

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 066**

51 Int. Cl.:

A23C 9/12 (2006.01)

A23C 9/127 (2006.01)

A23C 9/152 (2006.01)

A23C 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2005 PCT/DK2005/000299**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2005 WO05104859**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2005 E 05735392 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 1753297**

54 Título: **Proceso enzimático para obtener un mayor rendimiento de ácido lactobiónico**

30 Prioridad:

03.05.2004 DK 200400702

04.05.2004 US 568157 P

24.06.2004 DK 200400983

01.07.2004 US 584690 P

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

12.02.2018

73 Titular/es:

**NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (50.0%)
77 PERRY CHAPEL CHURCH ROAD
FRANKLINTON, NORTH CAROLINA 27525, US y
NOVOZYMES A/S (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BUDTZ, PETER;
VINDELØV, JANNIK TORBEN;
NIELSEN, PER MUNK;
ASHIE, ISAAC y
NORDKVIST, MIKKEL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 654 066 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

Proceso enzimático para obtener un mayor rendimiento de ácido lactobiónico

Campo de la invención:

5 Un proceso para obtener un mayor rendimiento y/o un menor tiempo de reacción en la conversión enzimática de lactosa en ácido lactobiónico que comprende añadir a un sustrato lácteo tal como leche, suero lácteo o una solución de lactosa, una carbohidrato-oxidasa, capaz de convertir lactosa en ácido lactobiónico, donde se controla el pH del proceso y se mantiene a un nivel especificado.

Antecedentes de la invención:

10 La lactosa, conocida normalmente como el azúcar de la leche, es el principal carbohidrato de la leche. En los productos lácteos a base de leche, tales como el yogur y el queso, se puede considerar la lactosa como un azúcar con poco valor debido a, por ejemplo, la intolerancia a la lactosa y debido a su participación en las reacciones de cristalización y oscurecimiento. La lactosa supone hasta un 75% del material seco total en el suero lácteo y se acumula en cantidades anuales de aproximadamente 1.2 millones de toneladas en todo el mundo sin que se disponga de muchas rutas rentables para la utilización directa.

15 Sin embargo, la lactosa se puede convertir en ácido lactobiónico (ácido 4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucónico) un compuesto del que se sabe que es útil en medicina, pero también en productos alimentarios debido a su sabor agridulce. El ácido lactobiónico se puede generar, por ejemplo, durante la obtención de productos lácteos tales como el queso y proporciona al producto resultante las propiedades organolépticas deseadas y un contenido reducido de lactosa. Además, el ácido lactobiónico *per se* y sus sales se pueden generar, por ejemplo, mediante la conversión
20 enzimática de la lactosa y se pueden utilizar como aditivos en productos alimentarios específicos, por ejemplo, como un antioxidante, un agente emulsionante, como un acidulante general en productos alimentarios, como un complemento mineral dietético y como un sustituto de un cultivo iniciador del queso en la obtención de queso. En la industria farmacéutica el ácido lactobiónico se utiliza, por ejemplo, como un componente clave en las soluciones para preservar órganos y en la industria cosmética como un principio activo en lociones y cremas para el cuidado
25 general de la piel. De manera adicional, se puede utilizar el ácido lactobiónico en aplicaciones técnicas, por ejemplo, como un ingrediente en detergentes.

En la mayoría de las aplicaciones se prefiere el ácido lactobiónico generado por la conversión enzimática de la lactosa y las enzimas de tipo carbohidrato-oxidasa capaces de convertir lactosa en ácido lactobiónico son muy conocidas. El esquema de reacción se puede describir mediante:

30
$$\text{lactosa} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ácido lactobiónico} + \text{H}_2\text{O}_2$$

El N.º de Reg. CAS para el ácido lactobiónico es 96-82-2.

El documento WO02/089592 (Kraft Foods) describe varias ventajas de utilizar ácido lactobiónico en productos lácteos a base de leche y ventajas de utilizar la conversión enzimática *in situ* con carbohidrato-oxidasa de lactosa en ácido lactobiónico durante la preparación de productos lácteos a base de leche tales como el queso.

35 Las ventajas se refieren, por ejemplo, a la preparación de productos lácteos con un contenido de lactosa reducido (por ejemplo, leche con un contenido reducido de lactosa) y la obtención de productos del queso procesados (por ejemplo, para la pizza) que tengan menos problemas de oscurecimiento. De manera adicional, en, por ejemplo, la producción de queso se puede utilizar el ácido lactobiónico para desarrollar acidez. Por lo general, la acidez se desarrolla fermentando la leche con bacterias del ácido láctico que metabolizan la lactosa para producir ácido
40 láctico. En consecuencia, con la adición de ácido lactobiónico es posible producir productos lácteos relevantes utilizando cantidades reducidas de bacterias del ácido láctico.

Con respecto a la conversión enzimática con carbohidrato-oxidasa de lactosa en ácido lactobiónico, el documento WO02/089592 describe que la enzima se ha de añadir a un sustrato lácteo (por ejemplo, leche o suero lácteo) e
45 incubar a continuación durante un cierto periodo de tiempo a una temperatura adecuada con el fin de llevar a cabo la reacción enzimática. Esta descripción no proporciona contenido explícito respecto a ninguna ventaja de mantener el pH a un cierto nivel durante la reacción enzimática. De hecho, se permite que el pH disminuya durante la reacción, debido a la generación de ácido lactobiónico, y de esta manera se acidifica el producto lácteo.

En el ejemplo 9 del documento WO02/089592 se incubó la leche con la carbohidrato-oxidasa durante toda la noche. No se hace referencia a ningún control del pH. Tras la incubación durante toda la noche, la leche tratada comprendió
50 un 1.5% de lactosa y un 3.2% de ácido lactobiónico, y se proporciona de esta manera una conversión de lactosa en ácido lactobiónico de un 68%.

En el ejemplo 12 B) y C) se incubaba la leche con la carbohidrato-oxidasa durante 48 horas a 55 °C. Durante la reacción, se mantiene el pH a pH 7. No se da ninguna explicación de este control del pH y no se proporcionan los rendimientos del ácido lactobiónico en estos ejemplos.

5 El documento WO03/037093 (Novozymes) también describe una conversión enzimática con carbohidrato-oxidasa de lactosa en ácido lactobiónico durante el proceso de preparación de productos lácteos a base de leche. Al igual que en el documento WO02/089592, este documento también guarda silencio respecto a cualquier ventaja de mantener el pH a un cierto nivel durante la reacción enzimática. El único ejemplo práctico específico describe que se incubó leche entera con la oxidasa y se permitió que reaccionara a 40 °C hasta que se alcanzó un pH 4.2. Por lo tanto, parece que el pH no se controló, ya que el pH de la leche fresca natural es aproximadamente 6.6.

10 El documento WO02/39828 (Danisco) se refiere a un proceso en el que se pulveriza una solución de una carbohidrato-oxidasa (hexosa-oxidasa) sobre una pizza con queso y se demuestra la ventaja de un menor oscurecimiento (denominado "reacción de Maillard") del queso de la pizza. Este documento también guarda silencio respecto a cualquier ventaja de mantener el pH a un cierto nivel durante la reacción enzimática.

15 Murakami (*J. Appl. Glycosci.* 50, 117-120 (2003)) divulga un método para la producción microbiana de ácido lactobiónico a partir de lactosa, utilizando una cepa mutada de *Burkholderia cepacia*.

Rand (*Journal of Dairy Science*, 1144-50 (1975)) divulga un proceso enzimático para acidificar leche. Se explica que la lactosa en la leche se puede convertir en ácido glucónico mediante una reacción enzimática acoplada utilizando las enzimas lactasa y glucosa-oxidasa.

20 Por lo tanto, en la técnica varios documentos divulgan procesos de obtención de alimentos que conllevan la conversión enzimática de lactosa en ácido lactobiónico. Sin embargo, se necesitan procesos enzimáticos mejorados útiles para los objetivos descritos anteriormente y, especialmente, para la producción industrial de ácido lactobiónico *per se*.

Compendio de la invención:

25 El problema que se ha de resolver mediante la presente invención consiste en proporcionar un proceso para obtener mayores rendimientos y/o un menor tiempo de reacción en la conversión enzimática de lactosa en ácido lactobiónico a partir de un sustrato lácteo. El rendimiento se define como la fracción de lactosa convertida en ácido lactobiónico en un tiempo concreto. Por lo tanto, en el presente contexto, rendimiento es equivalente a "grado de conversión" en un tiempo concreto. En situaciones en las que se desea un grado de conversión específico, la presente invención proporciona un proceso que da como resultado un menor tiempo de reacción.

30 La presente invención se basa en la sorprendente observación de que manteniendo el pH en un valor estable durante la conversión enzimática con carbohidrato-oxidasa de lactosa en ácido lactobiónico, se pudo conseguir un rendimiento más elevado y/o un menor tiempo de reacción en la conversión enzimática.

35 En consecuencia, un primer aspecto de la invención se refiere a un proceso para obtener un mayor rendimiento y/o un menor tiempo de reacción en la conversión enzimática de lactosa en ácido lactobiónico, comprendiendo dicho proceso:

- i) añadir a un sustrato lácteo una carbohidrato-oxidasa,
- ii) incubar dicho sustrato lácteo en condiciones que permitan que la carbohidrato-oxidasa convierta la lactosa en ácido lactobiónico,
- iii) mantener el pH durante la incubación en el intervalo de 3.0 a 9.0 mediante la adición de una base débil, es decir, una base que tiene un valor de pKb de al menos 3.5 y obtener de esta manera dicho mayor rendimiento y/o menor tiempo de reacción.

Una realización preferida adicional comprende la adición de una catalasa, opcionalmente, combinada con H₂O₂ en el paso i) del proceso.

45 Un aspecto importante adicional de la presente invención es un proceso para obtener un mayor rendimiento y/o un menor tiempo de reacción en la conversión enzimática de lactosa en ácido lactobiónico, comprendiendo dicho proceso:

- i) añadir a un sustrato lácteo una carbohidrato-oxidasa, y una catalasa,
- ii) incubar dicho sustrato lácteo en condiciones que permitan que la carbohidrato-oxidasa convierta la lactosa en ácido lactobiónico,
- iii) mantener el pH durante la incubación en el intervalo de 3.0 a 9.0 mediante la adición de una base, donde
 - a. la base es Ca(OH)₂, KOH, Mg(OH)₂ o una base débil, es decir, una base que tiene un valor de pKb de al menos 3.5, siempre que cuando se utilice una base fuerte dicho pH no sea un pH de 7.0, y/o
 - b. el pH se mantiene a un pH de 3.0 a 6.9 o de 7.1 a 9.0 y, de esta manera, obtener dicho mayor

rendimiento y/o menor tiempo de reacción.

La conversión enzimática de lactosa en ácido lactobiónico requiere oxígeno y se produce H_2O_2 durante la conversión. La adición de una catalasa convierte el H_2O_2 producido en oxígeno. Por lo tanto, se puede reducir el suministro de oxígeno cuando se introduce una catalasa en el proceso.

- 5 En un aspecto adicional más de la invención se proporciona un proceso de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores como una parte integrada de un proceso de obtención de alimentos.

Descripción detallada de la invención:

Sustrato lácteo:

10 La expresión "sustrato lácteo" se debe interpretar como una solución/suspensión de cualquier producto lácteo o similar a la leche que incluye lactosa, tal como leche entera o con poca grasa, leche desnatada, suero de mantequilla, leche condensada, leche en polvo, suero lácteo, filtrado del suero lácteo, lactosa, aguas madres de la cristalización de la lactosa, concentrado de proteínas del suero lácteo o crema que se origina a partir de cualquier animal. No es necesario que la lactosa presente en el sustrato tenga que ser totalmente soluble, es decir, la reacción se puede llevar a cabo, por ejemplo, en una suspensión espesa concentrada con un contenido de lactosa que supera el contenido soluble a la temperatura de reacción. Además, la reacción se puede llevar a cabo en un sustrato lácteo en el que parte de la lactosa es hidrolizada o ha sido hidrolizada por la lactasa. En este caso, no sólo se produce ácido lactobiónico, sino que se generarán también ácido galacturónico y ácido glucónico mediante la acción de la carbohidrato-oxidasa.

20 Preferentemente, el sustrato lácteo es leche y más preferentemente suero lácteo o fracciones del suero lácteo o una solución/suspensión de lactosa.

El término "leche" se debe interpretar como la secreción láctea obtenida al ordeñar cualquier mamífero tal como vacas, ovejas, cabras, búfalos o camellos.

25 Tal como se describirá en más detalle posteriormente en la presente, el presente proceso es especialmente adecuado para la producción de ácido lactobiónico a una escala relativamente grande. En consecuencia, en una realización preferida de la presente invención el sustrato lácteo se utiliza en una cantidad de 50 kg a 500 000 kg.

Ácido lactobiónico:

Se debe comprender que la expresión "ácido lactobiónico" se refiere al ácido lactobiónico o a sus sales. Las sales adecuadas incluyen Na-lactobionato, Ca-lactobionato, NH_4 -lactobionato y K-lactobionato.

30 Se selecciona la base utilizada para el control de pH con el fin de controlar el tipo de lactobionato producido. A partir del lactobionato producido controlando el pH se puede obtener el ácido lactobiónico purificado mediante la eliminación de los cationes, por ejemplo, utilizando intercambio iónico. Además, los cationes tales como el calcio se pueden eliminar utilizando la sedimentación con un ácido fuerte, por ejemplo, ácido sulfúrico o ácido fosfórico.

Carbohidrato-oxidasa:

35 Existe constancia de varias carbohidrato-oxidases adecuadas, capaces de convertir lactosa en ácido lactobiónico, y están a disposición del experto en la técnica. Estas pueden ser, por ejemplo, una hexosa-oxidasa o una glucosa-oxidasa.

Una carbohidrato-oxidasa preferida en la actualidad es una carbohidrato-oxidasa microbiana.

40 Se describe una hexosa-oxidasa (EC 1.1.3.5) adecuada en el documento WO96/40935 (Bioteknologisk Institut, Dinamarca). Este documento describe una hexosa-oxidasa adecuada procedente de especies de algas marinas, más en concreto, donde la especie de alga marina es una seleccionada a partir del grupo constituido por *Chondrus crispus*, *Iridophycus flaccidum* y *Euthora cristata*.

45 Se pueden obtener otras carbohidrato-oxidases adecuadas, por ejemplo, a partir de *Pyrenomyces* mitospórica tal como *Acremonium*, en particular, *A. strictum*, tal como ATCC 34717 o T1; *A. fusidioides*, tal como IFO 6813; o *A. potronii*, tal como IFO 31197. En una realización preferida, la carbohidrato-oxidasa se obtiene a partir de la fuente divulgada por Lin *et al.*, (1991, *Biochim. Biophys. Acta* 1118:41-47) y en el documento JP-A 5-84074.

En una realización preferida, la carbohidrato-oxidasa es una carbohidrato-oxidasa obtenida a partir de un hongo que pertenece al género *Microdochium*, más preferentemente donde el hongo es *Microdochium nivale* y aún más preferentemente donde el hongo es *Microdochium nivale* CBS 100236. En el documento WO99/31990 (Novo Nordisk A/S) se describe detalladamente una oxidasa preferida de este tipo.

La cantidad de oxidasa que se va a utilizar dependerá por lo general de los requisitos específicos y de la enzima específica. La cantidad de adición de oxidasa es suficiente preferentemente para generar el grado deseado de conversión de lactosa en ácido lactobiónico en un tiempo especificado. Normalmente, es suficiente una adición de oxidasa en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 000 OXU por kg de sustrato lácteo, especialmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 5000 OXU por kg de sustrato lácteo y, más especialmente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 OXU por kg de sustrato lácteo. El ajuste de la cantidad de la enzima específica necesaria para la conversión de un sustrato lácteo específico está comprendido en los conocimientos generales del experto.

En la bibliografía, normalmente se define una Unidad de Oxidasa (OXU, según el orden en inglés) como la cantidad de enzima que oxida un μmol de lactosa por minuto en condiciones específicas. Sin embargo, en los ejemplos que se proporcionan en la presente se define OXU como un mg de enzima lactosa-oxidasa pura, según se mide respecto a un patrón enzimático.

Incubación en condiciones que permiten que la carbohidrato-oxidasa convierta lactosa en ácido lactobiónico:

El sustrato lácteo obtenido en el paso i) del presente proceso se incuba en condiciones que permiten que la carbohidrato-oxidasa convierta lactosa en ácido lactobiónico. Tales condiciones incluyen, sin carácter limitante, temperatura, oxígeno, cantidad y características de la carbohidrato-oxidasa, otros aditivos tales como, por ejemplo, catalasa y tiempo de reacción/incubación. Obviamente, se seleccionan las condiciones de incubación de manera que favorezcan la consecución de la presente invención, es decir, para obtener un mayor rendimiento y/o un menor tiempo de reacción de la conversión enzimática de lactosa en ácido lactobiónico.

Por lo general, un tiempo de incubación adecuado debería permitir el grado de conversión de lactosa en ácido lactobiónico de interés.

El oxígeno es un factor importante en el presente proceso ya que la conversión de lactosa en ácido lactobiónico consume oxígeno. Esto se puede observar, por ejemplo, en la tabla del ejemplo 1 de la presente. En consecuencia, si se monitoriza el oxígeno durante la reacción enzimática se observará por lo general una caída inicial en la cantidad de oxígeno, la cual si, por ejemplo, se proporciona aire de manera constante, volverá a aproximadamente el nivel inicial cuando la reacción enzimática finalice. Cuando el oxígeno ha vuelto a más de un 90% del valor inicial, esto indica que la reacción enzimática ha finalizado o al menos se ha ralentizado de manera significativa. En consecuencia, un tiempo de incubación adecuado podría ser preferentemente un tiempo que se prolongue al menos hasta que el nivel de oxígeno del sustrato lácteo incubado haya vuelto a más de un 90% del nivel inicial. Esto es así especialmente si se desea una conversión máxima de lactosa.

Tal como se describirá con más detalle posteriormente en la presente en un aspecto específico de la invención, puede que se prefiera añadir una catalasa durante la conversión enzimática de la lactosa. La catalasa se puede añadir en cualquier momento adecuado, por ejemplo, en el paso i) del proceso. Opcionalmente, se añade H_2O_2 combinado con la catalasa.

También se puede utilizar la determinación de la cantidad de equivalentes de base añadidos para mantener el pH constante con el fin de monitorizar la reacción.

Por lo general, se selecciona un tiempo de incubación adecuado en el intervalo de $\frac{1}{2}$ hora a 3 días, de la manera más preferida de 2 horas a 48 horas.

Por lo general la temperatura de incubación dependerá de la carbohidrato-oxidasa utilizada y se selecciona normalmente de acuerdo con la temperatura de reacción óptima para la carbohidrato-oxidasa. Sin embargo, ya que la solubilidad del oxígeno disminuye al aumentar la temperatura, se han de tener en cuenta otros factores con el fin de obtener un proceso óptimo. El experto sabrá cómo equilibrar la temperatura óptima respecto a, por ejemplo, la actividad enzimática y la solubilidad del oxígeno. Por lo general, una temperatura adecuada estará en el intervalo de aproximadamente 0°C a aproximadamente 80°C . Una temperatura baja, por ejemplo, de 5°C , da como resultado una velocidad de reacción relativamente lenta, pero tiene la ventaja de representar la temperatura típica de los productos almacenados en frío. Por lo tanto, será posible llevar a cabo la reacción durante la obtención y/o almacenamiento de un producto lácteo.

Las fuentes adecuadas de oxígeno incluyen el aire atmosférico, aire atmosférico enriquecido en oxígeno y oxígeno puro. Llevar a cabo el proceso a una presión superior a 1 atmósfera aumenta la solubilidad del oxígeno y puede preferirse cuando proceda.

El oxígeno se puede suministrar al proceso, por ejemplo, mezclando aire de manera continua con el sustrato lácteo durante la incubación. Una opción adicional para proporcionar O_2 es añadir H_2O_2 en presencia de una catalasa. El uso de H_2O_2 como una fuente de oxígeno puede preferirse especialmente cuando el proceso se lleva a cabo utilizando enzimas inmovilizadas en el que la adición de oxígeno es más difícil.

Incubación a un pH estable:

5 Tal como se ha explicado anteriormente, una característica esencial del presente proceso tal como se describe en la presente es que durante la incubación (paso (ii)) se ha de mantener el pH, mediante la adición adecuada de una base, en un nivel estable, siempre que cuando se utilice una base fuerte dicho nivel estable no sea un pH de 7.0. En realizaciones específicas, el nivel de pH estable se mantiene en el intervalo de aproximadamente 3.0 a aproximadamente 9.0 mediante la adición de una base débil o en el intervalo de aproximadamente 3.0 a 6.9 y de 7.1 a aproximadamente 9.0 mediante la adición de cualquier base, tal como en el intervalo de aproximadamente 3.0 a 6.8 y de 7.2 a aproximadamente 9.0, incluido un intervalo de aproximadamente 3.0 a 6.5 y de 7.5 a aproximadamente 9.0, tal como un intervalo de aproximadamente 3.0 a 6.0 y de 8.0 a aproximadamente 9.0.

10 Preferentemente, la incubación se lleva a cabo durante un periodo de tiempo que es suficiente para obtener un grado de conversión de lactosa en ácido lactobiónico que es al menos un 2.5% superior al de un proceso de control comparativo en el que la única diferencia comparativa es que durante la incubación el pH no se mantiene mediante la adición adecuada de una base.

15 El proceso de control comparativo debería, excepto en el caso de ausencia de adición de base para mantener el pH, realizarse de manera idéntica (es decir, oxidasa idéntica en cantidad idéntica, mismo sustrato lácteo, mismo tiempo de incubación, temperatura y presencia de oxígeno, etc.) al proceso para mejorar el rendimiento y/o reducir el tiempo de reacción en la conversión enzimática de lactosa en ácido lactobiónico tal como se describe en la presente. Esto concuerda con la interpretación normal de un control tal como se utiliza en la presente, ya que se realiza el control para identificar el efecto positivo de mantener el pH estable.

20 El valor de pH estable preferido para un proceso específico de interés dependerá, tal como apreciará el experto, de varios factores. Por ejemplo, si el sustrato lácteo es leche, se sabe que el pH natural es de aproximadamente 6.6 y sería preferible mantener el pH a un valor de aproximadamente 6.6, tal como un pH de 6.3 a 6.9. Tal como se ha mencionado anteriormente, se permite que la conversión enzimática convencional de lactosa en ácido lactobiónico tenga lugar sin ningún control de pH ya que el proceso se utiliza normalmente para la acidificación del producto final.

25 Se ha descrito un ajuste del pH al final del proceso en los casos en los que el pH cae por debajo de un nivel deseado, por ejemplo, en la obtención de leche con poca lactosa. Por lo tanto, cualquier ajuste previo del pH se ha realizado con el único objetivo de igualar el pH con el producto final y no para una optimización del proceso en sí.

30 Se apreciará que el pH del producto de ácido lactobiónico o composición que comprende ácido lactobiónico de acuerdo con el presente proceso también se puede ajustar a un nivel de pH preferido después de realizar la conversión enzimática o al final de esta, por ejemplo, cuando se ha logrado un 95% de la conversión deseada de lactosa, se puede permitir que el pH caiga hasta un nivel deseado. La caída del pH combinada con la inyección de aire permite además que el CO₂ escape del sustrato lácteo. Esto es de particular interés cuando se utiliza carbonato para controlar el pH durante la reacción.

35 En el presente contexto se ha de entender de manera amplia “un nivel de pH estable” como el control y mantenimiento del pH dentro de un intervalo específico o cerca de/en un valor específico durante el proceso mediante la adición de una base. El control y ajuste/mantenimiento del pH durante un proceso enzimático es un procedimiento estándar que se puede llevar a cabo con un grado de exactitud muy elevado. Por lo tanto, un pH estable puede ser un valor mantenido en un nivel constante con una variación inferior a 0.1 unidades de variación de pH o incluso inferior a 0.05 unidades de variación de pH. De esto se deduce que se puede definir un intervalo óptimo para un proceso enzimático específico de acuerdo con la presente invención y que el pH se puede controlar y mantener con el grado de exactitud descrito dentro de este intervalo. En el proceso de la invención, un intervalo de pH específico o un valor de pH específico adecuado se selecciona en el intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 9. Sujeto a la limitación de que el valor de pH específico no es 7.0 cuando se utiliza una base fuerte para el ajuste del pH.

45 Preferentemente el pH se mantiene, mediante la adición adecuada de una base, a un pH de 5.5 a 6.9, más preferentemente a un pH de 6.0 a 6.9.

Se prefiere que el pH se mantenga al nivel de pH estable tal como se describe en la presente desde el comienzo de la reacción enzimática. En otras palabras, inmediatamente después de que se añada la oxidasa al sustrato lácteo se añade la base para mantener el pH estable tal como se describe en la presente.

50 En particular, si se desea una conversión máxima de lactosa se mantiene el pH al nivel estable tal como se describe en la presente durante un periodo de tiempo que se prolongue al menos hasta que el nivel de oxígeno del sustrato lácteo incubado haya vuelto a más de un 90% del nivel inicial.

55 Preferentemente, se mantiene el pH al nivel de pH estable tal como se describe en la presente durante un periodo de tiempo de 30 minutos a 48 horas, más preferentemente de 1 hora a 36 horas y aún más preferentemente de 2 horas a 24 horas.

5 En el presente proceso, es posible mantener el pH dentro de los intervalos prescritos utilizando cualquier base. En principio, cualquier sustancia capaz de neutralizar el ácido producido será válida en el proceso. Sin embargo, a efectos prácticos se prefieren bases débiles y carbonatos. Los ejemplos de bases débiles incluyen, sin carácter limitante, CaCO_3 , Na_2CO_3 , K_2CO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e NH_4OH . Actualmente, las bases débiles preferidas son NH_4OH y CaCO_3 .

El experto conoce gran número de otras bases que pueden ser válidas en el proceso de la invención, por ejemplo, bases fuertes tales como $\text{Ca}(\text{OH})_2$, KOH , NaOH e $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

10 Cuando la base es, por ejemplo, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ o CaCO_3 es posible, mediante la utilización del proceso tal como se describe en la presente, producir Ca-lactobionato a partir de un sustrato lácteo adecuado. Este producto se puede utilizar posteriormente como, por ejemplo, un ingrediente o un aditivo para un producto lácteo tal como se describe en la técnica.

15 Por lo tanto, tal como se ha descrito previamente, una base preferida será por lo general una base que está relacionada con la composición mineral deseada del producto final. En realizaciones específicas, puede que se desee enriquecer la leche en calcio. En este caso, una base preferida es $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ya que los carbonatos no son adecuados debido a una influencia no deseada en el sabor. (Ejemplo 4).

La expresión base "débil" frente a "fuerte" se refiere a la capacidad de la base para disociarse. En el presente contexto, se define una base débil como una base que tiene un valor de pK_b de al menos 3.5 (para bases dipróticas como CO_3^{2-} este valor de pK_b se refiere al primer paso).

20 Preferentemente, durante la incubación (paso (ii)) se mantiene el pH mediante la adición adecuada de una base durante un periodo de tiempo que es suficiente para obtener un grado de conversión de lactosa en ácido lactobiónico que es al menos un 5% superior a un proceso de control comparativo en el que la única diferencia es que durante la incubación el pH no se mantiene mediante la adición una base, más preferentemente al menos un 15% superior al proceso de control comparativo, aún más preferentemente al menos un 30% superior al proceso de control comparativo y de la manera más preferida al menos un 45% superior al proceso de control comparativo.

25 A efectos ilustrativos, en los ejemplos prácticos 1 y 2 de la presente el grado de conversión de lactosa en ácido lactobiónico del control fue de un 41% y manteniendo el pH en el intervalo de 5-6 el grado de conversión aumentó hasta un 90%. Además, tal como se ilustra en el ejemplo 5, resultó sorprendente observar que el uso de una base débil (por ejemplo, Na_2CO_3 0.5 M) redujo el tiempo de reacción en un 24% en comparación con el proceso similar en el que se mantuvo el pH mediante la adición de una base fuerte (NaOH 1 M). Por lo tanto, el uso de una base débil en lugar de una base fuerte reduce el tiempo de reacción del presente proceso. El tiempo de reacción se puede reducir en al menos un 5% tal como al menos un 25%, al menos un 50% o incluso al menos un 80%.

30 Adicionalmente, tal como se ilustra en el Ejemplo 5, se observó una actividad enzimática residual cercana a un 100% después de que concluyera el proceso de conversión. Esto ofrece la posibilidad de reutilizar la enzima en un nuevo lote, por ejemplo, recuperando las enzimas mediante filtración con membrana.

35 En un aspecto específico de la invención, el proceso para obtener un mayor rendimiento y/o un menor tiempo de reacción en la conversión enzimática de lactosa en ácido lactobiónico está definido por los pasos siguientes:

- 40 i) añadir a un sustrato lácteo una carbohidrato-oxidasa,
- ii) incubar dicho sustrato lácteo en condiciones que permitan que la carbohidrato-oxidasa convierta la lactosa en ácido lactobiónico,
- iii) mantener el pH durante la incubación en el intervalo de 3.0 a 9.0 mediante la adición de una base débil, es decir una base que tiene un valor de pK_b de al menos 3.5 y obtener de esta manera dicho mayor rendimiento y/o menor tiempo de reacción.

45 Por lo tanto, tal como se desprende de la descripción anterior y de los ejemplos proporcionados en la presente, la presente invención es una contribución valiosa a la conversión industrial de lactosa en ácido lactobiónico ya que las características que definen el presente proceso permiten una producción económica de ácido lactobiónico. Se apreciará que varias alteraciones, modificaciones y adaptaciones se pueden basar en la presente divulgación y se pretende que estén comprendidas en el alcance y naturaleza del presente proceso.

50 Obviamente, el proceso divulgado es útil para una producción industrial de ácido lactobiónico *per se*. Sin embargo, el proceso también puede formar parte de un proceso de obtención para producir un producto lácteo tal como queso, yogur, leche, etc.

Purificación de ácido lactobiónico:

Opcionalmente, es posible purificar el ácido lactobiónico de cualquier manera adecuada para obtener un producto de ácido lactobiónico o una composición que comprende ácido lactobiónico con un grado deseado de pureza de ácido lactobiónico.

- 5 El experto sabrá cómo realizar una purificación y dependiendo de las necesidades específicas de interés se puede obtener una composición que comprende al menos un 30% de ácido lactobiónico, al menos un 90% de ácido lactobiónico o incluso un 95% o un 99% de ácido lactobiónico.

Los métodos adecuados para la purificación del ácido lactobiónico incluyen la filtración, intercambio iónico, concentración y secado.

- 10 Se puede utilizar una composición que comprende ácido lactobiónico en la obtención de productos alimentarios como, por ejemplo, un aditivo alimentario o un ingrediente alimentario. Además, la composición se puede utilizar en otras aplicaciones tal como se ha mencionado anteriormente en la presente.

Cultivo iniciador que comprende bacterias del ácido láctico:

- 15 En general, se pueden incluir elementos o ingredientes extra en el proceso tal como se describe en la presente de acuerdo con necesidades específicas. El experto en la técnica será consciente de gran número de tales elementos o ingredientes extra necesarios.

- 20 En una realización preferida, se incluye en el proceso tal como se describe en la presente un cultivo iniciador que comprende bacterias del ácido láctico. El cultivo iniciador se puede añadir al sustrato lácteo antes o después de que se añada la oxidasa y, opcionalmente, una catalasa al sustrato. Esto dependerá del perfil de fermentación específico de interés.

La expresión "bacterias del ácido láctico" denota en la presente un grupo de bacterias grampositivas, que no forman esporas, que llevan a cabo la fermentación láctica de azúcares.

- 25 Entre otras, incluye especies de bacterias del ácido láctico que pertenecen al género *Lactobacillus*, tales como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus*, etc., bacterias del ácido láctico que pertenecen al género *Lactococcus*, tales como *Lactococcus lactis*, bacterias del ácido láctico que pertenecen al género *Streptococcus*, tales como *Streptococcus salivarius*, bacterias del ácido láctico que pertenecen al género *Leuconostoc*, tales como *Leuconostoc lactis*, bacterias del ácido láctico que pertenecen al género *Bifidobacterium*, tales como *Bifidobacterium longuni* o *Bifidobacterium breve*, y bacterias del ácido láctico que pertenecen al género *Pediococcus*.

- 30 Las bacterias del ácido láctico se pueden utilizar como una mezcla con otros microorganismos, por ejemplo, levaduras.

Catalasa:

Una catalasa es una enzima que cataliza la reacción: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$. El número EC es EC 1.11.1.6.

- 35 Tal como se muestra en el ejemplo práctico 3 de la presente, el uso de una catalasa mejora significativamente el grado de conversión de lactosa en ácido lactobiónico. Además, el uso de una catalasa disminuye la cantidad de H_2O_2 producido durante la conversión de lactosa en ácido lactobiónico.

Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención se añade una catalasa al proceso de la invención.

Tal como se ha descrito anteriormente, cuando la carbohidrato-oxidasa convierte la lactosa en ácido lactobiónico se genera H_2O_2 . El esquema de reacción se puede describir como:

- 40
$$\text{lactosa} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ácido lactobiónico} + \text{H}_2\text{O}_2$$

- 45 La catalasa se puede añadir después de que la carbohidrato-oxidasa haya reaccionado para generar el ácido lactobiónico. Sin embargo, preferentemente, la catalasa se añade junto con la carbohidrato-oxidasa en el paso (i) del proceso. Una ventaja de añadir una catalasa junto con la carbohidrato-oxidasa en el paso (i) del proceso es que la necesidad de oxígeno se puede reducir de manera significativa (hasta un 50%). Por lo tanto, el suministro de oxígeno, por ejemplo, en forma de aire se puede reducir de manera significativa. De hecho, si se añade una cantidad adecuada de catalasa junto con H_2O_2 no es necesario suministrar oxígeno extra, por ejemplo, en forma de aire. Este H_2O_2 extra añadido se puede originar a partir de cualquier fuente comercial.

En consecuencia, una realización preferida es aquella donde esencialmente todo el oxígeno requerido en el paso (ii) del proceso se obtiene mediante la adición de H₂O₂ extra y donde la catalasa genera el oxígeno requerido mediante la conversión del H₂O₂ disponible.

5 En el presente contexto, la expresión “esencialmente todo el oxígeno” se utiliza para describir el suministro de oxígeno requerido para que la reacción enzimática funcione adecuadamente y, en particular, que no sea necesario añadir activamente oxígeno extra durante el paso de incubación, por ejemplo, mezclando de manera continua aire con el sustrato lácteo en incubación.

10 Una realización preferida es aquella donde el pH durante la incubación se mantiene mediante la adición adecuada de una base durante un periodo de tiempo que es lo suficientemente prolongado para obtener un grado de conversión de lactosa en ácido lactobiónico que es al menos un 2.5% superior al de un proceso de control comparativo en el que la única diferencia es que durante la incubación el pH no se mantiene mediante la adición adecuada de una base.

15 En una realización preferida, la catalasa del paso (i) del proceso se añade en una cantidad que reduce la concentración de H₂O₂ en comparación con un proceso similar al que no se añade catalasa.

Preferentemente, la catalasa se añade en una cantidad que también mejora el grado de conversión de lactosa en ácido de tipo lactobionato.

El experto conoce varias catalasas adecuadas. Por ejemplo, la catalasa comercializada Catazyme® de Novozymes A/S.

20 La cantidad de catalasa añadida al proceso tal como se describe en la presente dependerá por lo general de la cantidad de H₂O₂ deseada en el producto final. En consecuencia, dependiendo del producto lácteo concreto de interés, especialmente si el producto lácteo es leche, la cantidad de catalasa añadida al proceso tal como se describe en la presente es una cantidad que es suficiente para obtener una disminución de al menos un 10% en la cantidad de H₂O₂ en comparación con un proceso de control comparativo en el que la única diferencia comparativa es que no se añade la catalasa.

25 Más preferentemente, la cantidad de catalasa añadida al proceso tal como se describe en la presente, es una cantidad que es suficiente para obtener una disminución de al menos un 25% en la cantidad de H₂O₂ en comparación con un proceso de control comparativo en el que la única diferencia comparativa es que no se añade la catalasa, aún más preferentemente la cantidad de catalasa añadida al proceso tal como se describe en la presente es una cantidad que es suficiente para obtener una disminución de al menos un 75% en la cantidad de H₂O₂ en comparación con un proceso de control comparativo en el que la única diferencia comparativa es que no se añade la catalasa.

30 El proceso de control comparativo debería, excepto en el caso de la ausencia de adición de la catalasa, realizarse de manera idéntica (misma oxidasa en misma cantidad, mismo sustrato lácteo, mismo tiempo de incubación, temperatura, presencia de oxígeno y adición de base, etc.) al proceso para mejorar el ácido lactobiónico tal como se describe en la presente. Esto concuerda con la interpretación normal de un control tal como se utiliza en la presente, ya que se realiza el control para identificar el efecto positivo de la adición de catalasa.

En un aspecto independiente de la invención se refiere a un proceso para obtener un mayor rendimiento y/o un menor tiempo de reacción en la conversión enzimática de lactosa en ácido lactobiónico que comprende:

- 40
- i) añadir a un sustrato lácteo una carbohidrato-oxidasa y una catalasa,
 - ii) incubar dicho sustrato lácteo en condiciones que permitan que la carbohidrato-oxidasa convierta la lactosa en ácido lactobiónico,
 - iii) mantener el pH durante la incubación en el intervalo de 3.0 a 9.0 mediante la adición de una base, donde
 - 45 a. la base es Ca(OH)₂, KOH, Mg(OH)₂ o una base débil, es decir, una base que tiene un valor de pK_b de al menos 3.5, siempre que cuando se utilice una base fuerte dicho pH no sea un pH de 7.0, y/o
 - b. el pH se mantiene a un pH de 3.0 a 6.9 o de 7.1 a 9.0,

y, de esta manera, obtener dicho mayor rendimiento y/o menor tiempo de reacción.

50 Todas las realizaciones, tal como se describen en la presente, con respecto al proceso del primer aspecto de la presente invención también son realizaciones preferidas con respecto al proceso de este aspecto independiente de la invención.

Un proceso para generar un producto lácteo

Tal como se ha descrito anteriormente, el proceso de acuerdo con cualquier aspecto de la invención puede ser una parte integrada de cualquier otro proceso, por ejemplo, un proceso de obtención de alimentos, tal como un proceso para obtener un producto lácteo, donde se desea la conversión de lactosa en ácido lactobiónico. Por lo tanto, se puede obtener un producto alimentario final utilizando los presentes procesos. Además, se puede utilizar una composición que comprende ácido lactobiónico generado de acuerdo con los procesos de la presente invención en la obtención de, por ejemplo, un producto lácteo. El experto en la técnica estará familiarizado con los usos relevantes del ácido lactobiónico como tal y una composición que comprende ácido lactobiónico y se hace referencia, por ejemplo, a las publicaciones de la técnica anterior analizadas anteriormente y la solicitud mencionada en los antecedentes de la invención. En consecuencia, una vez que se obtiene una composición que comprende ácido lactobiónico o un producto de ácido lactobiónico *per se* mediante el presente proceso la composición o producto se puede utilizar de cualquier manera adecuada.

La expresión "producto lácteo" se debe entender como cualquier producto lácteo incluido un sustrato lácteo, tal como se ha definido anteriormente. Son ejemplos de productos lácteos válidos en la presente invención productos como el yogur, leche tal como, por ejemplo, leche enriquecida con calcio y queso tal como un queso procesado (por ejemplo, para pizza), queso crema y requesón.

Todas las realizaciones, tal como se describen en la presente, con respecto al proceso de los aspectos previos de la presente invención son también realizaciones preferidas con respecto al proceso de este aspecto de la invención.

Habiéndose descrito de manera general los aspectos y realizaciones del presente proceso, la invención se describirá a continuación utilizando ejemplos específicos. Los ejemplos ilustran además diversas características y ventajas de la invención, pero no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Ejemplos:Ejemplo 1: (Comparativo)

Los experimentos se realizaron en un ensayo a gran escala con una solución de 400 kg de sustrato que consistió en un 6% de filtrado del suero lácteo en polvo (de EPI, Francia). La temperatura se ajustó a 49 °C.

Se utilizó una dosificación de la enzima carbohidrato-oxidasa correspondiente a 40 000 OXU en una solución de 400 litros = 1250 g de enzima en solución. La enzima se obtuvo a partir de *Microdochium nivale* tal como se describe en la solicitud de patente WO 9931990. En la bibliografía, se define normalmente una Unidad de Oxidasa (OXU) como la cantidad enzima que oxida un μmol de lactosa por minuto en un conjunto de condiciones específicas. En los presentes ejemplos, sin embargo, se define una OXU como un mg de enzima lactosa-oxidasa pura, medida respecto a un patrón enzimático.

La reacción se controló monitorizando el pH y la tensión de oxígeno de la solución. Se mezcló aire con el sustrato mediante la recirculación del sustrato al tanque utilizando la turbulencia de la bomba (bomba Landia 5.5 kWh).

Cuando el oxígeno volvió a >90% la reacción ha concluido y el producto se calentó a 85 °C para la inactivación de la enzima. Se tomaron muestras durante la reacción y se calentaron a 85 °C para la inactivación de la enzima.

El pH en la solución del sustrato antes de la adición de la enzima fue 6.52. Después de la finalización (tiempo de reacción de 5 horas) de la reacción, el pH había disminuido a 3.62. El contenido de oxígeno en el sustrato fue de 5.82 mg/L a tiempo = 0 y se redujo en los 5 minutos posteriores a la adición de la enzima hasta menos de 0.5 mg/L. Se aprecian los datos de este ensayo en la siguiente tabla.

Tiempo, minutos	pH	Oxígeno
0	6.52	5.82
5	6.39	0.50
15	6.02	0.49
30	5.63	0.33
60	5.12	0.40
65	5.02	0.40
90	4.82	0.42

120	4.46	0.32
175	4.00	0.12
240	3.70	0.90
250	3.66	1.70
260	3.64	3.66
270	3.64	4.00
280	3.64	4.45
290	3.62	5.45
300	3.62	5.52

El contenido de oxígeno es en mg/L.

El grado de conversión de lactosa en ácido lactobiónico fue de un 41%.

Ejemplo 2 (no perteneciente a la invención)

- 5 Se añadieron 833 g (correspondientes a 26 700 OXU) de carbohidrato-oxidasa a 166 kg de sustrato similar al descrito en el ejemplo 1. La oxidasa utilizada fue la misma que en el ejemplo 1. Se mantuvo el pH en el intervalo de 5-6 mediante la adición de una solución de NaOH 5 N. Cuando el nivel de oxígeno volvió al nivel inicial (después de 5 horas) se había utilizado una cantidad total de 3910 mL de NaOH 5 N para el control del pH. Esta cantidad corresponde a una conversión de >90% de lactosa en ácido lactobiónico de acuerdo con el esquema de reacción:
- 10 $\text{lactosa} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ácido lactobiónico} + \text{H}_2\text{O}_2$, donde el NaOH contrarresta el ácido formado.

Ejemplo 3

Se añadieron 441 g (correspondientes a 14 100 OXU) de solución de carbohidrato-oxidasa y 39 g de catalasa 25L a 166 kg de sustrato similar al descrito en el ejemplo 1. La oxidasa utilizada fue la misma que en el ejemplo 1. La catalasa fue Catazyme[®] de Novozymes A/S.

- 15 Se mantuvo el pH en el intervalo de 5-6 mediante la adición de una solución de NaOH 5 N. Cuando el nivel de oxígeno volvió al nivel inicial (después de 4 horas y 40 minutos) se había utilizado una cantidad total de 4860 g de NaOH 5 N para el control del pH. Esta cantidad corresponde a una conversión de un 100% de lactosa en ácido lactobiónico.

Ejemplo 4:

20 *Objetivo*

El objetivo fue examinar el concepto de la producción de leche enriquecida en Ca mediante una reacción catalizada por la lactosa-oxidasa en leche manteniendo el pH constante mediante la adición de Ca(OH)₂. Se tomaron muestras en diferentes adiciones de base y la leche se trató térmicamente y se evaluó (sabor y estabilidad).

Método

- 25 Sustrato leche desnatada 1.5 kg

Temperatura 50 °C

Se pasó aire fresco sobre la superficie del sustrato agitado.

La enzima fue un preparado de carbohidrato-oxidasa de *M. nivale*, dosificación 0.0850XU/g de solución = 3.98 g de enzima en solución. La oxidasa utilizada fue la misma que en el ejemplo 1.

- 30 Catalasa 25 L dosificación 0.5 g (Catazyme[®] de Novozymes A/S).

La oxidasa y catalasa se añadieron al sustrato y se incubaron tal como se describe más adelante.

El pH se mantuvo constante mediante la adición de Ca(OH)_2 1 N.

Se tomaron muestras de 100 mL después de un consumo de base de 22.2 mL y 41.15 mL, y se trataron térmicamente a 85 °C durante 15 minutos. Después de enfriar, las muestras se evaluaron con respecto al sabor y la estabilidad.

5 *Resultados*

El pH en la leche desnatada es 6.65 a 50 °C, el cual se utilizó como el punto prefijado en la unidad de titulación de pH-stat. El pH en las muestras fue 6.76 y 6.88 medido a la temperatura ambiente.

Ninguna de las muestras presentó gránulos ni tuvo ninguna señal de sedimentos. La última muestra pareció ligeramente más viscosa. El sabor fue bueno para ambas muestras y no se detectaron sabores no deseados.

10 El nivel de Ca en la leche después de la adición de Ca(OH)_2 se incrementó:

Muestra 1: 48%

Muestra 2: 88%

El grado de conversión de lactosa en LBA (siglas en inglés de ácido lactobiónico) estimado a partir de la cantidad de base utilizada fue:

15 Muestra 1: 22.2 mL corresponde a una conversión de un 11%

Muestra 2: 41.15 mL corresponde a una conversión de un 20%

Conclusión

20 Este ejemplo demuestra que se puede producir una leche enriquecida en Ca sin defectos en el sabor mediante la adición de Ca(OH)_2 durante la oxidación enzimática de lactosa a ácido lactobiónico siempre que la adición se base se realice en un equipo de titulación manteniendo el pH constante. Se obtuvo un enriquecimiento de Ca de hasta un 88% en la leche desnatada. Este nivel supera con creces el nivel que se tiene como objetivo normalmente en las bebidas de leche.

Ejemplo 5:

Objetivo

25 El objetivo fue examinar el efecto de utilizar diferentes bases para la regulación del pH durante la oxidación catalizada por la lactosa-oxidasa de lactosa en ácido lactobiónico.

Método

30 Los experimentos se realizaron en un biorreactor a escala de laboratorio con un volumen de trabajo de 1.0 L. El reactor se dotó de dos turbinas Rushton que funcionaban a 1000 rotaciones por minuto (RPM, por sus siglas en inglés). Se midió el oxígeno disuelto mediante un sensor polarográfico de Mettler-Toledo y se controló a un 44.1% (respecto a la saturación con el aire a 38 °C) mediante un control de retroalimentación de dos controladores de flujo de masa que dispensaban respectivamente nitrógeno y aire. La tasa de flujo total se fijó en 200 mL/min.

Sustrato: 1.0 L acuoso 50 g/L de lactosa con tampón $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 50 mM.

Temperatura: 38 °C

35 pH: medido y mantenido constante a 6.40 mediante la adición de base

La enzima utilizada fue un preparado de carbohidrato-oxidasa de *M. nivale*, dosificación 60 OXU/L de solución. La dosificación de catalasa 25L fue de 0.25 g (Catazyme® de Novozymes A/S). La velocidad de la reacción y, por lo tanto, la evolución de la reacción se controlaron monitorizando la cantidad de base utilizada para la regulación del pH.

40 *Resultados*

45 Se utilizaron cinco bases diferentes para la neutralización en experimentos que fueron idénticos en todos los demás aspectos. En los 5 casos, la conversión de lactosa (calculada según la adición de base) fue de un 100%. Sin embargo, el tiempo de reacción total dependió de la alcalinidad de la base utilizada, remítase a la siguiente tabla. Cuando se utilizó una base fuerte como NaOH el tiempo de reacción fue más prolongado que si se utilizó una base débil como NH_3 o CO_3^{2-} . La velocidad de la reacción descendió con el tiempo cuando se utilizó NaOH, mientras que

ES 2 654 066 T3

este no fue el caso cuando se utilizó NH_3 o CO_3^{2-} (antes de que se agotara la lactosa). Esto está reflejado en la actividad residual relativa a la del tiempo = 0 que se proporciona en la tabla.

	Tiempo para la terminación (h)	Actividad oxidasa residual (%)
NaOH 2.0 M	6.33	50
NaOH 1.0 M	6.17	52
NaOH 0.5 M	6.00	62
Na_2CO_3 0.5 M	4.66	>95
NH_3 1.8 M	4.33	>95

Conclusión

- 5 Este ejemplo demuestra que es sumamente ventajoso utilizar una base débil para la neutralización.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para obtener un mayor rendimiento y/o un menor tiempo de reacción en la conversión enzimática de lactosa en ácido lactobiónico, comprendiendo dicho proceso:
 - 5 i) añadir a un sustrato lácteo una carbohidrato-oxidasa,
 - ii) incubar dicho sustrato lácteo en condiciones que permitan que la carbohidrato-oxidasa convierta la lactosa en ácido lactobiónico,
 - 10 iii) mantener el pH durante la incubación en el intervalo de 3.0 a 9.0 mediante la adición de una base débil, es decir, una base que tiene un valor de pK_b de al menos 3.5 y obtener de esta manera dicho mayor rendimiento y/o menor tiempo de reacción.

2. Un proceso para obtener un mayor rendimiento y/o un menor tiempo de reacción en la conversión enzimática de lactosa en ácido lactobiónico, comprendiendo dicho proceso:
 - 15 i) añadir a un sustrato lácteo una carbohidrato-oxidasa y una catalasa,
 - ii) incubar dicho sustrato lácteo en condiciones que permitan que la carbohidrato-oxidasa convierta la lactosa en ácido lactobiónico,
 - 15 iii) mantener el pH durante la incubación en el intervalo de 3.0 a 9.0 mediante la adición de una base, donde
 - a. la base es Ca(OH)₂, KOH, Mg(OH)₂ o una base débil, es decir, una base que tiene un valor de pK_b de al menos 3.5, siempre que cuando se utilice una base fuerte dicho pH no sea un pH de 7.0, y/o
 - b. el pH se mantiene a un pH de 3.0 a 6.9 o de 7.1 a 9.0,
 - 20 y, de esta manera, obtener dicho mayor rendimiento y/o menor tiempo de reacción.

3. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde se añade una catalasa en el paso (i) del proceso en una cantidad que disminuye la cantidad de H₂O₂ producido durante la conversión de lactosa, por ejemplo, en una cantidad suficiente para obtener una disminución de al menos un 10% en la concentración de H₂O₂ en comparación con un proceso de control en el que la única diferencia comparativa es que no se añade la catalasa.

- 25 4. El proceso de las reivindicaciones 3, donde esencialmente la totalidad de la cantidad adecuada de oxígeno requerido en el paso (ii) se obtiene mediante la adición extra de una cantidad adecuada de H₂O₂ y donde la catalasa genera el oxígeno requerido a partir del H₂O₂ disponible.

5. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la base es una base débil, es decir, una base que tiene un valor de pK_b de al menos 3.5, tal como Na₂CO₃ o NH₄OH.

- 30 6. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el sustrato lácteo es leche, suero lácteo o fracciones del suero lácteo o una solución/suspensión de lactosa.

7. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la carbohidrato-oxidasa es una carbohidrato-oxidasa microbiana, tal como una carbohidrato-oxidasa es una carbohidrato-oxidasa obtenida a partir de un hongo que pertenece al género *Microdochium*, más preferentemente donde el hongo es *Microdochium nivale* y aún más preferentemente donde el hongo es *Microdochium nivale* CBS 100236.
- 35 8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el pH se mantiene a un nivel de pH estable tal como se describe en la presente durante un periodo de tiempo de 30 minutos a 48 horas, más preferentemente de 1 hora a 36 horas y aún más preferentemente de 2 horas a 24 horas.

9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde se incluye en el proceso un cultivo iniciador que comprende bacterias del ácido láctico y donde el cultivo iniciador se puede añadir al sustrato lácteo antes o después de que se añada la oxidasa.
- 40 10. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes como una parte integrada de un proceso de obtención de alimentos, tal como un proceso para obtener un producto lácteo tal como un yogur, una leche tal como, por ejemplo, una leche enriquecida en calcio y un queso tal como queso procesados (por ejemplo, para pizza), queso crema y requesón.
- 45 11. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el pH se mantiene a un pH de 3.0 a 9.0, tal como a un pH de 5.5 a 6.9 o a un pH de 6.0 a 9.0.