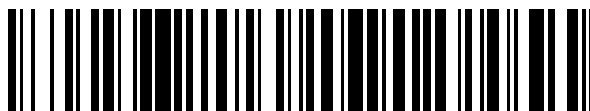


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 121**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/17** (2006.01)

**A61K 38/47** (2006.01)

**A23L 2/66** (2006.01)

**C12N 9/38** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2015 PCT/EP2015/054652**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15132349**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2015 E 15707970 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 3113632**

54 Título: **Composiciones de lactasa líquida**

30 Prioridad:

**05.03.2014 EP 14157897**

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

**19.06.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JOLINK, FENNA JOHANNA CATHARINA y  
SCHAAP, ALBERT**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 673 121 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

Composiciones de lactasa líquida

Campo de la invención

5 La invención se refiere a una formulación de lactasa líquida, a un procedimiento para su producción, a un procedimiento para producir una fórmula para lactantes, de continuación o para bebés, a una fórmula para lactantes, de continuación o para bebés que comprende una formulación de lactasa, y al uso de la formulación en la producción de una fórmula para lactantes, de continuación o para bebés.

Antecedentes de la invención

10 La lactasa o  $\beta$ -galactosidasa (E.C: 3.2.1.23) es una enzima que cataliza la hidrólisis de lactosa (un disacárido) en sus componentes monosacáridos glucosa y galactosa. La lactosa está presente en productos lácteos, y más específicamente en la leche, leche desnatada, nata, yogur, helado, y otros productos de la leche.

15 En niños y personas que son tolerantes a la lactosa, la lactosa es hidrolizada en galactosa y glucosa por la "lactasa-floricina hidrolasa" (LPH) en el borde ciliar del yeyuno del intestino delgado. LPH es codificada por un único gen de lactasa LCT en seres humanos, y se encuentra que la capacidad para digerir lactosa en la adultez es debida a mutaciones que actúan en cis en la expresión génica y que se heredan de manera dominante. La lactosa, contrariamente a los monoazúcares (es decir, glucosa y galactosa), es absorbida pobremente en el intestino delgado. Las personas que no portan mutaciones en el gen LCT no digerirán ni absorberán lactosa, y la lactosa mal absorbida atraerá osmóticamente fluido a la luz del intestino, lo que conducirá a heces blandas. Adicionalmente, la lactosa es un sustrato para bacterias intestinales en el colon que la metabolizan, produciendo ácidos grasos volátiles y gases tales como monóxido de carbono, hidrógeno y metano, conduciendo a flatulencia y cólico. La estimación actual es que solamente 25-30% de la población mundial porta la mutación en el gen LCT, y también en la adultez, capaz de digerir lactosa en el intestino delgado. El resto de la población mundial tiene dificultad variable con la digestión de la lactosa, y esto conduce a menudo a una ingesta reducida de productos lácteos. Tales individuos son denominados "intolerantes a la lactosa". Puesto que los productos lácteos son un componente importante de la dieta saludable, debido a la presencia de varias vitaminas, proteínas y minerales, esto es una situación indeseada.

20

25

Las lactasas se han descrito para, y se han aislado de, una gran variedad de organismo, incluyendo microorganismos. La lactasa es a menudo un componente intracelular de microorganismos como *Kluyveromyces* y *Bacillus*. *Kluyveromyces*, y especialmente *K. fragilis*, *K. marxianus* y *K. lactis*, y otras levaduras, tales como las del género *Candida*, *Torula* y *Torulopsis*, son una fuente habitual de lactasas de levadura, mientras que *B. coagulans* o *B. circulans* son fuentes bien conocidas para lactasas bacterianas. Existen varias preparaciones comerciales de lactasa, derivadas de estos organismos, tal como Maxilact (de *K. lactis*, producido por DSM, Delft, Países Bajos). Todas estas lactasas son las denominadas lactasas neutras, puesto que tienen un pH óptimo entre pH = 6 y pH = 8. Varios organismos, tales como *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, pueden producir lactasa extracelular, y la patente U.S. nº 5.736.374 describe un ejemplo de tal lactasa, producida por *Aspergillus oryzae*. Las propiedades enzimáticas de lactasas, como óptimo de pH y temperatura, varían entre especies. En general, sin embargo, las lactasas que son excretadas muestran un menor óptimo de pH de pH = 3,5 a pH = 5,0 (lactasas ácidas); las lactasas intracelulares muestran habitualmente un óptimo de pH mayor, en la región de pH = 6,0 a pH = 7,5 para lactasas neutras, pero se pueden producir excepciones a estas reglas generales.

30

35

Actualmente, la lactasa se formula y vende comercialmente como un líquido. Dos factores son de gran importancia cuando se produce una formulación líquida, a saber, la estabilidad microbiana y la enzimática. Por estabilidad microbiana se quiere decir que la formulación líquida permanece libre de microorganismos, o al menos que se previene o ralentiza el crecimiento.

40

Actualmente hay en el mercado varios productos de lactasa líquida. Los ejemplos de éstos (solamente lactasas neutras) son Lactozym Pure 6500 L, vendido por Novozymes; Ha-Lactase 5200, vendido por Chr. Hansen; GODO YNL-2, vendido por DuPont-Danisco; y Maxilact LGX 5000 y LGi, ambos vendidos por DSM Food Specialties. Todos los productos anteriores, y de hecho todas las formulaciones de lactasa líquida actualmente en el mercado, contienen aproximadamente 50% de glicerol. Se ha encontrado que el glicerol da buena estabilización tanto microbiana como enzimática. La cantidad de glicerol es tal que la actividad del agua ( $A_w$ ) es como máximo 0,82. Esto evita el crecimiento microbiológico. Además, el glicerol también da estabilidad enzimática. Una fuerza típica de una disolución de lactasa comercial es alrededor de 1000, 2000 o 5000 NLU/g. El término NLU/g se refiere a la cantidad de actividad de lactasa por gramo de producto final.

45

50

Una aplicación industrial importante de la lactasa es en la producción de productos de la leche hidrolizados con lactosa para individuos intolerantes a la lactosa. Tales productos de la leche hidrolizados incluyen leche pasteurizada, leche UHT, leche reconstituída a partir de todos o de partes de sus constituyentes originales con o sin etapas de procesamiento intermedias tal como la hidrólisis de proteínas, y la fórmula para lactantes.

55

Una aplicación particularmente interesante de la lactasa es en la fórmula para lactante, de continuación o para bebés. La fórmula para lactantes es un alimento fabricado diseñado y comercializado para alimentar a bebés y

lactantes menores de 12 meses, habitualmente preparada para alimentación en biberón o alimentación con cucharilla a partir de polvo (mezclado con agua) o de líquido (con o sin agua adicional). La Federal Food, Drug, y Cosmetic Act de los Estados Unidos de América (FFDCA) define fórmula para lactantes como “un alimento que pretende ser o esta representado para uso dietético especial únicamente como un alimento para lactantes a causa de su simulación de la leche humana o su idoneidad como un sustituto total o parcial de la leche humana”. Las fórmulas para lactantes más habitualmente usadas contienen como fuente de proteínas suero y caseína de leche de vaca purificada, como fuente de grasas una mezcla de aceites vegetales, como fuente de hidratos de carbono lactosa, una mezcla de vitaminas y minerales, y otros ingredientes, dependiendo del fabricante. El documento WO2013084244 describe una composición de gotas de lactasa que tiene como estabilizante glicerol o azúcar o alcohol de azúcar, útil para lactantes. Los documentos CN102550922 y CN102599606 describen una formulación para lactantes que comprende lactato de calcio en comprimidos. Un problema con las formulaciones de lactasa actualmente disponibles es que, en muchos países, la adición o la transmisión de glicerol a una fórmula para lactantes, de continuación o para bebés está prohibido por ley. Esto hace a las formulaciones de lactasa actuales, las cuales todas contienen glicerol, inadecuadas para producir una fórmula para lactantes, de continuación o para bebés. Por lo tanto, existe la necesidad de formulaciones de lactasa líquida estables que sean adecuadas para una fórmula para lactantes, de continuación o para bebés, y que estén sustancialmente libres de glicerol.

#### Sumario de la invención

La invención proporciona formulaciones de lactasa líquida acuosas estables que son adecuadas para uso en fórmula para lactantes, de continuación o para bebés, y que están libres de glicerol. Las formulaciones de lactasa estables comprenden al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de las mismas, preferiblemente en las que la concentración de cada uno de los componentes es tal que la actividad del agua  $A_w$  es como máximo 0,82. Un ejemplo de un componente opcional en tal formulación es un azúcar. Otro ejemplo de un componente opcional en tal formulación es cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismos. Un ejemplo de componentes opcionales combinados en tal formulación es cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismos, así como un azúcar. Las formulaciones son particularmente adecuadas cuando se usa lactasa libre de invertasa, que permite el uso de sacarosa como estabilizante. La invención también proporciona un procedimiento para producir las formulaciones de lactasa líquida de la invención, una fórmula para lactantes, de continuación o para bebés (por ejemplo, como polvo de granulado) que comprende las formulaciones de lactasa líquida de la invención, un método para producir dicha fórmula para lactantes, de continuación o para bebés, y el uso de las formulaciones en la producción de fórmula para lactantes, de continuación o para bebés.

#### Descripción detallada de la invención

El término “un” o “una”, como se usa aquí, se define como “al menos un/una”, excepto que se especifique de otro modo. Cuando se hace referencia a un nombre (por ejemplo, un compuesto, una célula, etc.) en el singular, se pretende que el plural esté incluido.

En un primer aspecto, la invención proporciona una formulación de lactasa líquida acuosa, que comprende lactasa, y que comprende además al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, preferiblemente en la que la concentración de cada uno de los componentes es tal que la actividad del agua  $A_w$  es como máximo 0,82. Preferiblemente, la invención proporciona una formulación de lactasa líquida acuosa que comprende lactasa, y que comprende además al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, en la que la concentración de cada uno de los componentes es tal que la actividad del agua  $A_w$  es como máximo 0,82.

En una realización preferida, la invención proporciona una formulación de lactasa líquida acuosa, que comprende lactasa, y que comprende además al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, y que comprende además un azúcar, y en la que dicho azúcar es sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa, o una combinación de las mismas, más preferiblemente, dicho azúcar es sacarosa, preferiblemente en la que la concentración de cada uno de los componentes es tal que la actividad del agua  $A_w$  es como máximo 0,82. Preferiblemente, la invención proporciona una formulación de lactasa líquida acuosa que comprende lactasa, y que comprende además al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, y que comprende además un azúcar, y en la que dicho azúcar es sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa, o una combinación de las mismas, más preferiblemente, dicho azúcar es sacarosa, en la que la concentración de cada uno de los componentes es tal que la actividad del agua  $A_w$  es como máximo 0,82.

En una realización preferida, la invención proporciona una formulación de lactasa líquida acuosa, que comprende lactasa, y que comprende además al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, y que comprende además cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismos, preferiblemente en la que la concentración de cada uno de los componentes es tal que la actividad del agua  $A_w$  es como máximo 0,82. Preferiblemente, la invención proporciona una formulación de lactasa líquida acuosa que comprende lactasa, y que comprende además al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, y que comprende además cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismos, en la que la concentración de cada uno de los componentes es tal que la actividad del agua  $A_w$  es como máximo 0,82.

En una realización preferida, la invención proporciona una formulación de lactasa líquida acuosa, que comprende lactasa, y que comprende además al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, y que comprende además un azúcar, y en la que dicho azúcar es sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa, o una combinación de las mismas, más preferiblemente, dicho azúcar es sacarosa, y que comprende además cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismos, preferiblemente en la que la concentración de cada uno de los componentes es tal que la actividad del agua  $A_w$  es como máximo 0,82. Preferiblemente, la invención proporciona una formulación de lactasa líquida acuosa que comprende lactasa, y que comprende además al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, y que comprende además un azúcar, y en la que dicho azúcar es sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa, o una combinación de las mismas, más preferiblemente, dicho azúcar es sacarosa, y que comprende además cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismos, en la que la concentración de cada uno de los componentes es tal que la actividad del agua  $A_w$  es como máximo 0,82.

Los inventores han encontrado sorprendentemente que las formulaciones de enzima líquida enzimáticamente estables son factibles sin usar glicerol. Preferiblemente, dicha formulación de enzima líquida también es microbianamente estable. Encontraron que la lactasa formulada como un líquido que comprende al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio (preferiblemente L-lactato de sodio), o una combinación de los mismos, y opcionalmente un azúcar, y/o que comprende opcionalmente cloruro de sodio o de potasio o una combinación de los mismos, y opcionalmente proteína del suero, y que tiene una actividad del agua de como máximo 0,82, la estabilidad enzimática fue buena. Además, la estabilidad microbiana también fue igualmente buena. Esto es lo más sorprendente, debido a que la propia lactasa no es muy estable en absoluto.

La estabilidad enzimática es una medida para la velocidad a la que disminuye la actividad de la enzima. La estabilidad microbiana es una medida para la velocidad a la que los microorganismos pueden proliferar y crecer en la composición.

La formulación de lactasa de la invención es preferiblemente adecuada para uso en una fórmula para lactantes, de continuación o para bebés. Esto es, la formulación de lactasa se puede usar en un procedimiento para la producción de una fórmula para lactantes, de continuación o para bebés. Para este fin, la formulación de lactasa de la invención está preferiblemente libre de forma sustancial de poliol o dioles, más preferiblemente libre de glicerol y/o sorbitol. La cantidad de glicerol, preferiblemente la cantidad de glicerol y sorbitol, es preferiblemente menor que 45% en peso, menor que 40% en peso, más preferiblemente menor que 35% en peso, menor que 30% en peso, menor que 25% en peso, más preferiblemente menor que 20% en peso, menor que 15% en peso, incluso más preferiblemente menor que 10% en peso, menor que 5% en peso. Lo más preferible, la lactasa está libre de glicerol o de cualquier otro poliol o diol.

Una formulación de lactasa de la invención está preferiblemente libre también de compuestos (conservantes) tales como sorbato y/o benzoato y/o parabenos (ésteres alquílicos de parahidroxibenzoato).

Los componentes (es decir, los agentes estabilizantes tales como L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, azúcar, cloruro de sodio o de potasio) de la formulación de lactasa de la invención se añaden en una cantidad de manera que la actividad del agua  $A_w$  es como máximo 0,82. Las actividades del agua de los componentes individuales son conocidos por la persona experta, y se describen en libros de texto. La persona experta apreciará que las cantidades de los componentes en la formulación se pueden variar e intercambiar de manera que la actividad del agua siga siendo como máximo 0,82. La contribución a la actividad del agua del ensamble de los componentes es la suma de la contribución de los componentes individuales, es decir, el efecto es acumulativo. Como se usa aquí, la actividad del agua se refiere al valor medido a 25°C. Una actividad del agua relativamente baja puede contribuir a lograr una estabilidad microbiana deseada. En el contexto de la presente solicitud de patente, la expresión "actividad del agua" se usa para formular formulaciones de lactasa estables durante el almacenamiento libres de o bajas en glicerol o cualquier otro poliol o diol.

La expresión "formulación de lactasa líquida acuosa" engloba cualquier composición o disolución que comprenda agua, por ejemplo al menos 20% en peso de agua, por ejemplo al menos 30 o 40% en peso de agua.

Una formulación de lactasa (o preparación de lactasa; las expresiones se usan aquí de forma intercambiable) de la invención comprende al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos. Una formulación de lactasa puede comprender así al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, o al menos 20% en peso de L-lactato de calcio, o al menos 20% en peso de L-lactato de potasio, o una combinación de los mismos, tal como al menos 20% en peso de L-lactato de sodio y L-lactato de calcio, o al menos 20% en peso de L-lactato de sodio y L-lactato de potasio, o al menos 20% en peso de L-lactato de calcio y L-lactato de potasio, o al menos 20% en peso de L-lactato de sodio y L-lactato de calcio y L-lactato de potasio. En el caso de una combinación de lactatos, la característica de "al menos 20% en peso" se refiere a las concentraciones combinadas de L-lactatos individuales.

El lactato de sodio es la sal sódica del ácido láctico. El lactato de calcio y el lactato de potasio son la sal de calcio y potasio respectiva del ácido láctico. En general, los lactatos, tal como lactato de sodio, de calcio, y de potasio, son sales derivadas de la neutralización de ácido láctico, y los ácidos lácticos más usados comercialmente se fermentan

- 5 a partir de productos libres de leche, tales como almidón de maíz, patatas, o melazas. Adicionalmente se puede usar azúcar o tapioca. Sin embargo, algo del ácido láctico fermenta a partir de productos lácteos tales como suero de la leche y lactosa. El suero está hecho de hasta 6,5% de sólidos, de los cuales 4,8% es lactosa sólida. El suero de desecho se usa típicamente para producir ácido láctico cuando el propio suero se produce como desecho durante la fabricación de ciertos productos lácteos.
- 10 El lactato de sodio, de calcio o de potasio puede estar presente en forma D, L o DL. Preferiblemente, se usa exclusivamente la forma L. Sin embargo, la referencia a L-lactato de sodio, de calcio o de potasio no excluye la presencia de cantidades pequeñas de, por ejemplo, D (o DL)-lactato de sodio, de calcio o de potasio. Cantidades pequeñas de la forma D del sodio, del calcio o del potasio son cantidades menores o iguales a 5% del lactato total, preferiblemente menores o iguales a 3% del lactato total de la forma D que está presente en el lote de la forma L. Preferiblemente, el L-lactato usado es L-lactato de sodio.
- 15 La formulación de lactasa de la invención puede comprender además a un azúcar, además de una lactasa y al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos. Preferiblemente, dicho azúcar es sacarosa, fructosa, glucosa o lactosa, o una combinación de las mismas, más preferiblemente dicho azúcar es sacarosa. La concentración del L-lactato usado y el azúcar se debería seleccionar de manera que la actividad del agua  $A_w$  sea como máximo 0,82. La persona experta es capaz de determinar concentraciones adecuadas sin ninguna carga excesiva. La fructosa se usa solamente para preparaciones de lactasa que se usan en una fórmula de continuación o para bebés.
- 20 Una formulación de lactasa de la invención puede comprender además cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismos, además de una lactasa y al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos. Nuevamente, las concentraciones respectivas se escogen de manera que la actividad del agua  $A_w$  sea como máximo 0,82. La persona experta es capaz de determinar concentraciones adecuadas sin ninguna carga excesiva.
- 25 La formulación de lactasa de la invención puede comprender además proteína, preferiblemente proteína del suero. La cantidad de proteína del suero en la formulación líquida es preferiblemente entre 1 y 15 g/l, medida como beta-lactoglobulina, más preferiblemente entre 3 y 12 g/l, más preferiblemente entre 4 y 6 g/l.
- 30 La lactasa en la formulación es preferiblemente una lactasa neutra. La concentración de lactasa, preferiblemente lactasa neutra, en la formulación de la invención puede ser cualquiera entre 500 y 15000 NLU/g, y es típicamente 1000, 2000 o 5000 NLU/g. La lactasa neutra es preferiblemente activa, o tiene una actividad óptima, a un pH entre 6-9, preferiblemente entre pH 7-8, o más preferiblemente pH 6,5-7,5.
- La actividad de lactasa se determina como Unidades de Lactasa Neutra (NLU) usando como sustrato *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), según el procedimiento descrito en FCC (sexta edición, 2008, p. 1124-1126: Actividad de Lactasa  $\beta$ -galactosidasa (neutra)).
- 35 Una lactasa en una formulación de la invención es preferiblemente una lactasa neutra producida intracelularmente, en cuyo caso la lactasa neutra se extrae de sus células hospedantes mediante métodos conocidos por la persona experta.
- 40 Se han descrito y aislado lactasas neutras a partir de una gran variedad de organismos, incluyendo microorganismos. La lactasa es a menudo un componente intracelular de microorganismos como *Kluyveromyces* y *Bacillus*. *Kluyveromyces*, y especialmente *K. fragilis* y *K. lactis*, y otras levaduras tales como aquellas de los géneros *Candida*, *Torula* y *Torulopsis*, son una fuente habitual de lactasas de levadura, mientras que *B. coagulans*, *B. circulans* o las bacterias del ácido láctico son fuentes bien conocidas de lactasas bacterianas. Hay disponibles varias preparaciones de lactasa comerciales, derivadas de estos organismos, tal como Maxilact® (de *K. lactis*, producida por DSM, Delft, Países Bajos). Preferiblemente, la formulación de lactasa de la invención comprende lactasa neutra de *Kluyveromyces lactis*, y más preferiblemente lactasa neutra de *K. lactis*.
- 45 La lactasa en la formulación de la invención se puede obtener como un extracto opcionalmente concentrado, por ejemplo a partir de *K. lactis*. Preferiblemente, tal extracto ha sufrido una etapa de separación sólido-líquido, por ejemplo mediante centrifugación o filtración, para eliminar los sólidos. Tal extracto puede contener componentes naturales de la levadura, así como restos de los medios de fermentación. Los ejemplos de tales componentes son ácido nucleico, proteína, azúcares residuales, oligosacáridos, enzimas intrínsecas, sales, minerales, componentes intracelulares, iones, y nucleótidos u otros componentes. Estos componentes pueden terminar, en cierto grado, en la formulación de la invención. Por ejemplo, en una formulación de lactasa 5000 NLU/g, la cantidad de proteína, distinta de lactasa, está típicamente entre 0,1 y 10% en peso en base al peso total de la composición, más probablemente entre 1 y 5, o 1 y 4, entre 2 y 3% en peso. La cantidad de sales, ceniza, sacáridos, ácido nucleico, etc., en tal formulación está típicamente entre 0,5 y 4% en peso.
- 50
- 55 Como alternativa, la lactasa puede ser una lactasa ácida, es decir, una lactasa que tiene su óptimo de pH en el intervalo entre 3,5 y 5,0.
- Para evitar cualquier confusión, las cantidades mencionadas aquí de, por ejemplo, L-lactato de sodio, de calcio o de

potasio, o un azúcar o cloruro de sodio o de potasio (o cualquier otro componente añadido), se refiere a la cantidad de componente añadido, y no incluye el transporte posible de componentes presentes en el extracto de lactasa como se describe anteriormente.

5 Además, la actividad del agua  $A_w$  también tiene en cuenta la actividad del agua de la disolución de lactasa (por ejemplo, extracto de lactasa o preparación de lactasa purificada), que puede variar ligeramente dependiendo del lote usado.

10 La lactasa en la formulación de la invención puede ser una lactasa concentrada (no purificada), o puede estar purificada. La lactasa concentrada (no purificada) se puede obtener liberando la enzima de las células hospedantes, eliminando los sólidos, por ejemplo por medio de filtración o centrifugación, y concentrando la fase líquida (lactasa) por medio de, por ejemplo, ultrafiltración. Como alternativa, la lactasa se purifica, por ejemplo, usando cromatografía.

El azúcar en la formulación de lactasa líquida de la invención puede incluir monosacáridos tales como fructosa o glucosa; disacáridos tales como lactosa o sacarosa, u oligosacáridos. Los azúcares preferidos son solubles en agua.

15 La formulación de lactasa de la invención está preferiblemente libre de forma sustancial de invertasa. La invertasa [EC 3.2.1.26] es una enzima que cataliza la hidrólisis de sacarosa para formar un monómero de glucosa y un monómero de fructosa. La mezcla resultante de fructosa y glucosa se denomina jarabe de azúcar invertido. La lactasa comercial contiene a menudo trazas de invertasa. Los inventores encontraron que la sacarosa a menudo no da resultados satisfactorios con respecto a la estabilidad enzimática de la lactasa. Supusieron que la presencia de invertasa puede estar relacionada con este problema. Los inventores también encontraron que la glucosa es menos eficiente como estabilizante que otros azúcares, lo que puede ser una posible explicación del efecto estabilizante insuficiente de la sacarosa. De hecho, encontraron que cuando se usó en la formulación de la invención una lactasa libre de invertasa, la sacarosa fue un estabilizante eficaz para la estabilidad enzimática. De este modo, en una realización preferida, la formulación de la invención comprende sacarosa y sustancialmente nada de invertasa.

20 Como se describe anteriormente, la invención proporciona una formulación de lactasa líquida acuosa, que comprende lactasa, y que comprende además al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos. Tal formulación puede comprender opcionalmente

- un azúcar, en la que dicho azúcar es sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa, o una combinación de las mismas, más preferiblemente dicho azúcar es sacarosa; o
- cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismos; o
- cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismos, así como un azúcar

30 preferiblemente en la que la concentración de cada uno de los componentes es tal que la actividad del agua  $A_w$  es como máximo 0,82.

35 Una formulación de lactasa adecuada comprende al menos 20% en peso, 21% en peso, 22% en peso, 23%, 24%, 25% en peso, 26% en peso, 27% en peso, 28% en peso, 29wt%, 30% en peso, 31% en peso, 32% en peso, 33% en peso, 34% en peso o 35% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio (preferiblemente L-lactato de sodio), o una combinación de los mismos. Preferiblemente, tal formulación de lactasa comprende entre 500 y 15000 NLU/g de lactasa.

40 Una formulación de lactasa de la invención puede consistir esencialmente en lactasa y L-lactato de sodio, de calcio o de potasio (preferiblemente L-lactato de sodio), o una combinación de los mismos. Como alternativa, una formulación de lactasa puede comprender (i) lactasa, (ii) al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, y (iii) un azúcar, en la que dicho azúcar es sacarosa, fructosa, glucosa o lactosa, o una combinación de las mismas, más preferiblemente, dicho azúcar es sacarosa.

Como alternativa, una formulación de lactasa puede comprender (i) lactasa, (ii) al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, y (iii) cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismos.

45 Como alternativa, una formulación de lactasa puede comprender (i) lactasa, (ii) al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, (iii) un azúcar, y (iv) cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismos.

En todos los casos, la concentración de los componentes individuales se selecciona de manera que la actividad final del agua  $A_w$  es como máximo 0,82.

50 El pH de una formulación de lactasa de la invención está en el intervalo de pH 6-9, preferiblemente pH 7-8,5, preferiblemente pH 7-8.

Una formulación de lactasa adecuada comprende 1000, 2000, o 5000 NLU/g de lactasa, y 25% en peso, 26% en peso, 27% en peso, 28% en peso, 29% en peso, 30% en peso, 31% en peso, 32% en peso, 33% en peso, 34% en

peso o 35% en peso de L-lactato de Na, preferiblemente 5000 NLU/g de lactasa y 30% en peso de L-lactato de Na.

Otra formulación preferida de lactasa comprende 5000 NLU/g de lactasa, 30% en peso de L-lactato de Na, y proteína del suero (5-10 g/l, preferiblemente 5 g/l, medida como beta-lactoglobulina).

5 Otra formulación de lactasa adecuada comprende 1000, 2000, o 5000 NLU/g de lactasa, y 5% en peso, 6% en peso, 7% en peso, 8% en peso, 9% en peso, 10% en peso, 11% en peso, 12% en peso, 13% en peso, 14% en peso o 15% en peso de NaCl, y 13% en peso, 14% en peso, 15% en peso, 16% en peso, 17% en peso, 18% en peso, 19% en peso, 20% en peso, 21% en peso, 22% en peso o 23% en peso de L-lactato de Na, preferiblemente 5000 NLU/g de lactasa, 10% en peso de NaCl, y 18% en peso de L-lactato de Na.

10 Otra formulación de lactasa preferida comprende 5000 NLU/g de lactasa, 10% en peso de NaCl, 18% en peso de L-lactato de Na, y proteína del suero (5 - 10 g/l, preferiblemente 5 g/l, medida como beta-lactoglobulina).

15 Otra formulación de lactasa adecuada comprende 1000, 2000, o 5000 NLU/g de lactasa y 15% en peso, 16% en peso, 17% en peso, 18% en peso, 19% en peso, 20% en peso, 21% en peso, 22% en peso, 23% en peso, 24% en peso o 25% en peso de fructosa, y 17% en peso, 18% en peso, 19% en peso, 20% en peso, 21% en peso, 22% en peso, 23% en peso, 24% en peso, 25% en peso, 26% en peso o 27% en peso de L-lactato de Na, preferiblemente 5000 NLU/g de lactasa, 20% en peso de fructosa, y 22% en peso de L-lactato de Na.

Otra formulación de lactasa preferida comprende 5000 NLU/g de lactasa, 20% en peso de fructosa, 22% en peso de L-lactato de Na, y proteína del suero (5 - 10 g/l, preferiblemente 5 g/l, medida como beta-lactoglobulina).

20 Otra formulación de lactasa adecuada comprende 100, 2000, o 5000 NLU/g de lactasa y 20% en peso, 21% en peso, 22% en peso, 23% en peso, 24% en peso, 25% en peso, 26% en peso, 27% en peso, 28% en peso, 29% en peso o 30% en peso de sacarosa, y 15% en peso, 16% en peso, 17% en peso, 18% en peso, 19% en peso, 20% en peso, 21% en peso, 22% en peso, 23% en peso, 24% en peso o 25% en peso de L-lactato de Na, preferiblemente 5000 NLU/g de lactasa, 25% en peso de sacarosa, y 20% en peso de L-lactato de Na.

Otra formulación de lactasa preferida comprende 5000 NLU/g de lactasa, 25% en peso de sacarosa, 20% en peso de L-lactato de Na, y proteína del suero (5 - 10 g/l, preferiblemente 5 g/l, medida como beta-lactoglobulina).

25 Se describen algunos ejemplos adicionales de composiciones preferidas:

Una formulación de lactasa preferida comprende entre 500-8000 NLU/g de lactasa y al menos 28, 29 o 30% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, preferiblemente al menos 31% en peso o 32% en peso o 32,5% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos.

30 Otra formulación de lactasa preferida comprende 500-8000 NLU/g de lactasa y al menos 28, 29 o 30% en peso de L-lactato de sodio, preferiblemente al menos 31% en peso o 32% en peso o 32,5% en peso de L-lactato de sodio.

35 Otra formulación de lactasa preferida comprende entre 500-8000 NLU/g de lactasa y al menos 25% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos y cloruro de sodio o de potasio en un intervalo de 0,01-5% en peso, preferiblemente 0,01-3% en peso, más preferiblemente 0,01-3% en peso, lo más preferible 0,01-2% en peso.

Otra formulación de lactasa preferida comprende entre 500-8000 NLU/g de lactasa, y al menos 25% en peso de L-lactato de sodio, y cloruro de potasio en un intervalo de 0,01-5% en peso, preferiblemente 0,01-3% en peso, más preferiblemente 0,01-3% en peso, lo más preferible 0,01-2% en peso.

40 Otra formulación de lactasa preferida comprende entre 500-8000 NLU/g de lactasa, y al menos 25% en peso de L-lactato de sodio, y cloruro de potasio en un intervalo de 0,01-3% en peso, preferiblemente 0,01-2% en peso.

45 La formulación de la invención es enzimáticamente estable, y preferiblemente microbiana y enzimáticamente estable. Esto es, la actividad enzimática residual en la formulación después de 2 meses de almacenamiento a 2-8°C (por ejemplo 4°C) es al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, incluso más preferiblemente al menos 99%. Igualmente, la estabilidad microbiana es tal que el recuento total en placa es preferiblemente menor que 1000 unidades formadoras de colonia (CFU) por ml tras el almacenamiento durante 2 meses a 2-8°C (por ejemplo a 4°C), preferiblemente menor que 500, más preferiblemente menor que 300, e incluso más preferiblemente menor que 200, lo más preferible menor que 100 CFU/ml.

50 Las propiedades microbianas de una composición de la invención se pueden expresar mediante el recuento estándar en placa, número de levaduras y número de hongos, usando procedimientos estándar bien definidos. Por ejemplo, el recuento estándar en placa puede ser  $\leq 100$  CFU (unidad formadora de colonias) en 1 ml, el recuento de levaduras puede ser  $\leq 10$  CFU en 1 ml, y el recuento de hongos puede ser  $\leq 10$  CFU en 1 ml. Puesto que las composiciones se almacenan a menudo antes del uso, es deseable que el recuento en placa, el número de levaduras y el número de hongos permanezca por debajo de ciertos valores límite, durante un período de al menos 2 meses.

Como se usa aquí, el recuento de levaduras y de hongos se determina según NEN-ISO 21527-2.

- 5 En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para producir la formulación de lactasa líquida de la invención, comprendiendo dicho procedimiento añadir lactasa, L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, y opcionalmente azúcar, y/u opcionalmente cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismos, y/o agua, y mezclar opcionalmente. La lactasa en dicho procedimiento puede ser, o se puede obtener, de un caldo de fermentación opcionalmente concentrado (tras lisar las células), por ejemplo de *K. lactis*. Como alternativa, la lactasa puede ser una lactasa purificada, por ejemplo una lactasa purificada mediante cromatografía. El orden de adición de la lactasa y otros componentes no es crítico. El procedimiento puede incluir mezclar en orden para obtener una disolución transparente.
- 10 En un aspecto adicional, la invención proporciona una fórmula para lactantes, de continuación o para bebés que comprende la formulación de lactasa líquida de la invención o la composición de lactasa producida mediante el procedimiento de la invención como se describe anteriormente. Dicha fórmula para lactantes, de continuación o para bebés es preferiblemente una formulación seca, por ejemplo en forma de un polvo de granulado. La cantidad de lactosa en la formulación para lactantes, de continuación o para bebés de la invención es preferiblemente menos de 1% en peso de lactosa, preferiblemente menos de 0,5% en peso, más preferiblemente menos de 0,2% en peso, incluso más preferible menos de 0,1% en peso, todos en base al peso total de la fórmula para lactantes, de continuación o para bebés. Una fórmula para lactantes es un alimento fabricado diseñado y comercializado para alimentar a bebés y lactantes por debajo de 12 meses de edad. Las fórmulas de continuación o para bebés se venden para las edades de 6 meses a 2 años.
- 15
- 20 En todavía otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una fórmula para lactantes, tal como la fórmula para lactantes de la invención, comprendiendo dicho procedimiento añadir la formulación de lactasa líquida a un concentrado de leche, y opcionalmente otros componentes tales como minerales, vitaminas, y grasas; mezclar y/u homogeneizar; evaporar; y secar por pulverización. El orden de adición de los componentes no es crítico. Por ejemplo, el procedimiento se puede hacer de tal forma que la formulación de lactasa se añade a un concentrado de leche (líquido), al que ya se han añadido componentes tales como minerales, vitaminas, y grasas. Como alternativa, tales otros componentes se añaden tras añadir la formulación de lactasa. En otra realización, la formulación de lactasa se añade a otros componentes, y la mezcla se añade entonces a la leche concentrada. El mezclado, la homogeneización, el secado por pulverización y la granulación se realizan todos ellos según métodos estándar conocidos en la técnica.
- 25
- 30 En todavía otro aspecto, la invención proporciona el uso de la formulación de lactasa líquida de la invención en la producción de fórmula para lactantes.

La invención se elucidará ahora con referencia a los siguientes ejemplos sin embargo estar limitada a ellos.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1 Una formulación de lactasa que comprende 32,5% en peso de lactato de Na

- 35 La lactasa concentrada extraída de la levadura *Kluyveromyces lactis* se puede obtener usando métodos como se describió en la técnica anterior (por ejemplo, Rodrigues Pinho y Lopes Passos (2011) Journal of Food Biochemistry 35, 323-336) o cualquier otro método de extracción y concentración de lactasa procedente de *Kluyveromyces* descrito previamente. A 280 gramos de esta lactasa concentrada (no purificada), con una actividad de ~14000 NLU/g, se añadieron 520 g de L-lactato de Na (disolución madre al 50% en peso). Esto dio como resultado una formulación de L-lactato de Na al 32,5% en peso con una actividad de 4950 NLU/g, un pH de 7,0 y una actividad del agua de 0,815. La medida del pH se llevó a cabo usando disoluciones de muestra de 1% en agua Ultra High Quality (UHQ). La actividad del agua se mide midiendo la humedad relativa por encima de la muestra a 25°C hasta que el valor Aw es estable. El valor Aw se considera estable si no se detecta ningún cambio > 0,001 Aw durante 4 minutos. El valor Aw se determina con equipo estándar.
- 40
- 45 Muestras de aproximadamente 1 gramo de la formulación se almacenaron a 5°C durante respectivamente 2, 4 y 8 semanas. Después de retirar las muestras del ensayo, se observaron visualmente y se determinó la actividad.

Tras 8 semanas, la actividad enzimática residual de la formulación es 94%.

Semana	Actividad residual [%]	Aspecto visual
0	100	Líquido marrón claro transparente
2	94	Líquido marrón claro transparente
4	89	Líquido marrón claro transparente
8	94	Líquido marrón claro transparente



**Ejemplo 2 Una formulación de lactasa que comprende 20% en peso de lactato de Na + 25% en peso de sacarosa**

5 A 280 gramos de lactasa concentrada (lactasa concentrada (no purificada)), con una actividad de ~14000 NLU/g, se añadieron 320 g de L-lactato de Na (disolución al 50% en peso), y se añadieron 200 g de sacarosa. Esto dio como resultado una formulación de L-lactato de Na al 20% en peso + sacarosa al 25% en peso con una actividad de 5040 NLU/g, un pH de 7,0 y una actividad del agua de 0,815. La medida del pH se llevó a cabo usando disoluciones de muestra de 1% en agua Ultra High Quality (UHQ). La actividad del agua se mide midiendo la humedad relativa por encima de la muestra a 25°C hasta que el valor  $A_w$  es estable. El valor  $A_w$  se considera estable si no se detecta ningún cambio  $> 0,001 A_w$  durante 4 minutos. El valor  $A_w$  se determina con equipo estándar.

10 Muestras de aproximadamente 1 gramo de la formulación se almacenaron a 5°C durante respectivamente 2, 4 y 8 semanas. Después de retirar las muestras del ensayo, se observaron visualmente y se determinó la actividad.

Semana	Actividad residual [%]	Aspecto visual
0	100	Líquido marrón claro transparente
2	88	Líquido marrón claro transparente
4	86	Líquido marrón claro transparente
8	82	Líquido marrón claro transparente

**Ejemplo 3 Ensayo de exposición microbiana de una formulación de lactasa que comprende (i) 32% en peso de formulación de L-lactato de Na o (ii) 20% en peso de L-lactato de Na + 25% en peso de sacarosa o (iii) 50% en peso de formulación de glicerol**

15 A 350 gramos de lactasa concentrada (lactasa concentrada (no purificada)), con una actividad de ~13600 NLU/g, se añadieron 650 g de L-lactato de Na (disolución al 50% en peso). El pH se ajustó a pH 7,8 con NaOH. Esto dio como resultado una formulación de L-lactato de Na al 32,5% en peso con una actividad de ~4760 NLU/g, y una actividad del agua de 0,80.

20 A 400 gramos de lactasa concentrada (lactasa concentrada (no purificada)), con una actividad de ~13600 NLU/g, se añadieron 457 g de L-lactato de Na (disolución al 50% en peso) y 285 g de sacarosa. El pH se ajustó a pH 7,8 con NaOH. Esto dio como resultado una formulación de L-lactato de Na al 20% en peso + sacarosa al 25% en peso con una actividad de ~4760 NLU/g, y una actividad del agua de 0,794.

25 Como referencia, a 400 gramos de lactasa concentrada, con una actividad de ~13600 NLU/g, se añadieron 150 g de agua y 550 g de glicerol. El pH se ajustó a pH 7,8 con NaOH. Esto dio como resultado una formulación de glicerol al 50% en peso con una actividad de ~4945 NLU/g, y una actividad del agua de 0,769.

30 El objetivo de este ensayo fue comparar la estabilidad microbiana de una composición de lactasa con glicerol al 50% con una formulación de lactasa de la invención. Esto se realizó exponiendo las diferentes formulaciones según NEN-ISO 21527-2 a un cóctel estándar o robusto de levaduras u hongos. Tal cóctel estándar comprende una selección de microorganismos generales, ubicuos, que probablemente están presentes en productos (alimentarios), ingredientes o procesos industriales o instalaciones. Un cóctel robusto es una selección de cepas que pueden crecer en condiciones exigentes.

35 Se añadió a la formulación un cóctel de hongos estándar, hongos robustos, levaduras estándar o levaduras robustas, se incubó a 8°C y 25°C, y se muestreó tras 0, 1, 2, 3 semanas y 1 y 2 meses, para determinar el crecimiento microbiano.

40 Después de dos meses, las formulaciones que comprenden lactato son microbianamente más estables que la formulación de glicerol para levaduras estándar y robustas y para hongos robustos. Las formulaciones que comprenden lactato son microbianamente estables del mismo modo como la formulación de glicerol para hongos estándar.

**REIVINDICACIONES**

1. Una formulación de lactasa líquida acuosa que comprende lactasa, y que comprende además al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, preferiblemente en la que la concentración de cada uno de los componentes es tal que la actividad del agua  $A_w$  es como máximo 0,82.
- 5 2. Formulación de lactasa según la reivindicación 1, que comprende además un azúcar, y en la que dicho azúcar es sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa, o una combinación de las mismas, más preferiblemente, dicho azúcar es sacarosa.
3. Formulación de lactasa según la reivindicación 1 o 2, que comprende además cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismos.
- 10 4. Formulación de lactasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la lactasa es una lactasa neutra.
5. Formulación de lactasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la lactasa está sustancialmente libre de invertasa.
- 15 6. Formulación de lactasa según la reivindicación 5, que comprende lactasa, al menos 20% en peso de L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, y sacarosa.
7. Formulación de lactasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que está sustancialmente libre de poliol o dioles, más preferiblemente libre de glicerol y/o sorbitol.
- 20 8. Procedimiento para producir la formulación de lactasa líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, comprendiendo dicho procedimiento añadir lactasa, L-lactato de sodio, de calcio o de potasio, o una combinación de los mismos, y opcionalmente azúcar, y/u opcionalmente cloruro de sodio o de potasio, o una combinación de los mismo, y/o agua, y opcionalmente mezclar.
9. Una fórmula para lactantes, de continuación o para bebés, que comprende la formulación de lactasa líquida de cualquier reivindicación 1-7 o la composición de lactasa producida mediante el procedimiento de la reivindicación 8.
- 25 10. Un método para producir una fórmula para lactantes, de continuación o para bebés, que comprende añadir la formulación de lactasa líquida de cualquier reivindicación 1-7, o la composición de lactasa producida mediante el procedimiento de la reivindicación 8, a un concentrado de leche, y opcionalmente otros componentes tales como minerales, vitaminas, y grasas; mezclar y/u homogeneizar; evaporar; y secar por pulverización.
- 30 11. Uso de la formulación de lactasa líquida de cualquier reivindicación 1-7, o la composición de lactasa producida mediante el procedimiento de la reivindicación 8, en la producción de una fórmula para lactantes, de continuación o para bebés.