los sustratos de leche útiles incluyen, pero de forma no limitativa, soluciones/suspensiones de cualquier producto lácteo o análogo lácteo que comprenda proteína, tal como leche de grasa entera o baja en grasa, leche desnatada, suero de mantequilla, leche en polvo reconstituida, leche condensada, leche deshidratada, suero de leche, permeato de suero de leche, lactosa, líquido madre de cristalización de lactosa, concentrado de proteína de suero de leche, o nata. Obviamente, el sustrato de leche puede proceder de cualquier mamífero.

35

[0027] El sustrato de leche es más concentrado que la leche cruda, es decir, el contenido de proteína es superior que en la leche cruda.

El contenido de proteína es de más del 5%, preferiblemente más del 6%, por ejemplo más del 7%, más preferiblemente más del 8%, por ejemplo más del 9% o más del 10%.

Preferiblemente, el contenido de lactosa también es superior que en la leche cruda, por ejemplo de más del 7%, más del 8%, más del 9%, más del 10%, más del 11% o más del 12%.

En una forma de realización preferida de este aspecto, el sustrato de leche es una solución acuosa concentrada de leche desnatada en polvo con un contenido de proteína superior al 5% y un contenido de lactosa superior al 7%.

40

[0028] En el contexto de la presente invención, los porcentajes que definen el contenido del sustrato de leche o el contenido de la bebida láctea acidificada son porcentajes de masa, es decir la masa de una sustancia (por ejemplo, proteína o lactosa) como un porcentaje de la masa de la solución entera (sustrato de leche o bebida láctea acidificada). De este modo, en un sustrato de leche con un contenido de proteína superior al 5%, la masa de las proteínas constituye más del 5% de la masa del sustrato de leche.

45

[0029] Preferiblemente, al menos parte de la proteína presente en el sustrato de leche son proteínas presentes de manera natural en la leche, tales como la caseína o la proteína de suero de leche.

50

Sin embargo, parte de la proteína pueden ser proteínas que no están presentes de manera natural en la leche.

[0030] El término "leche" debe ser entendido como la secreción láctea obtenida mediante el ordeño de cualquier mamífero, tal como vacas, ovejas, cabras, búfalos o camellos. En una forma de realización preferida, la leche es leche de vaca.

55

[0031] Antes de la fermentación, el sustrato de leche se puede homogeneizar y pasteurizar según métodos conocidos en el estado de la técnica.

60

[0032] La "homogenización" como se utiliza en este caso significa una mezcla intensiva para obtener una suspensión o emulsión soluble. Si la homogeneización se realiza antes de la fermentación, se puede realizar para dividir la grasa láctea en tamaños menores de modo que ya no se separe de la leche. Esto se puede lograr haciendo pasar la leche a alta presión por pequeños orificios

65

[0033] "Pasteurizar", como se utiliza en este caso, significa el tratamiento del sustrato de leche para reducir o eliminar la presencia de organismos vivos, tales como microorganismos. Preferiblemente, la pasteurización se realiza manteniendo una temperatura específica durante un periodo de tiempo específico. La temperatura

específica normalmente se logra por calentamiento. La temperatura y duración se pueden seleccionar para matar o inactivar ciertas bacterias, tales como bacterias nocivas. Una etapa de enfriamiento rápido se puede realizar a continuación.

5 [0034] En los métodos de la presente invención, el sustrato de leche se acidifica mediante fermentación con un microorganismo. Opcionalmente, tal acidificación por fermentación se combina con acidificación química del sustrato de leche.

10 [0035] "Fermentación" en los métodos de la presente invención significa la conversión de carbohidratos en alcoholes o ácidos a través de la acción de un microorganismo. Preferiblemente, la fermentación en los métodos de la invención comprende la conversión de lactosa en ácido láctico.

[0036] En el contexto de la presente invención, "microorganismo" puede incluir cualquier bacteria u hongo capaz de fermentar el sustrato de leche.

15 [0037] Los microorganismos usados para la mayoría de productos lácteos fermentados se seleccionan del grupo de bacterias generalmente denominadas bacterias del ácido láctico. Como se utiliza en este caso, el término "bacteria de ácido láctico" designa una bacteria grampositiva microaerófila o anaeróbica, que fermenta azúcares con la producción de ácidos incluyendo ácido láctico como el ácido predominantemente producido, ácido acético y ácido propiónico. Las bacterias del ácido láctico más útiles industrialmente se encuentran en el orden "Lactobacillales" que incluye *Lactococcus*, spp. *Streptococcus*, spp. *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus*, spp. *Brevibacterium*, spp. *Enterococcus* spp. y *Propionibacterium* spp. Adicionalmente, las bacterias productoras de ácido láctico que pertenecen al grupo de las bacterias anaeróbicas estrictas, bifidobacteria, por ejemplo *Bifidobacterium* spp., generalmente están incluidas en el grupo de las bacterias del ácido láctico. Éstas se usan frecuentemente como cultivos alimenticios solos o en combinación con otras bacterias del ácido láctico,

20 [0038] Las bacterias del ácido láctico normalmente se suministran a la industria láctea o bien como cultivos congelados o liofilizados para la propagación de iniciadores o como los cultivos denominados "Direct Vat Set" (SVD), destinados a la inoculación directa en un depósito o cuba de fermentación para la producción de un producto lácteo, tal como una bebida láctea acidificada. Tales cultivos en general se denominan "cultivos iniciadores" o "iniciadores".

35 [0039] Las cepas de cultivo iniciador de bacterias del ácido láctico usadas comúnmente se dividen generalmente en organismos mesofílicos, que tienen temperaturas de crecimiento óptimo en alrededor de 30°C, y organismos termofílicos, que tienen temperaturas de crecimiento óptimo en el rango de aproximadamente 40 a aproximadamente 45°C. Los organismos típicos que pertenecen al grupo mesofílico incluyen *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Las especies bacterianas de ácido láctico termofílico incluyen como ejemplos *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *acidophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.

45 [0040] Las bacterias anaeróbicas estrictas que pertenecen al género *Bifidobacterium*, incluyendo *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum*, también se usan comúnmente como cultivos iniciadores lácteos y generalmente se incluyen en el grupo de las bacterias del ácido láctico. Adicionalmente, especies de *Propionibacteria* se usan como cultivos lácteos iniciadores, en particular en la producción de queso. Adicionalmente, organismos pertenecientes al género *Brevibacterium* se usan comúnmente como cultivos iniciadores alimenticios.

50 [0041] Otro grupo de cultivos iniciadores microbianos son los cultivos fúngicos, incluyendo cultivos de levadura y cultivos de hongos filamentosos, que se usan particularmente en la producción de ciertos tipos de queso y bebida.

55 Los ejemplos de hongos incluyen *Penicillium roqueforti*, *Penicillium candidum*, *Geotrichum candidum*, *Torula kefir*, *Saccharomyces kefir* y *Saccharomyces cerevisiae*.

60 [0042] En una forma de realización preferida, el microorganismo usado para la fermentación del sustrato de leche es *Lactobacillus casei* o una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

[0043] Opcionalmente, el sustrato de leche fermentada se puede someter a tratamiento térmico para inactivar el microorganismo.

65 [0044] Los procesos de fermentación para ser usados en la producción de bebidas lácteas acidificadas son ampliamente conocidos y el experto en la técnica sabrá cómo seleccionar condiciones adecuadas del proceso,

tales como temperatura, oxígeno, cantidad y características del/de los microorganismo(s) y tiempo del proceso. Obviamente, las condiciones de fermentación se seleccionan para contribuir al logro de la presente invención, es decir, para obtener un producto de leche fermentada adecuado en la producción de una bebida láctea acidificada.

5

[0045] Asimismo, la persona experta conocerá si, y cuando, los aditivos tales como, por ejemplo, carbohidratos, aromas, minerales, enzimas (por ejemplo cuajo, lactasa y/o fosfolipasa) se deben usar en la producción de bebidas lácteas acidificadas según la invención.

10

[0046] El sustrato de leche fermentada se diluye para obtener la bebida láctea acidificada. El sustrato de leche fermentada se diluye al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, al menos 2,5 veces o al menos 3 veces. Se puede diluir con agua o una solución acuosa de cualquier tipo. "Se diluye al menos 1,5 veces" en el contexto de la presente invención significa que el sustrato de leche fermentada se diluye de modo que su volumen aumenta en al menos un 50 %.

15

[0047] En una forma de realización, se añade un jarabe al sustrato de leche fermentada.

[0048] "Jarabe" en el contexto de la presente invención es cualquier ingrediente aditivo adicional que aporta sabor y/o dulzor al producto final, es decir, la bebida láctea acidificada.

20

Puede ser una solución que comprende, por ejemplo, azúcar, sacarosa, glucosa, azúcar líquido de fructosa, aspartamo, alcohol de azúcar, concentrado de fruta, zumo de naranja, zumo de fresa y/o zumo de limón.

25

[0049] La mezcla del sustrato de leche fermentada y el jarabe se puede homogeneizar utilizando cualquier método conocido en la técnica. La homogeneización se puede realizar para obtener una solución homogénea líquida que es fluida y estable. La homogeneización de la mezcla del sustrato de leche acidificada y el jarabe se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica, como por ejemplo haciendo pasar la leche a alta presión a través de pequeños orificios.

30

[0050] En otra forma de realización, se añade agua al sustrato de leche fermentada, y la mezcla de sustrato de leche fermentada y agua se homogeneiza.

35

[0051] Los métodos de la presente invención comprenden el tratamiento del sustrato de leche con una enzima con actividad de transglutaminasa. El tratamiento enzimático se puede realizar antes de la fermentación, por ejemplo antes de la inoculación con el microorganismo. El tratamiento enzimático se puede realizar a la vez que la fermentación. En una forma de realización, la enzima se añade antes, durante o después de la inoculación del sustrato de leche con un microorganismo, y la reacción enzimática en el sustrato de leche tiene lugar esencialmente a la vez que la fermentación.

40

[0052] Alternativamente, el tratamiento enzimático se puede realizar después de la fermentación. Si el sustrato de leche acidificada se mezcla y opcionalmente se homogeneiza con el jarabe, el tratamiento enzimático se puede realizar antes o después de esto. La enzima se puede añadir al mismo tiempo o después que el jarabe, pero antes de la homogeneización, o se puede añadir después de que el sustrato de leche acidificada y el jarabe se hayan mezclado y homogeneizado.

45

[0053] En una forma de realización preferida, el tratamiento enzimático se realiza antes o durante la fermentación.

En una forma de realización más preferida, el sustrato de leche se somete a pasteurización antes de la fermentación, y el tratamiento enzimático se realiza antes de la pasteurización. La pasteurización puede así inactivar la enzima.

50

[0054] En otra forma de realización preferida, el sustrato de leche se somete a tratamiento térmico, tal como pasteurización, antes del tratamiento con transglutaminasa.

El tratamiento térmico se puede realizar de modo que más del 50%, preferiblemente más del 60%, más del 70% o más del 80%, de la proteína de suero de leche en el sustrato de leche se desnaturaliza.

55

En el contexto de la presente invención, la proteína de suero de leche se desnaturaliza cuando sedimenta a pH 4.5.

En una forma de realización más preferida, el sustrato de leche se somete a tratamiento térmico seguido de homogenización antes del tratamiento con transglutaminasa.

60

[0055] En otra forma de realización preferida, se añade extracto de levadura o un agente reductor tal como glutatión al sustrato de leche antes del tratamiento con transglutaminasa.

65

[0056] Otro tratamiento térmico, tal como una pasteurización, se puede realizar después del tratamiento enzimático para inactivar la enzima.

[0057] La enzima con actividad de transglutaminasa se añade en una cantidad adecuada para conseguir el grado

deseado de modificación de las proteínas bajo las condiciones de reacción elegidas. La enzima se puede añadir a una concentración de entre 0,0001 y 1 g/L de sustrato de leche, preferiblemente entre 0,001 y 0,1 g/L de sustrato de leche.

5 [0058] El tratamiento enzimático en los métodos de la invención se puede llevar a cabo añadiendo la enzima al sustrato de leche y permitiendo que la reacción enzimática se produzca en un tiempo de retención apropiado a una temperatura apropiada. El tratamiento enzimático se puede realizar bajo condiciones elegidas para adaptarlo a la enzima modificadora de proteínas seleccionada según principios ampliamente conocidos en la técnica. El tratamiento también se puede llevar a cabo poniendo en contacto el sustrato de leche con una enzima que ha  
10 sido inmovilizada.

[0059] El tratamiento enzimático se puede llevar a cabo a cualquier pH adecuado, tal como, por ejemplo, en el rango de pH 2-10, por ejemplo a un pH de 4-9 o 5-7. Puede ser preferible dejar que la enzima actúe al pH natural del sustrato de leche, o, si la acidificación se obtiene debido a la fermentación, la enzima puede actuar al pH natural del sustrato de leche durante el proceso de la fermentación, es decir el pH disminuirá gradualmente desde el pH natural del sustrato de leche no fermentada hasta el pH del sustrato de leche fermentada.  
15

[0060] El tratamiento enzimático se puede llevar a cabo a cualquier temperatura apropiada, por ejemplo en el rango de 1-80°C, por ejemplo 2-70°C. En una forma de realización de la presente invención, el tratamiento enzimático puede ser llevado a cabo preferiblemente a una temperatura en el rango de 40-50°C. En otra forma de realización, el tratamiento enzimático puede ser llevado a cabo preferiblemente a una temperatura de por debajo de 10°C.  
20

[0061] Opcionalmente, después de que se haya dejado a la enzima actuar en el sustrato de leche, la proteína enzimática se puede eliminar, reducir y/o inactivar mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica, tal como por tratamiento térmico y/o reducción de pH.  
25

[0062] Opcionalmente, se pueden añadir otros ingredientes a la bebida láctea acidificada, tales como color; estabilizantes, por ejemplo pectina, almidón, almidón modificado, CMC, etc.; o ácidos grasos poliinsaturados, por ejemplo ácidos grasos omega-3. Tales ingredientes se pueden añadir en cualquier momento durante el proceso de producción, es decir, antes o después de la fermentación, antes o después del tratamiento enzimático, y antes o después de la adición opcional de jarabe. En una forma de realización preferida, el tratamiento con transglutaminasa se combina con la adición de CMC.  
30  
35

[0063] En un aspecto de la presente invención, el nivel de oxígeno disuelto del sustrato de leche se reduce a menos del 80% del nivel de saturación. Preferiblemente, el nivel de oxígeno disuelto se reduce a menos del 70%, más preferiblemente a menos del 60% e incluso más preferiblemente a menos del 50% del nivel de saturación.  
40

[0064] La concentración de oxígeno disuelto en el sustrato de leche es la cantidad de oxígeno hallada en la solución. Se puede medir en miligramos por litro de sustrato (mg/l) o una unidad equivalente, partes por millón de oxígeno a agua (ppm). Depende de varios factores, tales como la temperatura, la presión y las cantidades de varios sólidos disueltos o suspendidos en el sustrato de leche. Se puede medir con una sonda de oxígeno disuelto tal como un sensor de oxígeno.  
45

[0065] El nivel de oxígeno disuelto es una medida relativa de la cantidad de oxígeno que está disuelto en el sustrato o llevado por éste. Se calcula como el porcentaje de concentración de oxígeno disuelto en el sustrato de leche con respecto al de cuando el sustrato de leche está saturado completamente a la misma temperatura y a la misma presión.  
50

[0066] El porcentaje de saturación se calcula mediante la división de la concentración de oxígeno disuelto medido entre el nivel de saturación bajo las mismas condiciones y multiplicándolo por 100.  
55

[0067] El nivel de oxígeno disuelto del sustrato de leche se puede reducir mediante cualquier método conocido en la técnica. Se puede reducir por inyección de nitrógeno o por inyección de dióxido de carbono o utilizando una enzima secuestrante de oxígeno, preferiblemente una oxidorreductasa, tal como una carbohidrato oxidasa, una celobiosa oxidasa, una glucosa oxidasa, una hexosa oxidasa o una lactosa oxidasa. Una enzima con actividad de catalasa se puede añadir con la oxidorreductasa.  
60

[0068] El nivel de oxígeno disuelto del sustrato de leche se puede reducir antes o al mismo tiempo que el tratamiento con la transglutaminasa. Se puede reducir antes o a la vez que la fermentación. Y si el sustrato de leche se pasteuriza, el nivel de oxígeno disuelto se puede reducir antes o después de la pasteurización.  
65

Enzima con actividad de transglutaminasa

[0069] En los métodos de la presente invención, una enzima con actividad de transglutaminasa se usa en la producción de bebidas lácteas acidificadas, disminuyendo así la sinéresis durante el almacenamiento.

5 [0070] En el contexto de la presente invención, una enzima con actividad de transglutaminasa puede ser una enzima que cataliza la transferencia de acilo entre el grupo gamma-carboxilamida de glutamina unida a un péptido (donador de acilo) y aminas primarias (aceptor de acilo), por ejemplo lisina unida a un péptido. Las amidas de ácidos y los aminoácidos libres también reaccionan. Las proteínas y péptidos pueden reticularse de esta manera. La transglutaminasa también puede, por ejemplo, si las aminas están ausentes, catalizar la desaminación de residuos de glutamina en proteínas con H<sub>2</sub>O como el aceptor de acilo.

10 [0071] A una transglutaminasa según la invención también se puede hacer referencia como, por ejemplo, proteína glutamina-gamma-glutamil transferasa, Factor XIIIa, fibrinólisis, factor estabilizante de fibrina, glutaminil-péptido gamma-glutamiltransferasa, transglutaminasa de poliamina, transglutaminasa tisular, o R-glutaminil-péptido:amina gamma glutamil transferasa. El grupo de las transglutaminasas comprende pero no se limita a las enzimas asignadas a la subclase EC 2.3.2.13. En el contexto de la presente invención, también se puede hacer referencia a la transglutaminasa como TGasa.

15 [0072] Una transglutaminasa para ser usada según la invención preferiblemente es purificada. El término "purificado" como se utiliza en este caso cubre preparaciones de proteína enzimática donde la preparación se ha enriquecido para la proteína enzimática en cuestión. Dicho enriquecimiento podría ser, por ejemplo: la eliminación de las células del organismo de las que se ha producido una proteína enzimática, la eliminación de material no proteínico por la precipitación de una proteína específica o el uso de un procedimiento cromatográfico donde la proteína enzimática en cuestión es selectivamente adsorbida y eluída a partir de una matriz cromatográfica.

20 La transglutaminasa se puede purificar hasta un punto en el que sólo están presentes cantidades mínimas de otras proteínas. La expresión "otras proteínas" refiere en particular a otras enzimas.

25 Una transglutaminasa para ser usada en el método de la invención puede ser "sustancialmente pura", es decir, sustancialmente libre de otros componentes del organismo donde se ha producido, que pueden ser o bien un microorganismo de origen natural o bien un microorganismo huésped modificado genéticamente para la producción recombinante de la transglutaminasa.

30 [0073] Sin embargo, para los usos según la invención, la transglutaminasa no necesita ser tan pura. Puede, por ejemplo, incluir otras enzimas.

35 [0074] En un aspecto preferido, la transglutaminasa para usar en el método de la invención ha sido purificada para contener al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, al menos 40% o al menos 50%, (p/p) de transglutaminasa respecto a la proteína total. La cantidad de transglutaminasa se puede calcular a partir de una medición de actividad de la preparación dividida entre la actividad específica de la transglutaminasa (actividad/mg de PE), o se puede cuantificar por SDS-PAGE o cualquier otro método conocido en la técnica. La cantidad de proteína total puede, por ejemplo, ser medida por medio de análisis de aminoácidos.

40 [0075] En una forma de realización de los métodos de la invención, la enzima con actividad de transglutaminasa se produce de manera recombinante.

45 [0076] En algunos aspectos de la presente invención, la enzima con actividad de transglutaminasa puede ser de origen animal, vegetal o microbiano.

50 Las enzimas preferidas se obtienen de fuentes microbianas, en particular de un hongo filamentoso o levadura, o a partir de una bacteria. Para los fines de la presente invención, el término "se obtiene(n) de" como se utiliza en el presente documento en relación con una fuente dada significará que la enzima se origina a partir de la fuente.

La enzima se puede producir a partir de la fuente o a partir de una cepa en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima ha sido insertada, es decir, una cepa recombinante. En una forma de realización preferida, el polipéptido obtenido a partir de una fuente dada se secreta extracelularmente.

55 [0077] La enzima puede, por ejemplo, obtenerse a partir de una cepa de *Agaricus*, por ejemplo *A. Bisporus*; *Ascovaginospora*; *Aspergillus*, por ejemplo *A. Niger*, *A. Awamori*, *A. Foetidus*, *A., japonicus* *A. Oryzae*; *Chaetomium*; *Chaetotomastia*; *Dictyostelium*, por ejemplo *D. Discoideum*; *Mucor*, por ejemplo *M. Javanicus*, *M. Mucedo*, *M. Subtilissimus*; *Neurospora*, por ejemplo *N. Crassa*; *Rhizomucor*, por ejemplo *R. pusillus*; *Rhizopus*, por ejemplo *R. arrhizus*, *R., japonicus* *R. stolonifer* *Sclerotinia*, por ejemplo *S. libertiana*; *Trichophyton*, por ejemplo *T. rubrum*; *Whetzelinia*, por ejemplo *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, por ejemplo *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis*; *Chryseobacterium*; *Citrobacter*, por ejemplo *C. freundii*; *Enterobacter*, por ejemplo *E. aerogenes*, *E. cloacae* *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, por ejemplo *E. herbicola*; *Escherichia*, por ejemplo *E. Coli*; *Klebsiella*, por ejemplo *K. pneumoniae*; *Miriococcum*; *Myrothesium*; *Mucor*; *Neurospora*, por ejemplo *N. crassa*; *Phytophthora*, por ejemplo *P. Cactorum*; *Proteus*, por ejemplo *P. vulgaris*; *Providencia*, por ejemplo *P. stuartii*; *Pycnoporus*, por ejemplo *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus sanguineus*; *Salmonella*, por ejemplo *S. typhimurium*; *Serratia*, por ejemplo *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, por



ejemplo *S. flexneri*; *Streptomyces*, por ejemplo *S. antibioticus*, *S. castaneoglobisporus*, *S. lydicus*, *S. mobaraensis*, *S. violeceoruber* *Streptoverticillium*, por ejemplo *S. mobaraensis*; *Trametes*; *Trichoderma*, por ejemplo *T. reesei*, *T. viride*; *Yersinia*, por ejemplo *Y. enterocolitica*.

5 [0078] En una forma de realización preferida, la enzima es una transglutaminasa obtenida a partir de una bacteria, por ejemplo un Actinobacterium de la clase Actinobacteria, como por ejemplo de la subclase Actinobacteridae, como por ejemplo del orden Actinomycetales de orden, como por ejemplo del suborden Streptomycineae, como por ejemplo de la familia Streptomycetaceae, como por ejemplo de una cepa de Streptomyces, como por ejemplo *S. lydicus* o *S. mobaraensis*.

10 [0079] En otra forma de realización, la enzima es una transglutaminasa obtenida a partir de un hongo, por ejemplo de la clase *Oomycetes*, como por ejemplo del orden *Peronosporales*, como por ejemplo de la familia *Pythiaceae*, como por ejemplo del género *Pythium* o *Phytophthora*, como por ejemplo de una cepa de *Phytophthora cactorum*.

15 Una enzima preferida en esta forma de realización es una transglutaminasa con una secuencia que es al menos 50%, por ejemplo al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 3 o a un fragmento activo de transglutaminasa de la misma.

20 [0080] Para todos los aspectos de la presente invención, una enzima preferida es una transglutaminasa con una secuencia que es al menos 50%, por ejemplo al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 1 o a un fragmento activo de transglutaminasa de la misma.

Otra enzima preferida es una transglutaminasa con una secuencia que es al menos 50%, por ejemplo al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 2 o a un fragmento activo de transglutaminasa de la misma.

25 [0081] Según la presente invención, la actividad de transglutaminasa se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como por incubación de la enzima con un grupo gamma-carboxamida de glutamina unida a una proteína o unida a un péptido y un grupo amina, por ejemplo proteína o lisina unida a un péptido, en un tampón a varios pH y temperaturas, por ejemplo 50 mM de MES a pH 6.5 a 37°C durante 30 minutos.

30 La detección de actividad enzimática puede ir seguida de la liberación de amoníaco (por ejemplo, kit obtenido de Roche NH3-11877984) o de la utilización de hidroxilamina como donador de grupo amina (la cantidad de ácido glutámico gamma-hidroxamato formada en la reacción se detecta como un complejo rojo con iones férricos bajo condiciones ácidas medidas a 510 nm) o por determinación de la epsilon-(gamma-glutamil)lisina por análisis de aminoácidos.

## EJEMPLO 1

40 *Preparación de muestras de bebida láctea acidificada y medición de la sinéresis*

### Solución de SKMP (solución de leche desnatada en polvo)

45 [0082] 600 ml de agua + 135 g de leche desnatada en polvo (dispersabilidad instantánea de Kerry, Irlanda) se incubaron a 50°C durante 10 min antes del uso, y de este modo se obtuvo una solución homogénea.

### Solución de azúcar

[0083]

50 33 g de sacarosa  
105 g de glucosa

[0084] Estos azúcares se añadieron a 460 ml 20 mM de tampón de ácido láctico, pH 4.0 y se incubaron a 90°C durante 5 min con agitación y luego se enfriaron hasta 5°C.

### 55 Solución de azúcar con pectina

[0085]

60 33 g de sacarosa  
2,25 g de pectina (Geno pectin YM-115-I de CP Kelco)  
105 g de glucosa

[0086] Estos azúcares se añadieron a 460 ml 20 mM de tampón de ácido láctico, pH 4.0 y se incubaron a 90°C durante 5 min con agitación y luego se enfriaron hasta 5°C.

### 65 Enzima

## ES 2 622 165 T3

[0087] Activa TG (transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis* de Ajinomoto, Japón), 1620 TGHU/g, se diluyó para proporcionar las concentraciones finales indicadas en las tablas. (TGHU = unidades TransGlutaminasa Hidroxamato).

### 5 Procedimiento

[0088] 25 ml de solución de SKMP se transfirieron a un tubo graduado de 100 ml. 2 ml de enzima o agua (control) se añadieron y se llevó a cabo una incubación durante 120 min a 50°C.

10 [0089] La solución se incubó a 85°C durante 30 min al baño maría y después se incubó a 43°C (baño maría) durante 10 min con agitación magnética. 3 ml 4 U/l de YF-3331 (cultivo de cepas mixto que contiene *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *Bulgaricus* de Chr. Hansen A/S, Dinamarca) se añadieron y se llevó a cabo una incubación durante 16 horas a 43°C.

15 [0090] Después, las muestras se incubaron en un baño de hielo/agua a 0-5°C durante 20 min. 60 ml de solución de azúcar con o sin pectina (0-5°C, baño de hielo) se añadieron y homogeneizaron con ultrasonido (7 x 5 seg con pausa de 9 seg) en baño de hielo.

[0091] Las muestras se pusieron a 5°C durante 4 días y se midió la sinéresis.

20

[0092] Se midió la altura de la sinéresis y se calculó la sinéresis relativa de la altura total de la bebida láctea.

#### Mediciones de la sinéresis

	Sinéresis (% de altura total)
	%
1800 TGHU/l	1,4
1800 TGHU/l	1,8
450 TGHU/l	0,8
450 TGHU/l	1,6
180 TGHU/l	4,9
180 TGHU/l	4,5
sin TGasa	5,9
sin TGasa	6,2
sin TGasa + pectina	0,0
sin TGasa + pectina	0,0

25

### **EJEMPLO 2**

#### *Medición de la viscosidad de preparaciones de bebida láctea acidificada*

30 [0093] La viscosidad de la preparación de bebida láctea acidificada del Ejemplo 1 se midió, en seg, como el tiempo de descarga de una pipeta de 10 ml.

#### Mediciones de viscosidad:

	promedio de tres mediciones	desv. est.
	seg	seg
1800 TGHU/l	9,16	0,04
1800 TGHU/l	9,04	0,04
450 TGHU/l	8,82	0,40
450 TGHU/l	8,86	0,21
180 TGHU/l	8,52	0,02
180 TGHU/l	8,61	0,38
sin TGasa	8,34	0,21
sin TGasa + pectina	9,46	0,10
sin TGasa + pectina	9,30	0,12

35

### **EJEMPLO 3**

#### *El efecto de la eliminación de oxígeno durante el tratamiento con transglutaminasa*

### 40 Solución SKMP

[0094] 600 ml de agua + 135 g de leche desnatada en polvo (dispersabilidad instantánea de Kerry, Irlanda) se

incubaron a 50°C durante 10 min antes del uso, y de este modo se obtuvo una solución homogénea.

Solución de azúcar

- 5 [0095]  
33 g de sacarosa  
105 g de glucosa

10 [0096] Estos azúcares se añadieron a 460 ml 20 mM de tampón de ácido láctico, pH 4.0 y se incubaron a 90°C durante 5 min con agitación y luego se enfriaron hasta 5°C.

Enzima

15 [0097] Activa TG (transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis* de Ajinomoto, Japón), 1620 TGHU/g, se diluyó para proporcionar las concentraciones finales indicadas en la Tabla.

Procedimiento

20 [0098] 375 micrólitos de solución SKMP se transfirieron a un tubo Eppendorf de 2 ml. 30 micrólitos de enzima o de agua (control) se añadieron e inyectaron con N<sub>2</sub> durante 30 seg (control sin inyección de N<sub>2</sub>), y después se llevó a cabo una incubación durante 120 min a 40°C.

25 [0099] La solución se incubó a 85°C durante 30 min al baño maría y después se incubó a 43°C (baño maría) durante 10 min con mezcla (1000 r.p.m.) en un termomezclador Eppendorf. 45 Micrólitos 4 U/l de YF-3331 (cultivo de cepas mixto que contiene *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *Bulgaricus* de Chr. Hansen A/S, Dinamarca) solubilizado en 9% de SKMP se añadieron y se llevó a cabo una incubación durante 16 horas a 43°C.

30 [0100] Después, las muestras se incubaron a 0-5°C en baño de hielo/agua durante 20 min.

[0101] 900 micrólitos de solución de azúcar (0-5°C, baño de hielo) se añadieron y homogeneizaron con ultrasonido (6 x 5 seg con 9 seg de pausa) en baño de hielo.

35 [0102] Las muestras se pusieron a 5°C durante 7 días y se midió la sinéresis.

[0103] Se midió la altura de la sinéresis y se calculó la sinéresis relativa de la altura total de la bebida láctea.

[0104] Las determinaciones dobles se muestran en la tabla siguiente.

40 Mediciones de la sinéresis

	% de sinéresis relativa en comparación con altura total	% de sinéresis relativa en comparación con altura total
880 TGHU/l	10	11
150 TGHU/l	21	22
control	22	21
880 TGHU/l + N <sub>2</sub>	5,0	5,0
150 TGHU/l + N <sub>2</sub>	15	17
control + N <sub>2</sub>	17	19

**EJEMPLO 4**

45 *El efecto del tratamiento con transglutaminasa antes de la pasteurización usando varias concentraciones de SKMP*

Solución de SKMP

50 [0105] 231 ml de agua + 69 g de leche desnatada en polvo (dispersabilidad instantánea de Kerry, Irlanda) se incubaron a 50°C durante 10 min antes del uso, y de este modo se obtuvo una solución homogénea.

Solución de azúcar

- 55 [0106]  
5,66 g de sacarosa  
18,0 g de glucosa

[0107] Estos azúcares se añadieron a 46 ml 20 mM de tampón de ácido láctico, pH 4.0 y se incubaron a 90°C durante 5 min con agitación y luego se enfriaron hasta 5°C.

5 Enzima

[0108] Activa TG (transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis* de Ajinomoto, Japón), 1620 TGHU/g, se diluyó para proporcionar las concentraciones finales indicadas en la tabla.

10 Procedimiento

[0109] 293 micrólitros de solución SKMP + 0 micrólitros, 82 micrólitros, 189 micrólitros y 457 micrólitros de agua para la muestra 1, 2,3 y 4, respectivamente, fueron transferidos a un tubo Eppendorf de 2 ml . 30 micrólitros de enzima o agua (control) se añadieron y se incubaron durante 120 min a 40°C.

15 [0110] La solución se incubó a 85°C durante 30 min al baño maría y se incubó a 43°C (baño maría) durante 10 min con la mezcla (1000 r.p.m.) en un termomezclador Eppendorf.  
Después, 457 micrólitros, 375 micrólitros, 268 micrólitros y 0 micrólitros de agua se añadieron a la muestra 1, 2, 3, y 4, respectivamente. 45 Micrólitros 4 U/l de YF-3331 (cultivo de cepas mixto que contiene *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *Bulgaricus* de Chr. Hansen A/S, Dinamarca) solubilizados en 9% de SKMP se añadieron e incubaron durante 16 horas a 43°C.

[0111] Después, las muestras se incubaron a 0-5°C baño de hielo/agua durante 20 min.

25 [0112] 525 micrólitros de solución de azúcar (0-5°C, baño de hielo) se añadieron y se homogeneizaron con ultrasonido (6 x 5 seg con 9 seg de pausa) en baño de hielo.

[0113] Las muestras se pusieron a 5°C durante 4 días y se midió la sinéresis.

30 [0114] Se midió la altura de la sinéresis y se calculó la sinéresis relativa de la altura total de la bebida láctea.

[0115] Las determinaciones dobles se muestran en la tabla siguiente. La concentración enzimática se muestra por litro de bebida láctea acidificada.

Mediciones de la sinéresis

Conc. de TGasa.	Conc. de SKMP antes de la pasteurización	Sinéresis relativa de la altura total (%)	Sinéresis relativa de la altura total (%)
TGHU/l	%	%	%
900	16,6	8	9
0	16,6	48	48
900	13,2	8	10
0	13,2	50	50
900	8,6	10	10
0	8,6	50	54
900	20,9	9	8
0	20,9	52	51

**EJEMPLO 5**

*Combinación de tratamiento con TGasa y grasa láctea o CMC con tratamiento térmico final*

40 Leche

[0116] Se usó leche de Arla express obtenida de un supermercado (Bagsvaerd; Dinamarca):  
 45 leche desnatada: 3,5% de proteínas, 4,7% de carbohidratos y 0,1% de grasa;  
 leche semidesnatada: 3,4% de proteínas, 4,7% de carbohidratos y 1,5% de grasa; y  
 leche entera: 3,4% de proteínas, 4,7% de carbohidratos y 3,5% de grasa.

[0117] La leche se incubó a 95°C durante 5 min antes de usarla.

50 Soluciones de azúcar

[0118]  
 18% de sacarosa, 20 mM de ácido láctico, pH 4.0.

0,75% de CMC, 18% de sacarosa, 20 mM de ácido láctico, pH 4.0.

0,375% de CMC, 18% de sacarosa, 20 mM de ácido láctico, pH 4.0.

5 0,15% de CMC, 18% de sacarosa, 20 mM de ácido láctico, pH 4.0.

Enzima

10 [0119] 25 mg/ml de TGasa de *S. Mobaraensis* (SM) purificada modificada genéticamente se diluyeron para proporcionar las concentraciones finales indicadas en la tabla que figura a continuación.

Procedimiento

15 [0120] 375 micrólitros de leche se transfirieron a un tubo Eppendorf de 2 ml. 30 micrólitros de enzima o de agua (control) se añadieron, y después se llevó a cabo una incubación durante 120 min a 40°C.

[0121] La solución se incubó a 85°C durante 30 min al baño maría y se incubó después a 43°C (baño maría) durante 10 min con la mezcla (1000 r.p.m.) en un termomezclador Eppendorf.

20 [0122] 45 micrólitros 4 U/I de YF-3331 (cultivo de cepas mixto que contiene *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *Bulgaricus* de Chr. Hansen A/S, Dinamarca) solubilizados en leche desnatada se añadieron y se incubaron durante 16 horas a 43°C.

[0123] Después las muestras se incubaron a 0-5°C en baño de hielo/agua durante 20 min.

25 [0124] 900 micrólitros de solución de azúcar (0-5°C, baño de hielo) se añadieron y homogeneizaron con ultrasonido (6 x 5 seg, 50% de amplitud, con 9 seg de pausa) en baño de hielo. Esta solución se incubó a 80°C durante 5 min y se enfrió a 25°C con la mezcla (1000 r.p.m.) en un termomezclador Eppendorf. Una homogeneización adicional se realizó con ultrasonido (6 x 5 seg, 50% de amplitud, con 9 seg de pausa) en baño de hielo.

30 Las muestras se pusieron a temperatura ambiente de 20- 24°C durante 10 días y se midió la sinéresis.

[0125] Se midió la altura de la sinéresis y se calculó la sinéresis relativa de la altura total de la bebida láctea.

35 [0126] Las determinaciones dobles se muestran en la tabla siguiente. DM es la desviación media. La concentración enzimática se muestra por litro de bebida láctea acidificada.

	Altura de la sinéresis %	DM
SM 20 mg/l, 1% de grasa	0	0
SM 4 mg/l, 1% de grasa	0	0
1% de grasa	67,7	7,0
SM 20 mg/l, 0,4% de grasa	20,8	4,4
SM 4 mg/l, 0,4% de grasa	26,2	2,5
0,4% de grasa	73,3	0,39
SM 20 mg/l, 0,03% de grasa, 0,5% de CMC	0	0
SM 20 mg/l, 0,03% de grasa, 0,25% de CMC	10,5	0,26
SM 20 mg/l, 0,03% de grasa, 0,1% de CMC	63,8	2,8
0,03% de grasa, 0,5% de CMC	63	28
0,03% de grasa, 0,25% de CMC	90,8	0,54
0,03% de grasa, 0,1% de CMC	57,4	1,1

**EJEMPLO 6**

40 *Combinación de tratamiento con TGasa y grasa láctea o CMC sin tratamiento térmico final*

Leche

45 [0127] Se usó leche de Arla express obtenida de un supermercado (Bagsvaerd; Dinamarca):

leche desnatada: 3,5% de proteínas, 4,7% de carbohidratos y 0,1% de grasa;  
 leche semidesnatada: 3,4% de proteínas, 4,7% de carbohidratos y 1,5% de grasa; y  
 leche entera: 3,4% de proteínas, 4,7% de carbohidratos y 3,5% de grasa.

50 [0128] La leche se incubó a 95°C durante 5 min antes de usarse.

Soluciones de azúcar

[0129]

18% de sacarosa, 20 mM de ácido láctico, pH 4.0.

5 0,75% de CMC, 18% de sacarosa, 20 mM de ácido láctico, pH 4.0.

0,375% de CMC, 18% de sacarosa, 20 mM de ácido láctico, pH 4.0.

0,15% de CMC, 18% de sacarosa, 20 mM de ácido láctico, pH 4.0.

Enzima

10

[0130] 25 mg/ml de TGasas de *S. Mobaraensis* (SM) purificada modificada genéticamente se diluyeron para proporcionar las concentraciones finales indicadas en la tabla que figura a continuación.

Procedimiento

15

[0131] 375 micrólitros de leche se transfirieron a un tubo Eppendorf de 2 ml. 30 micrólitros de enzima o de agua (control) se añadieron, y después se llevó a cabo una incubación durante 120 min a 40°C.

20

[0132] La solución se incubó a 85°C durante 30 min al baño maría y después se incubó a 43°C (baño maría) durante 10 min con mezcla (1000 r.p.m.) en un termomezclador Eppendorf. 45 Micrólitros 4 U/l de YF-3331 (cultivo de cepas mixto que contiene *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *Bulgaricus* de Chr. Hansen A/S, Dinamarca) solubilizada en leche desnatada se añadieron e incubaron durante 16 horas a 43°C.

25

[0133] Después las muestras se incubaron a 0-5°C en baño de hielo/agua durante 20 min.

30

[0134] 900 micrólitros de solución de azúcar (0-5°C, baño de hielo) se añadieron y homogeneizaron con ultrasonido (6 x 5 seg, 50% de amplitud, con 9 seg de pausa) en baño de hielo. Las muestras se pusieron a 5°C durante 14 días y se midió la sinéresis.

35

[0135] Se midió la altura de la sinéresis y se calculó la sinéresis relativa de la altura total de la bebida láctea.

[0136] Las determinaciones dobles se muestran en la tabla siguiente. DM es la desviación media. La concentración enzimática se muestra por litro de bebida láctea acidificada.

	% de altura de la sinéresis	DM
SM 20 mg/l, 1% de grasa	0	0
SM 4 mg/l, 1% de grasa	1,5	1,5
1% de grasa	8,6	3,4
SM 20 mg/l, 0,4% de grasa	11,0	1,4
SM 4 mg/l, 0,4% de grasa	12,6	7,2
0,4% de grasa	45,0	0,8
SM 20 mg/l, 0,03% de grasa, 0,5% de CMC	0	0
SM 20 mg/l, 0,03% de grasa, 0,25% de CMC	5,3	2,9
SM 20 mg/l, 0,03% de grasa, 0,1% de CMC	8,0	2,7
0,03% de grasa, 0,5% CMC	27,9	0,9
0,03% de grasa, 0,25% de CMC	89,1	0,5
0,03% de grasa, 0,1% de CMC	47,2	0,4

**EJEMPLO 7**

40

*Comparación de tres TGasas diferentes*

Leche

45

[0137] Se usó leche desnatada de Arla express obtenida de un supermercado (Bagsvaerd; Dinamarca). La leche se incubó a 95°C durante 5 min antes de usarse.

50

Soluciones de azúcar

[0138] 18% de sacarosa, 20 mM de ácido láctico, pH 4.0.

50

Enzima

[0139] 25 mg/ml de TGasas de *Streptomyces Mobaraensis* (SM) purificada, 28 mg/ml de TGasas de *Streptomyces*

*Lydicus* (SL) y 6 mg/ml de *Phytophthora cactorum* (PC) se diluyeron para proporcionar las concentraciones finales indicadas en la Tabla.

Procedimiento

- 5 [0140] 375 micrólitros de leche se transfirieron a un tubo Eppendorf de 2 ml. Se añadieron 30 micrólitros de enzima o de agua (control), y después se llevó a cabo una incubación durante 120 min a 40°C.
- 10 [0141] La solución se incubó a 85°C durante 30 min al baño maría y después se incubó a 43°C (baño maría) durante 10 min con mezcla (1000 r.p.m.) en un termomezclador Eppendorf. 45 Micrólitros 4 U/l de YF-3331 (cultivo de cepas mixto que contiene *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *Bulgaricus* de Chr. Hansen A/S, Dinamarca) solubilizados en leche se añadieron e incubaron durante 16 horas a 43°C.
- 15 [0142] Después las muestras se incubaron a 0-5°C en baño de hielo/agua durante 20 min.
- [0143] 900 micrólitros de solución de azúcar (0-5°C, baño de hielo) se añadieron y se homogeneizaron con ultrasonido (6 x 5 seg, 50% de amplitud, con 9 seg de pausa) en baño de hielo. Las muestras se pusieron a 5°C durante 14 días y se midió la sinéresis.
- 20 [0144] Se midió la altura de la sinéresis y se calculó la sinéresis relativa de la altura total de la bebida láctea.
- [0145] Las determinaciones dobles se muestran en la tabla a continuación. DM es la desviación media. La concentración enzimática se muestra por litro de bebida láctea acidificada (BLA).

	Altura de la sinéresis %	DM
SL, 100 mg/l de BLA	34,0	2,0
SL, 20 mg/l de BLA	28,0	0
SL, 4 mg/l de BLA	44,1	0,7
SL, 0,9 mg/l de BLA	58,7	0,8
SM, 100 mg/l de BLA	15,6	0,9
SM, 20 mg/l de BLA	16,0	1,8
SM, 4 mg/l de BLA	15,7	4,3
SM, 0,9 mg/l de BLA	48,9	0,8
PC, 100 mg/l de BLA	31,7	4,5
PC, 20 mg/l BLA	52,1	2,9
PC, 4 mg/l de BLA	59,6	2,4
Control	62,6	0,7

25 LISTADO DE SECUENCIAS

- [0146]
- <110> Novozymes A/S
- 30 <120> Method for producing an acidified milk drink
- <130> 11288.204-WO
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- 35 <210> 1
- <211> 418
- <212> PRT
- <213> *Streptomyces lydicus*
- <400> 1

ES 2 622 165 T3

Met Tyr Lys Arg Arg Ser Leu Leu Ala Phe Ala Thr Val Ser Ala Ala  
1 5 10 15

Ile Phe Thr Ala Gly Val Met Pro Ser Val Ser His Ala Ala Ser Gly  
20 25 30

Gly Asp Gly Glu Arg Glu Gly Ser Tyr Ala Glu Thr His Gly Leu Thr  
35 40 45

Ala Glu Asp Val Lys Asn Ile Asn Ala Leu Asn Lys Arg Ala Leu Asn  
50 55 60

Ala Gly Gln Pro Gly Asn Ser Leu Ala Glu Leu Pro Pro Ser Val Ser  
65 70 75 80

Ala Leu Phe Arg Ala Pro Asp Ala Ala Asp Glu Arg Val Thr Pro Pro  
85 90 95

Ala Glu Pro Leu Asn Arg Met Pro Asp Ala Tyr Arg Ala Tyr Gly Gly  
100 105 110

Arg Ala Thr Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val  
115 120 125

Tyr Ser His Arg Asp Gly Ile Gln Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg  
130 135 140

Glu Lys Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Ile Thr Trp Val Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Pro Tyr Pro Thr Asn Lys Leu Ala Phe Ala Phe Phe Asp Glu Asn Lys  
165 170 175

Tyr Lys Ser Asp Leu Glu Asn Ser Arg Pro Arg Pro Asn Glu Thr Gln  
180 185 190

Ala Glu Phe Glu Gly Arg Ile Val Lys Asp Ser Phe Asp Glu Gly Lys  
195 200 205



ES 2 622 165 T3

Gly Phe Lys Arg Ala Arg Asp Val Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu  
 210 215 220

Asp Ser Ala His Asp Glu Gly Thr Tyr Ile Asp Asn Leu Lys Thr Glu  
 225 230 235 240

Leu Ala Asn Lys Asn Asp Ala Leu Arg Tyr Glu Asp Gly Arg Ser Asn  
 245 250 255

Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asp Gly  
 260 265 270

Gly Asn Tyr Asp Pro Ser Lys Met Lys Ala Val Val Tyr Ser Lys His  
 275 280 285

Phe Trp Ser Gly Gln Asp Gln Arg Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr  
 290 295 300

Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Asp Gln Gly Thr Gly Leu Val Asp  
 305 310 315 320

Met Ser Lys Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Ala Gln Pro Gly Glu  
 325 330 335

Ser Trp Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ser  
 340 345 350

Asp Ala Asp Lys Thr Ile Trp Thr His Ala Asn His Tyr His Ala Pro  
 355 360 365

Asn Gly Gly Leu Gly Pro Met Asn Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn  
 370 375 380

Trp Ser Ala Gly Tyr Ala Asp Phe Asp Arg Gly Thr Tyr Val Ile Thr  
 385 390 395 400

Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Ala Glu Val Lys Gln Gly  
 405 410 415

Trp Ser

<210> 2

<211> 407

<212> PRT

5 <213> Streptomyces mobaraensis

<400> 2

Met Arg Ile Arg Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val  
 1 5 10 15

ES 2 622 165 T3

Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Asp  
 20 25 30  
 Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu  
 35 40 45  
 Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro  
 50 55 60  
 Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp  
 65 70 75 80  
 Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr  
 85 90 95  
 Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg  
 100 105 110  
 Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met  
 115 120 125  
 Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr  
 130 135 140  
 Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser  
 145 150 155 160  
 Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg  
 165 170 175  
 Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser  
 180 185 190  
 Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val  
 195 200 205  
 Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp  
 210 215 220  
 Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu  
 225 230 235 240  
 Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe  
 245 250 255  
 Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val  
 260 265 270  
 Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala  
 275 280 285  
 Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly

ES 2 622 165 T3

290 295 300

Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro  
 305 310 315 320

Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly  
 325 330 335

Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn  
 340 345 350

His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu  
 355 360 365

Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly  
 370 375 380

Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp  
 385 390 395 400

Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro  
 405

<210> 3

<211> 573

<212> PRT

5 <213> Phytophthora cactorum

<400> 3

Met Val Tyr Ser Pro Ser Ser Tyr Leu Ile Ser Ala Ala Val Ala Ala  
 1 5 10 15

Val Ala Phe Gln Ile Gln Gln Ala Thr Ala Gly Ser Leu Tyr Tyr Gly  
 20 25 30

Ala Phe Ser Val Ser Asp Thr Asp Gly Lys Ile Ser Asn Asp Ser Pro  
 35 40 45

Leu Val Gly Thr Glu Ile Ser Asp Gln Asp Cys Ala Ile Glu Val Glu  
 50 55 60

Val Asp Pro Thr Leu Pro Asp Ile Thr Thr Ile Ser Thr Val Pro Val  
 65 70 75 80

Thr Tyr Pro Asp Leu Leu Ala Asn Leu Thr Thr Ala Pro Ser Glu Pro  
 85 90 95

Val Phe Ser Lys Val Gly Thr Val Ile Met Ser Glu Glu Thr Pro Ala  
 100 105 110

Thr Asp Ala Asp Gln Asp Ala Tyr Ile Asp Ser Thr Leu Pro Trp Ile  
 115 120 125

ES 2 622 165 T3

Gly Thr Gly Thr Pro Thr Lys Thr Gly Val Glu Lys Thr Ala Lys Asp  
 130 135 140  
 Cys Ala Thr Gly Trp Glu Glu Thr Ala Ala Gly Asp Lys Leu Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Lys Leu Glu Lys Lys Arg Arg Leu Glu Glu Asn Thr Asn Arg Asp Ile  
 165 170 175  
 Ala Arg Leu Glu Ala Tyr Phe Gly Thr Lys Met Glu Met Thr Leu Lys  
 180 185 190  
 Asp Leu Pro Thr Gln Gly Val His Thr Pro Ser Pro Trp Ala Gly Pro  
 195 200 205  
 Tyr Trp Pro Thr Tyr Gln Asp Ser Ile Asn Val Val Trp Ser Glu Gly  
 210 215 220  
 Glu Ala Ser Pro Ala Glu Lys Tyr Ala Lys Ala Phe Gly Leu Asp Val  
 225 230 235 240  
 Thr Asp Phe Met Asp Lys Val Ser Lys Asp Asn Gly Val Asp Ser Gln  
 245 250 255  
 Ser Lys Arg Arg Gln Cys Gln Thr Asp Glu Gly Cys Glu Ser Leu Asn  
 260 265 270  
 Asn Ala Ser Lys Cys Ala Ile Arg Ala Gly Lys Thr Ser Gly Tyr Cys  
 275 280 285  
 Ile Pro Thr Trp Phe Gly Ile Cys His Ala Trp Ala Pro Ala Ala Ile  
 290 295 300  
 Leu Glu Ala Glu Pro Thr Cys Pro Val Thr His Asn Gly Val Thr Phe  
 305 310 315 320  
 Gln Pro Ile Asp Ile Lys Gly Leu Ile Ser Asp Val Tyr Asp Gly Ala  
 325 330 335  
 Gly Val Ala Thr Val Phe Thr Gly Ala Arg Tyr Asn Gly Gly Asp Asp  
 340 345 350  
 Ala Ala Asp Glu Tyr Gly Arg His Thr Asn Ala Ala Tyr Arg Asp Leu  
 355 360 365  
 Asn Pro Ala Tyr Phe His Ile Ala Ser Ala Asn Ile Leu Gly Lys Leu  
 370 375 380  
 Asn Ala Thr Phe Val Ala Asp Val Asp Ala Ala Ala Glu Val Trp Asn  
 385 390 395 400

ES 2 622 165 T3

Gln Pro Val Arg Gly Phe Lys Val Phe Glu Gln Thr Ala Met Ser Leu  
 405 410 415

Glu Glu Ala Ala Gln Thr Phe Tyr Gly Leu Glu Glu Tyr Pro Trp Asn  
 420 425 430

Ala Ala Ala Lys Ser Ile Val Tyr Val Lys Ser Arg Leu Ser Trp Ile  
 435 440 445

Phe Glu Thr Tyr Thr Asp Gly Gly Leu Val Ala Ser Gly Glu Ile Asn  
 450 455 460

Arg Tyr Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Tyr Tyr Leu Leu Glu Leu Asp Asp  
 465 470 475 480

Ala Gly Glu Ile Ile Gly Gly Glu Trp Val Tyr Asp Ser Asp Ser Asp  
 485 490 495

His Pro Asp Phe Leu Trp Val Pro Lys Ala Lys Pro Ala Ala Asp Thr  
 500 505 510

Val Thr Ser Ile Gly Leu Ser Tyr Ala Asp Val Ser Met Leu Leu Glu  
 515 520 525

Lys Ser Val Ala Cys Ser Asp Ser Thr Ser Ala Ala Gly Ser Val Ser  
 530 535 540

Ser Gly Ser Val Gly Glu Ser Thr Glu Ala Pro Thr Glu Val Pro Thr  
 545 550 555 560

Thr Ser Thr Ser Ala Pro Thr Ser Gly Ser Gly Ala Leu  
 565 570

**REIVINDICACIONES**

1. Método para la producción de una bebida láctea acidificada, dicho método que comprende:
- 5 a) proporcionar un sustrato de leche con un contenido de proteína superior al 5%;  
b) tratar el sustrato de leche con una enzima con actividad de transglutaminasa;  
c) fermentar el sustrato de leche con un microorganismo; y  
d) diluir el sustrato de leche fermentada al menos 1,5 veces para obtener la bebida láctea acidificada; donde la etapa b) se realiza antes, durante o después de la etapa c).
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde el nivel de oxígeno disuelto del sustrato de leche se reduce a por debajo del 80% del nivel de saturación.
3. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sustrato de leche se somete a pasteurización antes de la fermentación y el tratamiento enzimático se realiza antes de la pasteurización.
- 15 4. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sustrato de leche se somete a tratamiento térmico antes del tratamiento con la enzima con actividad de transglutaminasa.
5. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se añade glutatión al sustrato de leche antes del tratamiento con la enzima con actividad de transglutaminasa.
- 20 6. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el microorganismo es una bacteria de ácido láctico.
7. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sustrato de leche fermentada se mezcla con un jarabe y la mezcla se somete a homogeneización.
- 25 8. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la bebida láctea acidificada se consume como una bebida.
- 30 9. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la bebida láctea acidificada tiene un contenido sin grasa de sólido de leche inferior al 8%.
10. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la bebida láctea acidificada tiene un contenido de grasa inferior al 2%.
- 35 11. Método según la reivindicación 10, donde la bebida láctea acidificada tiene un contenido de grasa inferior al 0,5%.
- 40 12. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enzima con actividad de transglutaminasa se produce de manera recombinante.
13. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enzima con actividad de transglutaminasa se obtiene a partir de una bacteria del género *Streptomyces*.
- 45 14. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enzima tiene al menos 50% de identidad para SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o para un fragmento activo de transglutaminasa de cualquiera de éstas.