

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 317**

51 Int. Cl.:

A23C 9/12 (2006.01)

A23J 3/10 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2011 PCT/EP2011/051391**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011 WO11095477**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2011 E 11702026 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2531039**

54 Título: **Uso de sialidasa en tecnología láctea**

30 Prioridad:

03.02.2010 EP 10152527

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

26.02.2018

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**DEKKER, PETRUS JACOBUS THEODORUS;
METSELAAR, RONALD y
SEIN, ARJEN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 656 317 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

Uso de sialidasa en tecnología láctea

Campo de la invención

5 La invención se refiere al uso de sialidasa en yogur batido, cuajado o bebible. La sialidasa se puede usar, por ejemplo, para mejorar la textura de un producto lácteo o para reducir la sinéresis.

Antecedentes de la invención

10 Convencionalmente, las preparaciones lácteas agrias se han fabricado al acidificar leche con un agente acidulante específico para cada producto a una temperatura adecuada. Los productos lácteos fermentados se obtienen al incubar leche o una materia prima derivada de leche con microorganismos particulares tales como bacterias de ácido láctico. A menudo, la materia prima es leche de vaca, pero también se puede usar la leche de otros animales tales como búfalos, caballos, camellos, ovejas o cabras, como también crema o suero. La leche puede ser leche entera, pero también leche parcialmente o completamente desnatada.

Como un ejemplo no limitativo, se describe con más detalle el yogur.

15 Tradicionalmente, el yogur se produce mediante la inoculación de leche con *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* como cultivos de partida. Un método tradicional es conservar la leche a través de acidificación. Antes de la acidificación, se pueden añadir a la leche materias primas necesarias (tales como un edulcorante, agentes saborizantes y texturizadores), y a continuación la leche típicamente se pasteuriza y homogeneiza. La leche se acidifica hasta un pH específico para cada producto. Existen tres tipos de yogur, según su estado físico en el recipiente de venta al público: yogur cuajado, yogur batido y yogur bebible. El yogur cuajado se fermenta después de ser envasado en un recipiente de venta al público y el yogur batido se fermenta casi completamente en un depósito de fermentación antes de que se envase, rompiéndose el gel de yogur durante el batido y el bombeo. El yogur bebible es una variante del yogur batido, en la que la etapa de ruptura del gel es más intensa para dar un producto bebible líquido que a menudo se estabiliza coloidalmente de forma adicional mediante el uso de pectinas. Bastante a menudo, un procedimiento para el yogur bebible implica la mezcladura de una segunda fase acuosa con el yogur batido, que contiene, a modo de ejemplo, sabores, edulcorantes, hidrocoloides, zumo de fruta, etc. Todos los tipos de yogur sufren el fenómeno de la separación de agua (sinéresis).

30 Convencionalmente, el contenido de sustancia seca de la leche se incrementa o disminuye para ajustar la textura de preparaciones lácteas agrias. El contenido de sustancia seca se puede incrementar mediante la retirada de agua mediante evaporación o ultra- o nanofiltración de la leche o mediante el uso de polvos. El contenido de proteína de la materia prima, por ejemplo leche, afecta a la textura del producto final de un modo que permite que la textura de la preparación láctea agria, tal como un producto lácteo fresco agrio, se modifique hasta más espesa o más diluida al incrementar o disminuir el contenido de proteína. El contenido de proteína de la materia prima, por ejemplo leche, se puede incrementar mediante la retirada de agua mediante evaporación o mediante el uso de adición de polvo de proteína. El polvo de proteína se puede originar a partir de leche, tal como leche en polvo, proteína de suero en polvo o proteína caseína en polvo, pero también se pueden utilizar proteínas que no se originan a partir de la leche. La fortificación de la leche usando estos métodos es especialmente útil cuando se produce una preparación láctea agria, como yogur, a partir de leche desnatada o desgrasada. Puesto que el contenido de grasa tiene una gran influencia sobre la textura del producto final, los yogures con bajo contenido de grasa producidos sin adiciones son diluidos. Puesto que la preferencia del mercado son las preparaciones lácteas agrias altamente estructuradas, es ventajoso fortificar la leche antes de la acidificación. Sin embargo, la evaporación o el uso de adición de proteína en polvo incrementa el precio de coste de la preparación láctea agria final. Por otra parte, altas concentraciones de sólidos totales añadidas a la leche antes de la fermentación pueden dar como resultado condiciones inhibitorias del crecimiento bacteriano, conduciendo a tiempos de fermentación prolongados y poco desarrollo de ácido.

45 Una de las medidas usadas frecuentemente para estabilizar el producto y mejorar el espesamiento es la adición de estabilizadores o texturizadores (almidón químicamente modificado, almidón natural, carragenina, goma guar, pectina, gelatina, etc.) (Everett, D. W., & McLeod, R. E. (2005) Int. Dairy J. 15, 1175-1183). Sin embargo, esos aditivos alimentarios pueden afectar adversamente al sabor y el aroma verdaderos del yogur. Además, el uso de esos hidrocoloides da como resultado una imagen no natural, y no está permitido en todos los países. De ahí que, en el último caso, los fabricantes de yogur tengan que hacer uso de diferentes tecnologías para garantizar una textura aceptable de los productos finales. Como la estructura de los agregados proteínicos en el yogur bebible está tan gravemente dañada, se añaden habitualmente hidrocoloides tales como pectinas para estabilizar coloidalmente los flóculos proteínicos para formar un producto homogéneo y uniforme.

El uso de cultivos iniciadores de yogur que contienen cepas que producen exopolisacáridos (*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* o ambas) es una alternativa prometedora para texturizadores no lácteos como los

mencionados anteriormente. Los exopolisacáridos procedentes de bacterias de yogur son polisacáridos microbianos, sintetizados intracelularmente y secretados extracelularmente, que pueden funcionar como constituyentes formadores de textura. Los exopolisacáridos que se producen in situ, es decir, a través de inoculación de leche con un cultivo iniciador de yogur que contiene cepas productoras de exopolisacáridos, tienen la capacidad de retener agua y de ese modo evitar la sinéresis, para mejorar la viscosidad y de ese modo garantizar una buena textura final, y para reemplazar a la grasa sin afectar a la sensación bucal cuando el yogur se come. Sin embargo, la producción de exopolisacáridos en leche mediante bacterias de ácido láctico termófilas tales como *Streptococcus thermophilus* es baja e inestable cuando se lleva a cabo usando las tecnologías de procedimiento discontinuo tradicionales para la producción de yogur. Adicionalmente, las bacterias de ácido láctico que producen cantidades excesivas de exopolisacáridos a menudo son pobres en la acidificación. Por lo tanto, el procedimiento de elaboración de yogur se frena, lo que no es deseable en un procedimiento industrial.

En el pasado, se han descrito procedimientos ayudados por enzimas para incrementar la estructura de preparaciones lácteas agrias. Se conoce el uso de una enzima transglutaminasa modificadora de la textura en la fabricación de preparaciones lácteas, particularmente preparaciones lácteas agrias. En preparaciones lácteas agrias, tales como productos lácteos frescos agrios (yogur, yogur de tipo cuajado, viili, leche fermentada), el uso de una enzima transglutaminasa sirve para endurecer la textura, modificar la textura para que sea más fina y reducir la sinéresis. El documento WO2007/060288 y las referencias del mismo describen el uso de transglutaminasa durante la acidificación de un producto lácteo. Una desventaja principal del uso de transglutaminasa en la producción de preparaciones lácteas agrias es su alto coste. Puesto que la transglutaminasa es difícil de producir, el precio de coste de esta enzima es alto.

A pesar de los esfuerzos para modificar la textura de preparaciones lácteas agrias, especialmente preparaciones con bajo contenido de grasa, todavía no se ha desarrollado un método satisfactorio que pueda reducir el uso común de la costosa adición de leche en polvo desnatada en la preparación de preparaciones lácteas agrias. Por otra parte, no se ha desarrollado un método satisfactorio para mejorar una característica de las preparaciones lácteas agrias actuales (es decir sin reducir el uso común de costosos aditivos de mejora de la textura), tales como un producto lácteo agrio como yogur batido, yogur cuajado o yogur bebible.

Sumario de la invención

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que la adición de una enzima sialidasa en el procedimiento de elaboración de un yogur o yogur bebible permite una reducción en el contenido de proteína o permite una reducción en la cantidad de estabilizadores o texturizadores (tales como pectina) usados, sin daño a o efecto adverso sobre la textura del yogur o yogur bebible. Por lo tanto, el uso de sialidasa puede reducir la adición de proteína adicional sin afectar a la textura final. Alternativamente, la firmeza o la viscosidad se pueden incrementar o la sinéresis se puede disminuir mediante la adición de una enzima sialidasa. La sialidasa se puede añadir a la leche e incubar a una temperatura adecuada, antes de un tratamiento térmico opcional. Alternativamente, la sialidasa se puede añadir después del tratamiento térmico opcional de la leche, durante la acidificación fermentativa. La sialidasa también se puede usar para pretratar una fracción del yogur o yogur bebible, o la proteína láctea adicional, que se añade durante la elaboración del yogur o yogur bebible.

Descripción de las figuras

Figura 1: Medidas de Brookfield después de 1 semana para yogur batido. Yogur tratado con sialidasa (puntos) en comparación con yogur de control no tratado (triángulos).

Descripción detallada de la invención

La κ -caseína es parte de las micelas de caseína de la leche y es una glicoproteína que contiene residuos de ácido siálico en posiciones conocidas (Cases y cols, J Food Sci (2003) 68, 2406-2410). Se sabe que existe una microheterogeneidad en la población de κ -caseína debido a diferencias en la glicosilación y el contenido de ácido siálico (Robitaille y cols, Food Res Int (1995) 28, 17-21). Varios estudios describen el efecto de la retirada de residuos de ácido siálico usando la sialidasa derivada de *Clostridium perfringens*. Parámetros que se examinaron son la estabilidad de la micela de caseína contra la degradación térmica y por quimosina. Gibbons y cols (Biochim Biophys Acta (1962) 56, 354-356) usaron soluciones de κ -caseína purificada y mostraron que la retirada de residuos de ácido siálico no afecta a la acción de la quimosina sobre la κ -caseína. Vreeman y cols (Biochem J (1986) 240, 87-97) compararon el comportamiento cinético de la quimosina hacia fracciones de κ -caseína purificadas con o sin glicosilación y encontraron que la κ -caseína desglucosilada es un sustrato mejor para la quimosina. Además, Minkiewicz y cols (Pol J Food Nutr Sci (1993), 243, 39-48), usando un sistema de micelas de caseína reconstituidas artificial, mostraron que los residuos de ácido siálico contribuyen a la estabilidad térmica de las micelas de caseína, lo que fue confirmado más tarde por Robitaille y cols (Food Res Int (1995) 28, 17-21). En un estudio separado, Robitaille y cols (Food Res Int (1993) 26, 365-369) mostraron que la retirada de residuos de ácido siálico de κ -caseína no tiene un efecto significativo sobre el tiempo de coagulación, pero que la firmeza de la cuajada disminuía.

El documento WO02074097 describe la desglicosilación enzimática parcial de kappa-caseína en presencia de sialidasa (neuraminidasa) para promover la coagulación de leche para la fabricación de queso. Sin embargo, ninguna de estas publicaciones describe o sugiere el uso de sialidasa para la producción de preparaciones lácteas agrias.

5 La Solicitud de patente WO2008/101893 describe la producción de una nueva sialidasa a partir del uso del hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* y el uso de la misma en aplicaciones alimentarias. Sin embargo, no se ha descrito el uso específico de esta sialidasa para la producción de preparaciones lácteas agrias.

10 La presente invención se refiere a un método para la fabricación de yogur o yogur bebible con el uso de una enzima sialidasa. El método permite la modificación de la textura más ventajosamente y fácilmente que los métodos conocidos. Además, el método permite una reducción (significativa) en el contenido de proteína añadido o permite una reducción en la cantidad de estabilizadores o texturizadores añadidos sin daño a o efecto adverso en la textura del yogur o yogur bebible.

15 Esto conduce a la fabricación a un nivel inferior de coste de la materia prima que en la fabricación a un nivel convencional de proteína.

20 Sin querer limitarse por una teoría, se cree que en una micela de caseína, los residuos de ácido siálico en el exterior de la micela, contribuyendo a la carga global de la micela de caseína. Cuando la sialidasa retira el ácido siálico de la micela de caseína, también retira la carga negativa de la superficie de la micela, cambiando la naturaleza coloidal de la micela de caseína. Con una carga diferente, los procesos de agregación inducidos por cambios de pH también cambian y, como consecuencia, un tipo diferente de agregado se puede formar durante la acidificación. Esto da como resultado una red proteínica más resistente después del tratamiento con sialidasa – o una red igualmente resistente con menos proteína. Y este efecto es independiente del modo de acidificación, bien fermentativa o bien química.

25 En una primera realización, la invención proporciona un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido.

30 El término 'agente acidificante' se refiere a un iniciador o cultivo microbiológico, un agente acidificante químico o mezclas de los mismos. La acidificación se puede realizar al fermentar con al menos un cultivo específico para el producto y/o al usar agentes acidificantes químicos, tales como ácidos orgánicos o inorgánicos. El iniciador o cultivo microbiano puede contener una o más especies microbianas diferentes. Más preferiblemente, el iniciador o cultivo microbiano consiste en una o más especies bacterianas, más preferiblemente una o más especies bacterianas de ácido láctico.

35 Se pueden preparar preparaciones lácteas agrias con el uso de bacterias, por ejemplo con bacterias de ácido láctico procedentes de las especies *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* y spp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. tal como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* y/o *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter orientalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium* sp. y/o especies de *Pediococcus* o combinaciones de un número de especies. Como ejemplo, el yogur se prepara típicamente mediante la inoculación de leche con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* como cultivos iniciadores. Como otro ejemplo, el twarog se prepara típicamente al usar *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc* sp. o *Streptococcus thermophilus*. El experto, basándose en el conocimiento de un producto particular, es capaz de seleccionar el tipo o los tipos correctos de cultivo o cultivos. La especie en un cultivo iniciador puede no estar totalmente definida y también puede contener hongos, como levaduras u hongos filamentosos.

40 El experto es capaz de seleccionar el iniciador o cultivo microbiológico más adecuado.

45 El agente acidificante químico puede ser un ácido, más preferiblemente un ácido orgánico, como ácido cítrico, acético, fórmico, propiónico o láctico u otro ácido o combinaciones de los mismos. Alternativamente, la acidificación se puede realizar usando glucono-delta-lactona. Con la excepción de la adición de enzima sialidasa y un ajuste opcional del contenido de proteína de la fuente de proteína de la materia prima (es decir el material que comprende proteína que comprende ácido siálico, tal como, pero no limitado a, leche o leche reconstituida; la materia prima es el material que se usa para preparar el yogur o yogur bebible), la acidificación puede tener lugar del mismo modo que para productos de yogur o yogur bebible correspondientes fabricados convencionalmente mediante el uso de un agente acidificante adecuado para cada caso particular y/o cada producto particular y las condiciones de reacción adecuadas. El tratamiento de la materia prima (por ejemplo leche o leche reconstituida) con sialidasa se puede producir antes de un tratamiento térmico opcional. La leche tratada con sialidasa se puede calentar antes de la acidificación. Alternativamente, la sialidasa se puede añadir después de un tratamiento térmico opcional. A continuación, la sialidasa se puede usar durante la acidificación usando un agente acidificante de elección. En una realización preferida, el tratamiento con sialidasa se realiza antes de la acidificación, es decir, en una realización

preferida, la invención proporciona un método para preparar yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido, en donde dicha sialidasa se añade antes de que se añada dicho agente acidificante y en donde dicha sialidasa y dicha proteína que comprende ácido siálico se incuban durante un tiempo suficiente para obtener ácido siálico libre y, después de obtener suficiente ácido siálico libre, se añade dicho agente acidificante.

La fuente de proteína usada en la fabricación de un yogur o yogur bebible puede ser una proteína que contiene ácido siálico. Una 'proteína que comprende ácido siálico' es una proteína, habitualmente de origen animal, que contiene uno o más grupos ácido siálico ligados a una cadena peptídica. Otras fuentes de una proteína que comprende sialidasa son plantas, hongos, levaduras y bacterias. La ligazón del ácido siálico a la cadena peptídica puede ser directa o a través de grupos glicosilo. En general, las 'proteínas que comprenden ácido siálico' están glicosiladas y contienen ácidos siálicos terminales con enlace α 2-3 o enlace α 2-6. La 'proteína que comprende ácido siálico' puede ser un péptido pequeño tal como glicomacropéptido (GMP) o proteosa peptona, o una proteína mayor tal como kappa-caseína. Típicamente, la proteína que comprende ácido siálico es parte de una materia prima, es decir el material que se usa como una base para preparar un yogur o yogur bebible, tal como, pero no limitado a, leche o leche reconstituida.

Típicamente, las condiciones de reacción exactas se seleccionan basándose en el tipo específico de yogur o yogur bebible que se produzca. Estas condiciones se eligen para permitir que la acidificación avance. Al mismo tiempo, las condiciones son preferiblemente tales que la sialidasa aplicada sea activa durante al menos una cierta cantidad de tiempo para permitir que realice su reacción sobre la proteína que comprende ácido siálico. La acidificación de una preparación láctea agria típica como yogur empieza mediante la adición del cultivo iniciador a leche pasteurizada a 42 grados Celsius, e incubación durante 4-5 h. Durante este período, el pH de la preparación disminuirá de 6,5-6,7 a 4,0-4,5. La sialidasa se puede añadir al principio o durante el procedimiento de acidificación.

Cuando no hay suficiente tiempo durante el procedimiento de acidificación, p. ej. cuando la acidificación se realiza mediante la adición de ácido, el tratamiento con sialidasa se realiza preferiblemente antes de la acidificación. Típicamente, el tratamiento con sialidasa llevará como mínimo 1 hora a temperatura elevada como 37 grados Celsius, o un período más largo a una temperatura reducida como 8 grados Celsius. Obviamente, el período de incubación se puede ajustar al incrementar o disminuir la dosificación de sialidasa. Esto también se aplica a procedimientos en los que la sialidasa necesita ser inactivada mediante tratamiento térmico. El tratamiento térmico realizado habitualmente antes de la fermentación de leche para yogur (tal como 5 minutos 90-95°C) es suficiente para inactivar la enzima. En otra realización preferida más, la invención proporciona por lo tanto un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido, que comprende las etapas de:

- incubar una materia prima adecuada (por ejemplo leche o leche reconstituida) con sialidasa bajo condiciones tales que se obtenga ácido siálico libre
- someter la materia prima tratada con sialidasa a un tratamiento térmico (por ejemplo 2-5 minutos a 90-95 grados Celsius)
- añadir un agente acidificante a la materia prima tratada con sialidasa y térmicamente
- permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido.

Dependiendo de la preparación particular que se prepare, se podría incluir una etapa de recuperación. Como un ejemplo, se describe la producción de yogur. Existen tres tipos de yogur, según su estado físico en el recipiente de venta al público: yogur cuajado, yogur batido y yogur bebible. Para el yogur cuajado, la leche inoculada se fermenta después de envasarse en un recipiente de venta al público. El yogur batido se fermenta casi totalmente en un depósito de fermentación antes de envasarse, rompiéndose el gel de yogur durante el batimiento y el bombeo. Si se produce yogur batido, el yogur producido necesita ser transferido a su envase final (es decir necesita recuperarse). Si se produce yogur cuajado, esta recuperación no será necesaria. En otras palabras, que una etapa de recuperación sea necesaria o no depende de la preparación específica producida. El experto es perfectamente capaz de determinar si se necesita incluir o no una etapa de recuperación.

Para el yogur bebible, el procedimiento sigue aproximadamente la misma línea que el procedimiento para yogur batido. Sin embargo, después de la fermentación, el gel de yogur se rompe y se somete a un tratamiento de cizalladura sustancial que descompone la estructura completamente. A fin de obtener un producto estable, se puede añadir un estabilizador tal como pectina, disuelto en otra fase acuosa. El volumen relativo de esta fase acuosa separada puede ser sustancial, mucho mayor de 50 por ciento en volumen. Esta fase puede consistir en agua (acidificada) o podría contener otros constituyentes tales como aromas, zumo de fruta, edulcorantes, fibras,

5 hidocoloides adicionales y almidones (modificados), etc. Los yogures bebibles también se pueden preparar a partir de leche que se diluye con una fase acuosa (agua, opcionalmente con edulcorante y otros ingredientes opcionales) antes de que se fermente. De un modo similar, se preparan bebidas lácteas acidificadas, donde en lugar de una fermentación con bacterias de ácido láctico, la acidificación se realiza al añadir un ácido químico, tal como ácido láctico, ácido cítrico o cualquier otro tipo de ácido de calidad alimentaria.

10 En un aspecto de la invención, una fracción de la materia prima se puede tratar separadamente usando sialidasa y añadirse al producto antes o después (preferiblemente antes) de la acidificación. Esta fracción se puede procesar en primer lugar adicionalmente antes de la adición a la preparación final. Por ejemplo, se puede usar sialidasa para tratar leche desnatada antes de secar la leche desnatada tratada con sialidasa produciendo leche en polvo desnatada tratada con sialidasa, que se puede añadir a una preparación para producir un yogur o yogur bebible después de la acidificación usando un agente acidificante de elección. O una proteína que comprende ácido siálico (preaislada) se trata con sialidasa para producir una proteína tratada y usar esta proteína en la preparación de un yogur o yogur bebible.

15 Por lo tanto, la invención también proporciona un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible, en donde al menos parte de dicha proteína que comprende ácido siálico se preincuba con dicha sialidasa para obtener proteína tratada, recuperando opcionalmente la proteína tratada, comprendiendo además añadir la proteína tratada a una materia prima láctea usada para preparar dicho yogur o yogur bebible.

Dicho alternativamente, la invención proporciona un método para preparar un yogur o yogur bebible a partir de una proteína que comprende ácido siálico, que comprende las etapas de:

- 25
- incubar al menos parte de la proteína que comprende ácido siálico con una sialidasa para obtener proteína tratada
 - opcionalmente recuperar la proteína tratada
 - añadir proteína tratada a una materia prima adecuada para preparar un yogur o yogur bebible
 - añadir un agente acidificante
- 30
- dejar que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido. Preferiblemente, dicha materia prima comprende proteína que comprende ácido siálico. Opcionalmente, se puede añadir sialidasa adicional antes o durante la acidificación.

35 La invención también proporciona un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido, en donde dicha proteína que comprende ácido siálico está presente en una materia prima láctea, opcionalmente recuperar la materia prima láctea tratada, secar la materia prima láctea tratada y añadir dicha materia prima láctea tratada secada a una materia prima láctea (no tratada) usada para preparar dicho yogur o yogur bebible.

40 Dicho alternativamente, la invención también proporciona un método para preparar un yogur o yogur bebible a partir de una proteína que comprende ácido siálico, que comprende las etapas de:

- incubar una materia prima láctea con sialidasa para obtener una materia prima láctea tratada
 - opcionalmente recuperar la materia prima láctea tratada
 - opcionalmente secar la materia prima láctea tratada
- 45
- añadir dicha materia prima láctea tratada (opcionalmente secada) a una materia prima láctea (no tratada)
 - añadir un agente acidificante
 - permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido. Preferiblemente, dicha materia prima comprende proteína que comprende ácido siálico. Opcionalmente, se puede añadir sialidasa adicional durante la acidificación. Preferiblemente, la materia prima láctea es leche o leche reconstituida.
- 50

En un método según la invención, leche en bruto como tal o preprocesada y/o fraccionada del modo deseado constituye habitualmente la fuente de proteína. En este contexto, una materia prima en general y una leche en bruto específicamente se refiere, por ejemplo, a leche obtenida de un animal, p. ej. una vaca, una búfala, una oveja o una cabra, como tal o procesada de diversos modos. La leche se puede procesar, a modo de ejemplo, al retirar grasa o lactosa de ella, dando como resultado leche libre de grasa, con bajo contenido de grasa, libre de lactosa o con bajo contenido de lactosa. En este contexto, leche en bruto también se refiere a leches preprocesadas o no procesadas usadas en la fabricación de yogur, viili y leche fermentada, por ejemplo.

La leche usada para la preparación de un yogur o yogur bebible también se puede obtener a partir de una fracción de leche preprocesada. Por ejemplo, la leche se puede obtener al disolver leche en polvo desnatada en un líquido (es decir y obtener leche reconstituida) antes del tratamiento con sialidasa y la acidificación con un agente acidificante de elección. En otras palabras, la materia prima preferiblemente consiste en leche, tal como leche desnatada, leche entera, crema o cualquier combinación de las mismas. En realizaciones adicionales, la materia prima láctea se prepara, totalmente o en parte, a partir de fracciones de leche deshidratada, tales como, p. ej., leche en polvo entera, leche en polvo desnatada, caseína, caseinato, proteína de leche total o suero de mantequilla en polvo, o cualquier combinación de los mismos. En otras palabras, la materia prima se puede seleccionar de leche desnatada, leche entera, crema o cualquier combinación de las mismas o se prepara totalmente o en parte a partir de fracciones de leche deshidratada, tales como, p. ej. leche en polvo entera, leche en polvo desnatada, caseína, caseinato, proteína de leche total o suero de mantequilla en polvo, o cualquier combinación de los mismos.

La invención proporciona por lo tanto un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido, en donde dicha proteína que comprende ácido siálico está presente en una materia prima láctea, tal como leche o leche reconstituida. Preferiblemente, dicha materia prima láctea es leche con bajo contenido de grasa, libre de grasa, con bajo contenido de proteína o libre de proteína.

La leche se puede fraccionar, a modo de ejemplo por medio de separación cromatográfica y/o micro-, nano- o ultrafiltración, en fracciones que contienen diferentes cantidades de diferentes componentes, y las fracciones, a su vez, se pueden usar para ajustar el contenido de proteína de la leche como tal o como diferentes mezclas de la misma.

Según se describe anteriormente, se ha encontrado ahora sorprendentemente que la adición de enzima sialidasa en el procedimiento de elaboración de un yogur o yogur bebible permite una reducción en el contenido de proteína del yogur o yogur bebible o permite una reducción en la cantidad de estabilizadores y/o texturizadores, sin ningún daño a o efecto adverso sobre la textura de la preparación. Por lo tanto, el uso de sialidasa puede reducir la adición de proteína adicional a una preparación láctea agria sin afectar a la textura final del yogur o yogur bebible.

Esto es muy útil, por ejemplo, en la preparación de yogur con bajo contenido de grasa o libre de grasa, es decir un yogur que se produce a partir de leche desnatada o desgrasada. Puesto que el contenido de grasa tiene una gran influencia sobre la textura del producto final, los yogures con bajo contenido de grasa o libres de grasa sin adiciones son ligeros. Puesto que la preferencia del mercado está en preparaciones lácteas agrias muy estructuradas, es ventajoso fortificar la leche antes de la acidificación. Esta fortificación se obtiene típicamente mediante la adición de proteína o texturizadores como hidrocoloides. Debido a la adición de sialidasa, la cantidad de proteína o texturizador (por ejemplo la cantidad de pectina, almidón o gelatina) se puede reducir sin afectar negativamente a las características del producto final.

Preferiblemente, dicha reducción es al menos 10%, 20% o 30%. Más preferiblemente, es una reducción en la cantidad añadida de proteína o texturizador o estabilizador de al menos 40, 50 o 60%.

Con respecto a los estabilizadores y/o texturizadores, se proporciona el siguiente ejemplo. Los productos lácteos acidificados y los yogures bebibles se preparan típicamente al usar pectina para estabilizar los flóculos de proteína y prevenir la sinéresis. Una bebida láctea acidificada se prepara, por ejemplo, al añadir solución de pectina+azúcar a leche reconstituida o leche en bruto (opcionalmente diluida con agua). Lo resultante se mezcla. El pH se lleva hasta 3,8-4,2 al añadir ácidos y/o zumo de fruta. La mezcla obtenida se homogeneiza, se calienta hasta 90 grados Celsius durante de 5 a 15 segundos, se enfría hasta temperatura ambiente y se carga asépticamente. Añadir una sialidasa al procedimiento (por ejemplo a la leche reconstituida o la leche en bruto (opcionalmente diluida con agua)) permite la reducción en la cantidad de pectina añadida.

Por lo tanto, la invención proporciona un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido, en donde dicha proteína que comprende ácido siálico está presente en una materia prima láctea, tal como leche o leche reconstituida, en donde dicha materia prima láctea tiene un contenido de proteína y/o grasa reducido. Dicho alternativamente, la invención proporciona un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o

yogur bebible producido, en donde dicha proteína que comprende ácido siálico está presente en una materia prima láctea que tiene un contenido de proteína y/o grasa reducido, tal como leche con proteína reducida, leche con bajo contenido de grasa, leche libre de grasa, leche reconstituida con proteína reducida, leche reconstituida con bajo contenido de grasa o leche reconstituida libre de grasa.

5 Un yogur o yogur bebible con 'proteína reducida' también puede abarcar preparaciones lácteas agrias en las que se añade menos proteína adicional en el procedimiento de fabricación, en comparación con yogur o yogur bebible convencional. En esta realización, el tratamiento de la proteína que comprende ácido siálico con sialidasa mejorará la estructura del yogur o yogur bebible con proteína reducida de tal modo que no se requiere proteína adicional o se requiere proteína adicional reducida para alcanzar una estructura aceptable del yogur o yogur bebible final.

10 El contenido de proteína para un producto del tipo del yogur puede ser tan bajo como 0,5% en peso. Más preferiblemente, el contenido de proteína está dentro del intervalo de 2 a 3% en peso. No existe un límite superior real para el contenido de proteína pero en la práctica raramente se superará un contenido de proteína de 10%. En una realización preferida, el contenido de proteína estará entre 0,5 - 10% en peso.

15 En otra realización de la invención, el método comprende además una etapa de disminuir el contenido de proteína de la fuente de proteína mediante la adición de un líquido adecuado para ese propósito. En este caso, el método comprende las siguientes etapas: adición de un líquido adecuado para disminuir el contenido de proteína, tal como permeado de leche, suero, una fracción de lactosa, un concentrado de la misma o una mezcla constituida por permeado de leche, suero, fracción de lactosa y/o concentrados de la misma, a una fuente de proteína, adición de una enzima sialidasa y un agente acidificante a la fuente de proteína, acidificación y recuperación del producto obtenido. Una ventaja de un método según la invención es que permite la utilización de leche que tiene un contenido de proteína (añadida) inferior que en el uso de los métodos conocidos descritos anteriormente.

20 En otra realización más, la invención proporciona un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido, en donde dicho yogur o yogur bebible es un yogur o yogur bebible que tiene al menos una característica mejorada. Preferiblemente, dicha al menos una característica mejorada se selecciona de una estructura mejorada y una textura mejorada, una viscosidad incrementada, una sensación bucal mejorada y una sinéresis disminuida.

25 Los términos 'estructura mejorada' y 'textura mejorada' se refieren a una calidad incrementada de la apariencia y la sensación de un producto. Con respecto a la presente invención, 'estructura mejorada' y 'textura mejorada' se relacionarán generalmente con una viscosidad incrementada del yogur o yogur bebible final.

30 El término 'viscosidad incrementada' se refiere a una resistencia incrementada de una sustancia a fluir. Con respecto a la presente invención, la viscosidad se puede medir usando métodos descritos en los ejemplos de esta solicitud, incluyendo el uso de un instrumento de Brookfield o un reómetro, o cualquier otro método convencional para medir la viscosidad conocido en la técnica, tal como un embudo de Posthumus o un consistómetro de Bostwick.

35 El término 'sensación bucal' se refiere a la textura o estructura de una sustancia según se percibe en la boca. La sensación bucal se puede determinar usando un grupo de personas entrenadas organolépticamente o mediante un grupo (mayor) de personas no entrenadas.

40 El término 'sinéresis' se refiere a un procedimiento en el que un gel se contrae en reposo y exuda líquido. La sinéresis se puede cuantificar al medir la cantidad de líquido exudado en comparación con la cantidad total de la preparación láctea agria. Otros métodos para medir la sinéresis en preparaciones lácteas agrias se han descrito en la técnica (Amatayakul y cols. (2006) Int. J. Dairy Technol. 59, 216-221).

45 Si una cierta característica se mejora o no se determina al comparar la característica particular de un yogur o yogur bebible obtenido mediante un método de la invención con la misma característica de un yogur o yogur bebible no tratado con sialidasa que por lo demás se prepara idénticamente.

50 La invención proporciona así un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido, en donde dicho yogur o yogur bebible es un yogur o yogur bebible que tiene al menos una característica mejorada en comparación con yogur o yogur bebible preparado sin sialidasa pero por lo demás comparable.

55 Según se describe, el uso de sialidasa para la preparación de yogur o yogur bebible conducirá a la reducción de la sinéresis. En una realización alternativa, la invención proporciona por lo tanto un método para reducir la sinéresis en un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa o una proteína tratada con sialidasa a un producto lácteo y por lo demás producir dicho yogur o yogur bebible según cualquier método conocido. En el caso del yogur, este método comprendería la acidificación y opcionalmente la recuperación del producto lácteo agrio.

Con respecto al orden en el que se añaden una sialidasa y un agente acidificante a una materia prima láctea, se apunta que se pueden añadir al mismo tiempo (es decir simultáneamente) a través de la misma entrada o a través de dos entradas diferentes. Por otra parte, es posible añadir en primer lugar la sialidasa y permitir que realice su acción durante una cierta cantidad de tiempo después del cual se añade el agente acidificante, opcionalmente después de una etapa de calentamiento que desnaturaliza la proteína de suero, pasteuriza la leche e inactiva la sialidasa. Por otra parte, es posible añadir la sialidasa durante la acidificación.

La invención proporciona así un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido, en donde dicha sialidasa y dicho agente acidificante se añaden simultáneamente o en donde dicha sialidasa se añade durante la acidificación. Preferiblemente, la sialidasa también se puede añadir antes de la acidificación.

En una realización preferida más, la preparación láctea agria producida según cualquiera de los métodos descritos anteriormente es yogur o yogur bebible.

El yogur puede ser yogur bien cuajado o bien batido.

En una realización preferida alternativamente adicional, la preparación láctea agria producida según cualquiera de los métodos descritos anteriormente es yogur bebible.

Con respecto a la sialidasa, se proporciona la siguiente información.

Las sialidasas (neuraminidasas, EC 3.2.1.18) hidrolizan el enlace ácido siálico no reductor terminal en glicoproteínas, glicolípidos, gangliósidos, polisacáridos y moléculas sintéticas. Las sialidasas son comunes en animales del linaje de deuteróstomos (Echinodermata a Mammalia) y también en diversos microorganismos que existen principalmente como comensales o patógenos de animales. Las sialidasas, y sus sustratos sialílicos, parecen estar ausentes de las plantas y la mayoría de otros metazoos. Incluso entre las bacterias, la sialidasa se encuentra irregularmente de modo que las especies relacionadas o incluso las cepas de una especie difieren en esta propiedad. Las sialidasas también se han encontrado en virus y protozoos.

Se detectó actividad de sialidasa en células, tejidos y fluidos corporales humanos diversos. En general, las sialidasas de mamífero son inestables y, en el caso de enzimas unidas a la membrana, se vuelven más lábiles cuando se disocian de la membrana. Se encuentra actividad de sialidasa en el citosol, los lisosomas y las membranas plasmáticas de células. Las sialidasas de la membrana plasmática se denominan habitualmente 'sialidasa de gangliósido' y su especificidad enzimática está muy restringida a gangliósidos membranares. Las salivasas citosólicas y lisosómicas hidrolizan glicoproteínas y oligosacáridos. Las sialidasas humanas están presentes en un complejo de alta masa molecular con varias otras proteínas, incluyendo catepsina A y β -galactosidasa. La complejación multiproteínica es importante para la integridad y la actividad catalítica *in vitro* de la sialidasa.

La sialidasa también se encuentra en una variedad de cepas bacterianas, incluyendo especies de *Clostridium*, *Vibrio*, *Corynebacterium*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Pasteurella*, *Salmonella*, *Arthrobacter*, *Actinomyces* y *Streptomyces*. Las sialidasas microbianas se pueden excretar en el medio extracelular, pueden estar unidas a la membrana, pueden ser periplásmicas o citoplásmicas dependiendo de la especie en la que se expresan y su diversa función.

Las sialidasas bacterianas muestran diversa especificidad para el sustrato con un óptimo de pH entre 5-7. La especificidad de conexión al sustrato también difiere entre sialidasas bacterianas. En general, existe una escisión preferente de ácidos siálicos terminales conectados α 2-3 por encima del isómero α 2-6, aparte de algunas excepciones.

Las sialidasas bacterianas se pueden clasificar en dos familias dependiendo del tamaño molecular y el requerimiento de Ca^{2+} . Las sialidasas con un peso molecular de alrededor de 42 kDa pertenecen a una familia de sialidasas "pequeñas". Incluyen enzimas procedentes de *Clostridium perfringens*, *C. sordelli*, *Salmonella typhimurium* y *Micromonospora viridifaciens* y no requieren el catión para la actividad. Se ha observado una homología de secuencia significativa entre estas enzimas y comparten una estructura terciaria similar. Las sialidasas con un peso molecular superior pertenece a una familia de sialidasas "grandes", por ejemplo *Vibrio cholerae*, y requieren Ca^{2+} para una actividad completa. El análisis de las secuencias revela poca homología con sialidasa viral y bacteriana "pequeña".

Muchas cepas no patógenas productoras de sialidasa se han identificado en aislados fecales y orales. En el intestino grueso humano estas bacterias pertenecen a las bacterias entéricas y comprenden anaerobios, p. ej. *Bacteroides* sp., *E.coli*, *Enterococcus faecalis* y un grupo de bacterias degradadoras de oligosacáridos de mucina incluyendo *Ruminococcus* y *Bifidobacterium* sp, que pueden degradar completamente las glicoproteínas presentes en el moco

en la superficie de la mucosa normal. La producción de sialidasa dentro del grupo degradador de mucina es constitutiva y actúa sobre sialoglicoproteínas y gangliósidos.

Los microorganismos que contienen sialidasas viven a menudo en contacto con animales superiores como hospedadores, por ejemplo como parásitos. Aquí pueden tener una función nutricional que permita la eliminación de ácidos siálicos de los hospedadores para el uso como una fuente de carbono. Para algunos patógenos microbianos, se cree que las sialidasas actúan como factores de virulencia. Sin embargo, el papel de las sialidasas como factores en la patogénesis es controvertido. Por una parte, confirman el impacto de especies microbianas patógenas como *Clostridium perfringens*. Por otra parte, estas enzimas son factores comunes en el catabolismo de los carbohidratos de muchas especies no patógenas, incluyendo animales superiores. Sin embargo, no ejercen un efecto tóxico directo (Traving y cols Cell Mol Life Sci (1998) 54, 1330-1349). En cambio, su efecto perjudicial depende de la cantidad masiva de enzima que se libera en el hospedador junto con otros factores tóxicos durante la inducción mediante ácidos siálicos del hospedador bajo condiciones no fisiológicas.

En contraste con las de mamífero, bacterianas y virales, las sialidasas fúngicas se han estudiado mucho menos. Sin embargo, recientemente, una sialidasa secretada procedentes del hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* se ha sobreexpresado en el hongo de calidad alimentaria *Aspergillus niger* y está disponible para el uso en aplicaciones alimentarias (documento WO08101893).

Preferiblemente, un método según la invención usa una sialidasa bacteriana o fúngica.

En una realización preferida, la invención proporciona un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido, en donde dicha sialidasa es una sialidasa fúngica, más preferiblemente una sialidasa de *Penicillium* y aún más preferiblemente una sialidasa de *Penicillium chrysogenum*. El yogur o yogur bebible en los ejemplos se prepara con una sialidasa de *Penicillium chrysogenum*, sialidasa que se ha sobreexpresado en el hongo de calidad alimentaria *Aspergillus niger* (documento WO08101893). Dicha sialidasa de *Penicillium chrysogenum* se puede producir igualmente bien en otro (micro)organismo. En otra realización preferida más, la invención proporciona un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido, en donde dicha sialidasa, preferiblemente una sialidasa fúngica, tiene un óptimo de pH entre pH 5,5 y pH 7,5. Un ejemplo de esta sialidasa es la sialidasa de *Penicillium chrysogenum* que se describe en el documento WO08101893, y sialidasa que se usa en la presente dentro de la parte experimental.

La sialidasa usada en la invención puede ser preferiblemente una enzima producida por fermentación. La sialidasa producida por fermentación se puede obtener a partir de bacterias, levaduras u hongos. Preferiblemente, la sialidasa producida por fermentación se obtiene a partir de un hongo filamentoso. Más preferiblemente, la sialidasa producida por fermentación procede del hongo *Penicillium chrysogenum*, producido en el hongo filamentoso *Aspergillus niger*.

La cantidad de sialidasa usada para la producción de un yogur o yogur bebible se puede ajustar según la aplicación, la concentración de sustrato, el período de incubación, la temperatura de incubación, el pH de incubación y otros parámetros que pueden fluctuar en un procedimiento de producción. Típicamente, la cantidad de sialidasa usada para la producción de un yogur o yogur bebible está entre 1 mg/l y 1 g/l.

Durante la fabricación de un yogur o yogur bebible según cualquiera de los métodos descritos en la presente se puede añadir un ingrediente adicional. Este ingrediente adicional incluye una preparación de fruta, un aroma, una proteína, una grasa, bacterias probióticas, un prebiótico y azúcares que se pueden añadir a la preparación láctea agria antes o después del tratamiento con sialidasa y antes o después de la acidificación usando un agente acidificante de elección.

El método de la invención es adecuado para la fabricación de productos frescos homogeneizados y no homogeneizados, grasos y libres de grasa, aromatizados y no aromatizados. También es adecuado para la fabricación de productos libres de lactosa y con bajo contenido de lactosa. Además de estas etapas, el método de la invención comprende preferiblemente cualesquiera otras etapas de fabricación necesarias para conseguir el producto final, tales como la adición de mermelada y/o azúcar y/o el tratamiento término (después de la pasteurización).

En otra realización preferida más, la invención proporciona un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido, que comprende además añadir otra enzima, tal como lactasa, carboxipeptidasa, proteasa, aminopeptidasa, beta-galactosidasa, esterasa, transglutaminasa, lipasa, fosfolipasa, isomerasa, oxidasa o peroxidasa, o que comprende añadir un prebiótico, tal como galactooligosacárido u fructooligosacárido, o que comprende añadir un cultivo probiótico, tal como bacterias de ácido láctico o bifidobacterias, o que comprende además añadir un aroma, un texturizador o un estabilizador. Ejemplos de aromas son fruta, vainilla o azúcar. Ejemplos de estabilizadores son almidón, carragenina, gomas,

pectina, gelatina o hidrocoloides. Los estabilizadores también se pueden usar por sus propiedades texturizantes. Adicionalmente, se pueden usar texturizadores lácteos como concentrado de proteína de suero o caseína. También se puede usar para la texturización una proteína en forma de micropartículas.

5 En un aspecto preferido, la invención proporciona un método para preparar un yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido, que comprende además añadir lactasa. Una lactasa preferida es lactasa de *K. lactis* (por ejemplo Maxilact® de DSM).

10 En una realización preferida, la invención proporciona un yogur o yogur bebible obtenible según se describe en la presente. Preferiblemente, cualquiera de estos productos es de bajo contenido de grasa o está libre de grasa. Aún más preferiblemente, cualquiera de estos productos también es de bajo contenido de lactosa o está libre de lactosa. Combinaciones preferidas de estas características son: bajo contenido de grasa y bajo contenido de lactosa o bajo contenido de grasa y libre de lactosa o libre de grasa y bajo contenido de lactosa o libre de grasa y libre de lactosa.

15 El yogur puede ser bien yogur bien cuajado o bien batido.

En otra realización más preferida, la preparación láctea agria es yogur bebible.

20 Preferiblemente, este yogur o yogur bebible se puede caracterizar por una estructura mejorada y una textura mejorada, una viscosidad incrementada, una sensación bucal mejorada y una sinéresis disminuida, preferiblemente en presencia de un nivel de proteína relativamente bajo. Un yogur o yogur bebible según la invención también se puede identificar por la detección de una sialidasa o partes de una sialidasa. Otra posibilidad para distinguir una preparación láctea agria tratada con sialidasa de una preparación láctea agria convencional es medir la cantidad de ácido siálico libre en el producto final. Una preparación láctea agria tratada con sialidasa tendrá una cantidad superior de ácido siálico libre, no unido a oligosacárido o proteína, en el producto final. El contenido de sialidasa libre en preparaciones lácteas agrias se puede incrementar de ese modo más de 2 veces, preferiblemente más de 5 veces, más preferiblemente 10 veces o más. La concentración de ácido siálico libre en la preparación final será de ese modo superior a 0,1 mg/kg, preferiblemente superior a 0,5 mg/kg, más preferiblemente superior a 1 mg/kg, superior a 2 mg/kg, superior a 5 mg/kg, lo más preferiblemente superior a 10 mg/kg.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un estuche de partes que comprende una sialidasa y un agente acidificante. Preferiblemente, esta composición o estuche comprende además otra enzima o un prebiótico o un probiótico o un aroma o un texturizador o un estabilizador.

35 Ejemplos de enzimas adecuadas son lactasa, carboxipeptidasa, proteasa, aminopeptidasa, beta-galactosidasa, esterasa, transglutaminasa, lipasa, fosfolipasa, isomerasa, oxidasa o peroxidasa. Una lactasa preferida es lactasa de *K. lactis* (por ejemplo Maxilact de DSM).

40 Ejemplos de prebióticos adecuados son galactooligosacárido u fructooligosacárido.

Ejemplos de probióticos adecuados son bacterias de ácido láctico o bifidobacterias.

45 Ejemplos de un aroma adecuado son fruta, vainilla o azúcar.

Ejemplos de un estabilizador adecuado son almidón, almidón modificado, carragenina, gomas, pectina, gelatina u otros hidrocoloides.

50 Ejemplos de texturizadores adecuados son los estabilizadores, suero en polvo, leche desnatada en polvo, concentrado de proteína de leche en polvo, concentrado de proteína de suero, caseína o proteína en forma de micropartículas.

La composición o el estuche de partes descrito anteriormente es muy útil para preparar una preparación láctea agria. Alternativamente, esta composición o estuche de partes se usa para reducir la sinéresis en un yogur o yogur bebible. Preferiblemente, dicho yogur o yogur bebible tiene cantidades disminuidas de proteínas añadidas y/o es de bajo contenido de lactosa o está libre de lactosa. En una realización preferida, dicho estuche comprende además instrucciones de uso en las que dicha sialidasa se añade a una materia prima que comprende proteína que comprende ácido siálico y se deja incubar para obtener proteína tratada con sialidasa y sometiendo posteriormente a dicha materia prima tratada con sialidasa a una etapa de acidificación (es decir la acidificación solo se permite después del tratamiento con sialidasa). Si se hace uso de un cultivo iniciador para obtener la acidificación de la materia prima, entonces dicho tratamiento con sialidasa se realiza antes de añadir dicho cultivo iniciador o dicha sialidasa se añade junto con o justo después de la adición de un cultivo iniciador.

65 Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención. De ningún modo están destinados a restringir las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de leche desnatada fermentada a pequeña escala usando la sialidasa ZJW

5 La clonación, la expresión y la purificación de una enzima sialidasa procedente de *Penicillium chrysogenum* se ha descrito previamente en el documento WO08101893. Esta sialidasa se denominaba ZJW, se producía a partir del hongo filamentoso *Aspergillus niger* y se usó para obtener ejemplos del efecto de sialidasas en la producción de preparaciones lácteas agrias. Se disolvieron 40 gramos de leche en polvo desnatada (Nilac, NIZO, Países Bajos) en 400 ml de agua corriente y se distribuyeron en cuatro botellas de 100 ml con tapón. Las 4 botellas se trataron como se describe en la Tabla 1. Se añadió la sialidasa ZJW a las botellas 2 y 3 en 10 y 50 mg/l, respectivamente. Las 10 botellas 2 y 3 se incubaron posteriormente durante 4 horas a 40 grados Celsius. Después de esto, todas las botellas se almacenaron refrigeradas durante la noche. Posteriormente, todas las botellas se calentaron hasta 40 grados Celsius durante 30 minutos, antes de la adición de 0,004 U/l de cultivo iniciador Delvo®-YOG CY-121 (DSM Food-Specialties, Países Bajos; CY=cultivo de yogur clásico; cultivo definido). En la botellas 4, también se añadieron 10 mg/l de sialidasa ZJW junto con el cultivo iniciador.

	adición de ZJW	incubación	almacenamiento	adición de CY121	adición de ZJW	incubación
1	0	0	O/N 4°C	0,004 U/l	0	5 h 40°C
2	10 mg/l	4 h 40°C	O/N 4°C	0,004 U/l	0	5 h 40°C
3	50 mg/l	4 h 40°C	O/N 4°C	0,004 U/l	0	5 h 40°C
4	0	0	O/N 4°C	0,004 U/l	10 mg/l	5 h 40°C

Tabla 1: Condiciones usadas para preparar una preparación láctea agria a partir de leche desnatada.

	pH final	% de sinéresis	Módulo de almacenamiento (G') (Pa)	Límite de fluencia (G'=G'') (% de deformación)
1	4,17	18	16	70
2	4,21	11	51	100
3	4,18	1	127	130
4	4,2	10	28	80

20 Tabla 2: Resultados del experimento descrito en la tabla 1. La viscosidad se incrementa mucho y la sinéresis se reduce cuando se elabora una preparación láctea agria con sialidasa.

25 Después de la incubación durante 5 horas a 40 grados Celsius, se formaba una estructura similar a gel en todas las botellas de leche desnatada acidificada. Las botellas se batieron para romper la estructura y se midió el pH. No se encontraron diferencias significativas en el pH entre las diferentes botellas (Tabla 2). Todas las botellas se almacenaron durante tres días a 4 grados Celsius. Después de este tiempo, la viscosidad se midió con un reómetro (Physica MCR 301 de Anton Paar, Graz, Austria). Se realizó un barrido de deformación, que es una medida oscilatoria a una frecuencia fija (de 10 Hz) y una amplitud creciente (desde 0,01% hasta 1000%) a una temperatura fija de 5°C usando una placa PP50 como husillo.

35 En la tabla 2, el módulo de almacenamiento (G', expresado en Pascal, Pa) es una medida de la resistencia textural del material; cuanto mayor, más resistente es el material. Se obtiene al imponer un movimiento oscilatorio sobre la muestra y medir la respuesta de esfuerzo. El límite de fluencia es la amplitud cuando el módulo de almacenamiento se vuelve menor que el módulo de pérdida (G'', la medida de la cantidad de esfuerzo que es disipada por el material bajo el movimiento oscilatorio particular). En ese punto y en adelante, el material se comporta más como un líquido. Esto corresponde al punto en el que la microestructura del material se rompe y no puede hacer frente al esfuerzo impuesto sobre él. Cuanto mayor es el límite de fluencia, mayor es la deformación que se puede imponer sobre el material antes de que empiece a fluir.

40 Una diferencia en la textura era claramente visible mediante percepción humana y un incremento en la resistencia textural (G') se midió con el reómetro entre las muestras que se trataban con sialidasa y las muestras de control. La viscosidad era significativamente superior en las botellas 2 y 4, y especialmente la botella 3. Además, el límite de fluencia era mayor cuando las muestras se trataban con sialidasa. Claramente, la sialidasa tiene un efecto positivo claro sobre la resistencia textural.

45

Después de 2 semanas de almacenamiento a 4 grados Celsius, se midió la sinéresis en todas las botellas, al dividir el espesor de la capa (en cm) por la altura total del producto (en cm) y expresarlo como porcentaje (Tabla 2). Los resultados muestran claramente que el tratamiento de preparaciones lácteas agrias con sialidasa antes o durante la acidificación conduce a una estructura mejorada y una sinéresis reducida.

5 Ejemplo 2

Preparación de yogur usando sialidasa ZJW

1,5 litros de leche de vaca semidesnatada homogeneizada (1,5% de grasa, 3,5% de proteína) se calentaron durante 30 min a 85°C en un baño de agua. La leche se enfrió rápidamente hasta 42°C usando agua de hielo. La sialidasa ZJW se añadió a la leche a un nivel de 10 mg/l y se incubó durante 2 horas a 42°C. Una muestra de control (sin sialidasa) se trató del mismo modo. A continuación, la leche se inoculó con cultivo iniciador Delvo®-YOG CY-121 (DSM Food-Specialties, Países Bajos) a un nivel de 4 U/1000 l. Para el yogur cuajado, la leche inoculada se vertió en su envase final antes de la fermentación a 42°C. Para el batido y el bebible la fermentación tuvo lugar en recipientes de 3 litros. El proceso se detenía cuando el yogur alcanzaba pH 4,5, lo que llevó aproximadamente 4 horas. Después de la fermentación, el yogur se bombeó a través de un homogeneizador (APV Homogenizer Rannie) sin presión para la producción de yogur batido. Para el yogur bebible, se realizó una homogenización a 100 bar. Todos los yogures se almacenaron en recipientes pequeños a 5°C durante un mínimo de 4 días.

La viscosidad relativa se midió por medio de un viscosímetro de Brookfield DV-III (Brookfield, EE. UU. de A.) con un husillo T-B usando el método de Helipath (en el que un husillo descendente penetra en el sentido de las agujas del reloj a través del yogur) a 30 rpm. Al medir constantemente la resistencia y calcularla de nuevo, un valor para la viscosidad se da en mPas (miliPascal segundo).

Sorprendentemente, la viscosidad era superior con las muestras tratadas con sialidasa que para las muestras no tratadas. La diferencia se observaba mejor para el yogur batido con una mejora de la viscosidad de más de 35% (Figura 1).

Las muestras se evaluaron organolépticamente y todos los evaluadores mencionaron la muestra de yogur batido tratada con sialidasa como la que tenía más sensación bucal y era claramente más espesa.

Ejemplo 3

30 Medida del contenido de ácido siálico

Sialic Acid Assay Kit de BioVision (CA, EE. UU. de A.) proporciona un medio simple y cómodo de medir el ácido siálico libre en una variedad de muestras biológicas. El estuche utiliza una reacción con enzimas acopladas en la que ácido siálico libre se oxida, dando como resultado el desarrollo de la sonda Oxi-Red para dar fluorescencia (Ex/Em=535/587 nm) y absorbancia (D.O.=570 nm). El estuche mide el ácido siálico en el intervalo lineal de 0,1 a 10 nmol con una concentración de ~1 µM de sensibilidad de detección.

Las muestras se pueden probar con respecto al ácido siálico libre o hidrolizarse para medir también el ácido siálico unido usando el estuche de Biovision. Para la medida del ácido siálico total, en primer lugar se debe realizar una hidrólisis en condiciones ácidas suaves. La muestra procedente de una preparación láctea agria se hidroliza en H₂SO₄ 0,05 M a 80 grados Celsius a una concentración de aproximadamente 1 mg de proteína/ml. Las muestras para la determinación del ácido siálico se retiran en momentos apropiados y se almacenan a -20°C hasta el análisis. Después del ajuste del pH del hidrolizado hasta aproximadamente 5,5 y la limpieza opcional mediante desproteinación u otros métodos que retiran componentes que pueden alterar la medida, el contenido de ácido siálico se mide usando el estuche de Biovision.

Para la medida del ácido siálico libre, las muestras se limpian opcionalmente mediante desproteinación u otros métodos que retiran componentes que puedan alterar la medida, y se miden directamente usando el estuche de Biovision.

Alternativamente, los niveles de ácido siálico se pueden determinar al usar un método de HPLC. Un método de HPLC para determinar los niveles de ácido siálico es descrito por the Dionex Company (nota técnica 41 de Dionex; <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/5053-tn41.pdf>). En resumen, se aplica el siguiente procedimiento. Equipo: Dionex BioLC, que consiste en una bomba de HPLC cuaternaria GS50, un inyector AS50 con compartimento térmico, un detector electroquímico de ED50 y un sistema de datos cromatográficos Chromeleon, todos productos de Dionex (Ámsterdam, Países Bajos); condiciones de medida: columna de HPLC CarboPac PA20, con columna de seguridad Amino y precolumna Borate Trap, recorrida a un caudal de 0,5 ml/min, usando un volumen de inyección de 10 µl y una temperatura de la bandeja 20°C, una temperatura de la columna de 30°C y un gradiente que consistía en 3 fases: Agua destilada, NaOH 500 mM y NaOAc 1 M en NaOH 0,1 M.

5 Se realizó una curva de calibración con una solución de ácido siálico: 25 mg de ácido siálico (Fluka 01398) se pesaron exactamente por duplicado en un matraz volumétrico de 25 ml y se disolvieron en agua destilada. Estas soluciones se diluyeron con agua hasta una concentración de 1 a 7,5 mg/l y se desarrollaron en la HPLC como se describe anteriormente.

10 Muestras de leche o yogur se diluyeron 25 veces con agua y se centrifugaron durante 5 min a 13000 rpm. Desde el sobrenadante transparente se transfirieron aproximadamente 0,5 ml a un cartucho de ultrafiltración Nanosep (10 KD) y se centrifugaron durante al menos 30 min a 14000 g, 250 µl del filtrado transparente se transfirieron a un vial de inyección de 300 µl. Los niveles de ácido siálico se determinaron como se describe anteriormente.

Ejemplo 4

Liberación de ácido siálico antes o durante la fermentación de yogur e impacto sobre la velocidad de acidificación

15 Se elaboró yogur a partir de leche entera (1469 g, Albert Heijn) más leche en polvo desnatada (Promex - Friesland-Campina, 31 g) para alcanzar 4,35% de proteína, la incubación se realizó a dos niveles (0,143 y 0,286 mg de enzima/g de proteína de leche, correspondientes a 10 o 20 mU/l) y antes de la pasteurización (4 h 40°C) o durante la fermentación. La enzima usada era ZJB lote 0009.

20 Se preparó yogur como se describe en el ejemplo 2, usando Delvo-Yog CY-121 (160 µl/l) como cultivo iniciador. Los niveles de ácido siálico en los yogures se midieron mediante HPLC (véase el ejemplo 3) y se dan en la tabla posterior. El valor del pH durante la acidificación se midió mediante pH-metro; los valores también se dan en la tabla posterior

Tabla 3

Muestra	Ácido siálico (mg/kg)	pH durante la fermentación				
		0 h	2 h	3 h	4 h	4,45 h
Control	26,9	6,55	5,97	5,25	4,77	4,57
Bajo contenido de sialidasa antes de la pasteurización	40,2	6,57	5,94	5,21	4,77	4,55
Alto contenido de sialidasa antes de la pasteurización	94,1	6,58	5,93	5,26	4,75	4,58
Bajo contenido de sialidasa durante la fermentación	70,0	6,57	5,94	5,25	4,73	4,57
Alto contenido de sialidasa durante la fermentación	121	6,57	5,94	5,21	4,74	4,57

25 Esto prueba que el ácido siálico se puede hidrolizar en leche a pH neutro así como durante la fermentación del yogur cuando el pH cae gradualmente. También prueba que el tratamiento con sialidasa no influye en la velocidad de acidificación.

Ejemplo 5

Experimento de incubación de leche

30 Varias fuentes de leche se incubaron con sialidasa para determinar la velocidad de liberación de ácido siálico. Las fuentes de leche eran leche desnatada (Albert Heijn, Países Bajos, 4% de proteína); leche en polvo desnatada (SMP; Promex - Friesland-Campina, estandarizada a 4% de proteína de leche en agua) y concentrado de proteína de leche (MPC; TMP Milei, Leutkirch, Alemania), estandarizado a 4% de proteína de leche en agua). Todas las fuentes de leche se incubaron a 30°C y la leche también a 4°C. Los niveles de incubación eran 80 mU de sialidasa/litro de leche excepto para una incubación de leche desnatada normal que se realizó a 20 mU/l. En la tabla, se dan los niveles de ácido siálico liberado según se determinan mediante HPLC (véase el ejemplo 3), expresados en mg/l.

35

Tabla 4

Tiempo (horas)	Leche 30°C 20 mU/l	Leche 30°C 80 mU/l	SMP 30°C 80 mU/l	MPC 30°C 80 mU/l	Leche 4°C 80 mU/l
0	20,4	22,6	21,4	1,5	22,6
0,5	64,7				
1	77,3	126	122	84	
2	85,0	138	147	101	111
4	101	151	157	114	121
6	116*	162	171	126	128
24	153	186	198	166	143
48					156
* a las 8 h					

5 Esto prueba que en todas las fuentes de leche el ácido siálico se puede liberar en cantidades sustanciales en un espacio de tiempo razonable.

Ejemplo 6

Prueba con yogur

10 Se elaboraron cuatro variantes de yogur a partir de leche desnatada fresca (NIZO, Ede Países Bajos, <0,1% de grasa) + SMP con poco calentamiento (leche en polvo desnatada; lote BEO1007773/s 1-02-055, Ingredia Francia) en lotes de 2 o 5 kg.

1. Ref 4,35% de proteína (A como tal y B mantenido 5 h a 30°C)
2. 4,35% de proteína con sialidasa (23 mU/l)
3. 3,9% de proteína con sialidasa (21 mU/l)
4. 3,6% proteína con sialidasa (19 mU/l)

15 La leche se incubó durante 6 h a 30°C con sialidasa (lote NID/ ZJW0007, 6,5 mU/g de proteína de leche), se pasteurizó a 92°C durante 10 minutos enfriada hasta 37°C y se inoculó usando 0,004% de Delvo®-YOG CY-121 y se fermentó aproximadamente 7 h a 37°C, hasta que se alcanzaba un pH de 4,6. A continuación, los productos se batieron manualmente brevemente y se enfriaron hasta 25°C y posteriormente se rompieron al usar un dispositivo de cizalladura Power Gen (Fisher Scientific) a la velocidad 1, cabezal con ranura de 2 mm durante 12 segundos, sometiéndolo a cizalladura a la tina desde el fondo hasta la parte superior del depósito. Los productos se cargaron en vasos de polipropileno.

20 Directamente después de la rotura, la viscosidad del producto se evaluó usando un analizador Haake RV20 Rotavisco con geometría MV2p en 64 s⁻¹ durante 1 minuto. El valor de viscosidad que era presentado por el analizador después de 10 segundos de cizalladura se da en la tabla posterior. Los niveles de ácido siálico se determinaron mediante HPLC (véase el ejemplo 3) sobre los productos lácteos antes de la fermentación.

Tabla 5

Muestra	Contenido de ácido siálico en el producto final (mg/l)	Viscosidad (Haake) 25°C a 64 s ⁻¹ , después de 10", en mPa.s
1A - 4,35% de proteína sin enzima sin espera	24	206
1B - 4,35% de proteína sin enzima	25	238
2 - 4,35% de proteína con enzima	124	428
3 - 3,9 % de proteína con enzima	113	219
4 - 3,6 % de proteína con enzima	104	189

5 Esta tabla muestra que directamente después de la ruptura bajo condiciones constantes, el yogur elaborado a partir de leche tratada con sialidasa tiene una viscosidad superior que la referencia (compárense las muestras 1 y 2) y que los productos de yogur elaborados con leche tratada con sialidasa pero un nivel de proteína de leche inferior (muestras 3 y 4) tienen una viscosidad comparable como una referencia con un nivel de proteína superior.

Ejemplo 7

Prueba con yogur

10 En esta prueba, yogur elaborado a partir de leche entera tratada con sialidasa con un nivel de proteína de 3,9% se comparó con yogur elaborado a partir de leche entera normal con un nivel de proteína de 4,35%.

15 Leche en polvo desnatada (Promex - Friesland-Campina) se disolvió en leche entera pasteurizada comercial (3,5% de grasa, Albert Heijn, Países Bajos). Esta mezcla se incubó durante 18 h a 4°C seguido por 5 h a 30°C en variaciones según se da en la tabla posterior. Después de eso, la leche se pasteurizó durante 30 minutos a 85°C. A continuación, la leche se llevó hasta 42°C y se inoculó con Delvo®-YOG CY221 (formando suavemente EPS) hasta un pH de 4,8 o 4,6 (véase la tabla). El producto se rompió directamente, sin enfriar adicionalmente, al hacer pasar una vez a través de un homogeneizador de alta presión (Rannie, APV, Dinamarca) sin presión, se cargó en vasos y se almacenó a 4°C.

20 La viscosidad de los productos se caracterizó mediante un viscosímetro de Brookfield después de diversos tiempos: 0 días (20°C), 3, 7, 21 días (todos 4°C). Los niveles de ácido siálico de la leche antes de la inoculación se determinaron mediante HPLC, véase el ejemplo 3. Todos los detalles se dan en la tabla posterior.

Tabla 6

Nº	% proteína de	Enzima [mU/l]	Ruptura a pH	Ácido siálico [mg/l]	pH el día 7	Viscosidad [Brookfield, mPa.s] el día			
						0 (20°C)	3	7	21
1	4,35	-	4,6	26	4,29	3040	5113	7180	6755
2	3,9	80	4,8	188	4,43	3265	5230	6291	-
3	3,9	80	4,6	191	4,29	2276	4112	5080	5698
4	3,9	20	4,6	136	4,23	2668	5084	5182	6216

25 Esta tabla muestra que después del tratamiento con sialidasa la viscosidad del yogur con menor nivel de proteína es igual a la viscosidad del producto sin enzima de alto nivel de proteína. Además, muestra que el yogur se puede romper en una fase previa cuando la acidificación no ha avanzado hasta el momento. Esto también daría una ventaja en el tiempo de procesamiento, especialmente dado que la última fase de la acidificación avanza bastante lentamente: Cuando los productos 1, 3 y 4 emplean 5 h 30 min para llegar al pH final, el producto 2 sólo emplea 4 h y 30 minutos.

30

Ejemplo 8

Prueba con yogur bebible

- Se elaboró yogur a partir de leche desnatada comercial normal (3,5% de proteína, Albert Heijn) del mismo modo que se describe en el ejemplo previo, excepto por el uso del cultivo Delvo®-YOG CY220 hasta el punto de ruptura. La leche se incubó con enzima, 80 mU de sialidasa por litro de leche, usando el lote ZJW0006, en primer lugar 24 h a 4°C y a continuación 5 h a 30°C, antes del tratamiento térmico. El producto fermentado se rompió en primer lugar mediante batimiento manual y después de eso se bombeó a través de un homogeneizador de alta presión (Rannie, APV, Dinamarca) a una presión de 100 bar, se cargó en botellas y se almacenó a 4°C. Los niveles de ácido siálico de las muestras de leche se determinaron mediante HPLC según se describe en el ejemplo 3.
- Después de 2 semanas, la viscosidad se determinó mediante un reómetro Physica MCR301 (Anton Paar, Viena, Austria), usando un vaso de 17 ml y ajuste del husillo. La muestra se sometió a cizalladura a una velocidad de cizalladura de 20 s^{-1} durante 1 minuto, recogiendo 12 puntos de datos. El valor de la viscosidad dado es una medida promedio por triplicado de estos 12 puntos. La sinéresis se determinó al dejar el producto reposar durante 20 días en tubos cerrados de 50 ml y registrar el volumen de la capa superior transparente que se produce durante este tiempo, expresada como ml/50 ml. Todos los valores se dan en la tabla posterior.

Tabla 7

	Ácido siálico mg/l	Viscosidad mPa.s	Sinéresis en ml/50 ml el día			
			4	7	14	21
Referencia	19	61	3	5	8	10
Con sialidasa	149	317	1	1	3	6

- A partir de esta tabla, está claro que el yogur bebible elaborado a partir de leche tratada con sialidasa es más viscoso y la sinéresis es considerablemente menor que la referencia. Una viscosidad superior era claramente evidente sensorialmente según se probaba en un grupo de 8 personas.

Ejemplo 9

Yogur bebible

- Se elaboró como sigue el siguiente grupo de yogures bebibles: Leche desnatada (Albert Heijn, 3,5% de proteína) se diluyó hasta 3,2 o 2,6% de proteína mediante agua, un lote de cada uno se incubó mediante sialidasa (0,572 mg de enzima/g de proteína de leche, lote ZJW0006 que contenía 8,5 mg de enzima/ml de solución). Los cuatro lotes de leche se convirtieron en yogur mediante Delvo®-YOG CY220 a 42°C. El yogur se rompió mediante batimiento manual, se añadió solución de pectina (Genu Pectin YM 115-H, CPKelco, Copenhague, Dinamarca) hasta un nivel final de 0,3% (p/v) y se homogeneizó a 100 bar mediante un homogeneizador de alta presión (Rannie, APV, Dinamarca).

Los niveles de ácido siálico de las muestras de leche se determinaron mediante HPLC según se describe en el ejemplo 3. La viscosidad se determinó según se describe en el ejemplo 8.

Tabla 8

	Nivel de proteína (% p/v)	Ácido siálico mg/l	Viscosidad Pa.s
Referencia	2,6	18	0,14
Con enzima	2,6	134	0,38
Ref con pectina	2,6	18	1,26
Con enzima + pectina	2,6	134	1,51
Referencia	3,2	21	0,48
Con enzima	3,2	151	0,52
Ref con pectina	3,2	21	1,93
Con enzima + pectina	3,2	151	2,33

A partir de esta tabla, está claro que el yogur bebible elaborado a partir de leche tratada con sialidasa es más viscoso, un efecto que es independiente de la pectina presente. Una pequeña prueba sensorial probaba que se percibía que los productos con sialidasa y pectina tenían una sensación bucal más plena. Además, era evidente menos sinéresis después del tratamiento con sialidasa (no cuantificado).

5 Ejemplo 10

Yogur cuajado

Se preparó yogur cuajado a partir de leche entera (3,5% de proteína, Albert Heijn) según el mismo procedimiento que se describe en el ejemplo 7. Para el tratamiento con sialidasa, la leche se incubó con sialidasa (0,572 mg de enzima/g de proteína de leche, lote ZJW0006 que contenía 8,5 mg de enzima/ml de solución) durante 24 h seguido por 5 h a 30°C. Esto daba como resultado leche con 156 mg de ácido siálico/l, mientras que la referencia tenía 20 mg/l. Los niveles de ácido siálico de las muestras de leche se determinaron mediante HPLC según se describe en el ejemplo 3. Después de la inoculación, la leche se cargó en vasos, se cerró y se dejó en un horno a 42°C durante 5 h. Después de esto, el producto se almacenó a 4°C. El día 7, la firmeza se evaluó mediante análisis de la textura (SMS TA-X2 Stable MicroSystems Godalming, Surrey, Reino Unido) usando una sonda de 1,27 cm (media pulgada) y una velocidad de 1 mm/s, penetrando hasta una profundidad de 10 mm. La firmeza en gramos se registra a esa profundidad. El control tenía una firmeza de 37 g; con un promedio de 4 muestras de 38 g de leche tratada con sialidasa.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para preparar yogur o yogur bebible que comprende añadir una sialidasa y un agente acidificante a una proteína que comprende ácido siálico, permitir que tenga lugar la acidificación y opcionalmente recuperar el yogur o yogur bebible producido.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, en el que al menos parte de dicha proteína que comprende ácido siálico se preincuba con dicha sialidasa para obtener proteína tratada, recuperando opcionalmente la proteína tratada, comprendiendo además añadir la proteína tratada a una materia prima láctea usada para preparar dicho o yogur bebible.
- 15 3. Un método según la reivindicación 2 en el que dicha proteína que comprende ácido siálico está presente en un producto lácteo, recuperando opcionalmente el producto lácteo tratado, secando el producto lácteo tratado y añadiendo dicho producto lácteo tratado seco a una materia prima láctea usada para preparar dicho yogur o yogur bebible.
- 20 4. Un método según la reivindicación 1, en el que dicha proteína que comprende ácido siálico está presente en un producto lácteo, tal como leche o leche reconstituida.
5. Un método según la reivindicación 4, en el que dicho producto lácteo tiene un contenido reducido de proteína y/o grasa.
- 25 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho yogur o yogur bebible es un yogur o yogur bebible que tiene al menos una característica mejorada.
- 30 7. Un método según la reivindicación 6, en el que dicha al menos una característica mejorada se selecciona de una estructura mejorada, una textura mejorada, una viscosidad incrementada, una sensación bucal mejorada y una sinéresis disminuida.
- 35 8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-7, en el que dicha sialidasa y dicho agente acidificante se añaden simultáneamente a dicha proteína que comprende ácido siálico o en el que dicha sialidasa se añade durante la acidificación.
- 40 9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-7, en el que dicha sialidasa se añade a y se incuba con una proteína que comprende ácido siálico antes de añadir un agente acidificante y antes de permitir que tenga lugar la acidificación.
- 45 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho yogur es yogur cuajado o yogur batido.
- 50 11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha sialidasa es una sialidasa bacteriana o fúngica.
12. Un método según la reivindicación 11, en el que dicha sialidasa es una sialidasa fúngica, preferiblemente una sialidasa de *Penicillium*, más preferiblemente una sialidasa de *Penicillium chrysogenum*.
- 55 13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además añadir otra enzima, tal como lactasa, carboxipeptidasa, proteasa, aminopeptidasa, beta-galactosidasa, esterasa, transglutaminasa, lipasa, fosfolipasa, isomerasa, oxidasa o peroxidasa o que comprende añadir un prebiótico, tal como galactooligosacárido u fructooligosacárido, o que comprende añadir un cultivo probiótico, tal como bacterias de ácido láctico o bifidobacterias, o que comprende además añadir un aroma, texturizador o estabilizador.
- 60 14. Un yogur o yogur bebible obtenible de acuerdo con un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. Uso de un estuche de partes para preparar yogur o yogur bebible, en el que dicho estuche de partes comprende una sialidasa y un agente acidificante.
16. Uso según la reivindicación 15, en el que dicho estuche de partes comprende además otra enzima o un prebiótico o probiótico o un aroma o un texturizador o un estabilizador.

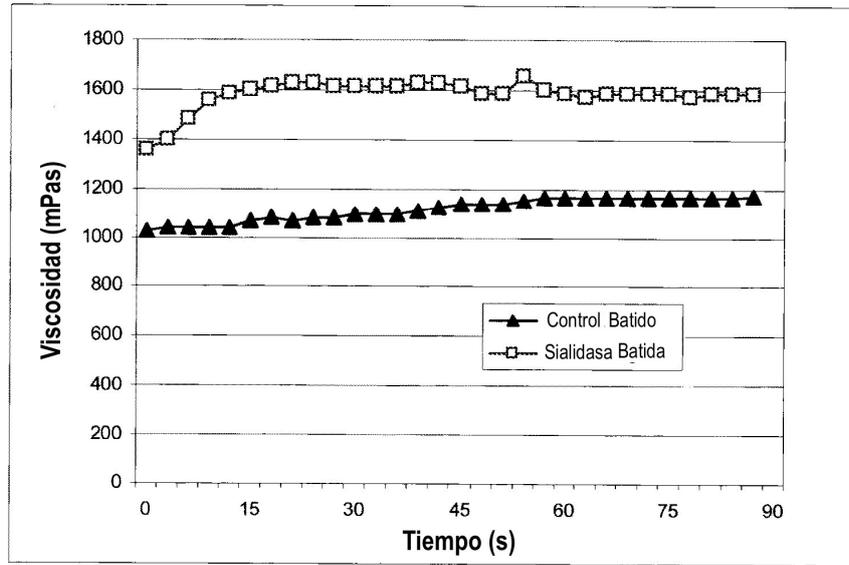


Fig. 1