

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 675**

51 Int. Cl.:

A23L 29/00 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2012 PCT/FI2012/051048**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13064736**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2012 E 12788227 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2773753**

54 Título: **Formulación enzimática líquida y su procedimiento de preparación**

30 Prioridad:

01.11.2011 FI 20116074

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

25.01.2019

73 Titular/es:

VALIO LTD (100.0%)

Meijeritie 6

00370 Helsinki, FI

72 Inventor/es:

RAJAKARI, KIRSI;

HOTAKAINEN, KAI y

MYLLÄRINEN, PÄIVI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 697 675 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

Formulación enzimática líquida y su procedimiento de preparación

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una formulación enzimática líquida, en particular a una formulación líquida y estable que comprende una enzima reticulante y/o una enzima modificadora de proteínas lácteas. La presente invención se refiere, en particular, a una formulación de transglutaminasa líquida y estable. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una formulación enzimática líquida.

Antecedentes de la invención

10 Las formulaciones enzimáticas que comprenden una enzima reticulante y/o una enzima modificadora de proteínas lácteas, tales como lacasa, tirosinasa, peroxidasa, sulfhidril oxidasa o glucosa oxidasa, están disponibles en el comercio en formulaciones tanto en polvo como líquidas. Sin embargo, los productos de transglutaminasa y proteína glutanasa, están actualmente en el mercado solo en forma de polvo. El uso de un producto enzimático en polvo no es totalmente aceptado debido a la formación de polvo en todas las plantas de producción. Los peligros para la salud, resultantes de la formación de polvo, han suscitado inquietud especialmente entre los trabajadores.

15 En la patente europea N° 0 379 606 B1 se ha desvelado una transglutaminasa derivada de la cepa de *Streptovercillium mobaraense* y un procedimiento para su preparación. Además, en la Patente Europea N°. 0 777 726 B1 se desvela un procedimiento para la producción de una transglutaminasa que utiliza un gen aislado de la cepa de *Streptomyces lydicus*.

20 Uno de los problemas asociados con la formulación de una enzima, tal como una transglutaminasa, en forma líquida, es la falta de estabilidad de la formulación. Además, una de las desventajas asociadas con las presentes formulaciones enzimáticas líquidas es que contienen al menos un conservante.

Breve descripción de la invención.

25 Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación enzimática líquida que comprenda al menos una enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas seleccionada de transglutaminasa, tirosinasa o proteína glutaminasa, que sea estable y que pueda almacenarse durante un período de tiempo necesario de una formulación comercial a temperatura ambiente o a temperaturas de un frigorífico y/o congelador.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una formulación líquida que comprenda una transglutaminasa, que sea estable y que pueda almacenarse durante un período de tiempo necesario de una formulación comercial a temperatura ambiente o a temperaturas de un frigorífico y/o congelador.

30 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la preparación de una formulación enzimática líquida, estable, que comprenda al menos una enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas seleccionada de transglutaminasa, tirosinasa o proteína glutaminasa.

Un objeto adicional más de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la preparación de una formulación líquida estable que comprenda una transglutaminasa.

35 Los objetos de la invención se consiguen mediante las formulaciones y los procedimientos expuestos en las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

Otros objetos, detalles y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos.

Descripción detallada de la invención

45 Las enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas, tales como transglutaminasa, lacasa, tirosinasa, peroxidasa, sulfhidril oxidasa y proteína glutaminasa, catalizan modificaciones de proteínas lácteas. Parece que hay sinergismo dentro de la acción de estas enzimas y además con la acción de la glucosa oxidasa. Sin limitarse a ninguna teoría, la glucosa oxidasa y/o la peroxidasa parecen catalizar reacciones en las que el oxígeno se libera a través de la formación de peróxido de hidrógeno. El oxígeno puede entonces catalizar (oxidar) la reticulación de la tirosinasa.

50 Las enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas, tales como transglutaminasa, lacasa, tirosinasa, peroxidasa, sulfhidril oxidasa y proteína glutaminasa, opcionalmente junto con la glucosa oxidasa, se utilizan en la fabricación de productos procesados de pescado, carne y huevo, pastas y patés, frutas, bayas y verduras, productos de soja, productos de cereales, pan y productos de panadería.

Las siguientes enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas son todas relevantes en el procesamiento de alimentos en productos lácteos u otras categorías de alimentos.

5 Las transglutaminasas son una familia de enzimas (EC 2.3.2.13) que catalizan la generación de enlaces covalentes entre los restos de aminoácido glutamina y lisina presentes en las moléculas de proteína. Cuando se forman enlaces, se libera amoníaco.

Las lacasas (EC 1.10.3.2) derivadas de hongos y bacterias, como el hongo *Trametes hirsuta*, catalizan el entrecruzamiento entre hidratos de carbono y proteínas (oxidación de compuestos aromáticos y cisteína) con aplicaciones en el procesamiento de alimentos, por ejemplo, para la reducción de la alergenicidad.

10 Las tirosinasas (EC 1.14.18.1) son enzimas que catalizan la oxidación de fenoles tales como la tirosina, con aplicaciones en el procesamiento de alimentos, por ejemplo, para la reducción de la alergenicidad.

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son una familia de enzimas que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos con aplicaciones en el procesamiento de alimentos, por ejemplo, para la reducción de la alergenicidad.

La sulfhidril oxidasa (EC 1.8.3.3) cataliza la formación de enlaces disulfuro, la oxidación de glutatión.

15 La proteína glutaminasa cataliza la desamidación de la proteína glutamina unida, y la glutamina se convierte en ácido glutámico.

La glucosa oxidasa cataliza la formación de reticulaciones de proteínas y la gelificación oxidativa de pentosanos.

20 Las enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas, tales como transglutaminasa, lacasa, tirosinasa, peroxidasa, sulfhidril oxidasa y proteína glutaminasa, se utilizan en la industria láctea para estabilizar la estructura de los productos basados en leche. Además de en la industria láctea, estas enzimas se utilizan en la fabricación de productos procesados de pescado, carne y huevo, pastas y patés, frutas, bayas y verduras, productos de soya, productos de cereales, pan y productos de panadería. Por consiguiente, una formulación enzimática líquida es adecuada, por ejemplo, para la fabricación de lácteos, productos procesados de pescado, carne y huevo, pastas y patés, frutas, bayas y verduras, soja, cereales, pan y productos de panadería. El uso de una preparación enzimática líquida sería más práctico y ventajoso que el uso de la formulación en polvo, especialmente en la fabricación a escala industrial.

25 Las transglutaminasas son más activas en el intervalo de pH de 5,2 a 8. Cuando una transglutaminasa licuada se almacena a pH 5,2 o a pH 8, la enzima pierde su actividad rápidamente. Después de almacenar una transglutaminasa a pH 5,2 durante 7 días a temperatura ambiente o a la temperatura de un frigorífico, solo queda la mitad de la actividad.

30 La invención se basa en el descubrimiento de que cuando una transglutaminasa, tirosinasa o proteína glutaminasa se almacena en una suspensión de un poliol, seleccionado de glicerol o sorbitol, y agua en el intervalo de pH de 4,4 a 5,1, su actividad se mantiene moderadamente durante el almacenamiento a temperatura ambiente y excelentemente durante el almacenamiento a temperaturas de un frigorífico y/o congelador. Adicionalmente, la invención se basa en el descubrimiento de que cuando una transglutaminasa junto con una proteína glutaminasa se almacena en una suspensión de glicerol y agua a pH 4,6, la actividad de las enzimas se mantiene moderadamente durante el almacenamiento a temperatura ambiente y excelentemente durante el almacenamiento a temperaturas de un frigorífico y/o congelador. Además, la invención se basa en el descubrimiento de que cuando una transglutaminasa junto con una proteína glutaminasa y tirosinasa se almacena en una suspensión de glicerol y agua a pH 4,6, la actividad de las enzimas se mantiene moderadamente durante el almacenamiento a temperatura ambiente y excelentemente durante el almacenamiento a las temperaturas de un frigorífico y/o un congelador. Adicionalmente, las preparaciones líquidas de la presente invención también son microbiológicamente estables durante el almacenamiento a temperatura ambiente y a las temperaturas de un frigorífico y/o un congelador. Además, se encontró inesperadamente que la formulación enzimática líquida de la presente invención mantenía su actividad enzimática y su pureza microbiológica (sin crecimiento microbiano) sin ningún conservante en la formulación a las temperaturas de un frigorífico y/o un congelador.

35 40 45 En una realización, la formulación enzimática líquida en suspensión de poliol-agua tiene un valor de pH dentro del intervalo de 4,4 a 5,1. En otra realización de la presente invención, el pH de la formulación enzimática está dentro del intervalo de 4,4 a 4,8. En una realización de la presente invención, el pH de la formulación enzimática es de 4,4. En otra realización de la presente invención, el pH de la formulación enzimática es de 4,6. En una realización adicional de la presente invención, el pH de la formulación enzimática es de 4,8. En una realización adicional más de la presente invención, el pH de la formulación enzimática es de 5,1.

En la formulación enzimática líquida de la presente invención se utilizan polioles seleccionados de glicerol y sorbitol. Las mezclas de los polioles también son operativas.

55 La suspensión de un poliol y agua o de una mezcla de dos polioles y agua, adecuada para formular la preparación enzimática de la presente invención, puede contener un porcentaje de glicerol y/o sorbitol desde 25 % hasta 100 %,

preferentemente desde 50 % hasta 100 % (p / p%). En una realización de la presente invención, la enzima se disuelve en una suspensión de poliol 25 % / agua 75 % (p / p). En otra realización de la presente invención, la enzima se disuelve en una suspensión de poliol 50 % / agua 50 % (p / p). En una realización adicional de la presente invención, la enzima se disuelve en suspensión de poliol 75 % / agua 25 %.

- 5 La suspensión de glicerol y agua adecuada para formular la preparación enzimática de la presente invención puede contener glicerol desde 25 % hasta 100 %, preferentemente desde 50 % hasta 100 %. En una realización de la presente invención, la enzima se disuelve en una suspensión de glicerol 25 % / agua 75 %. En otra realización de la presente invención, la enzima se disuelve en una suspensión de glicerol 50 % / agua 50 %. En una realización adicional de la presente invención, la enzima se disuelve en una suspensión de glicerol 75 % / agua 25 %. Además,
- 10 la suspensión de sorbitol y agua adecuada para formular la preparación enzimática de la presente invención puede contener sorbitol desde 25 % hasta 100 %, preferentemente desde 50 % hasta 100 %. En una realización de la presente invención, la enzima se disuelve en una suspensión de sorbitol 25 % / agua 75 %. En otra realización de la presente invención, la enzima se disuelve en una suspensión de sorbitol 50 % / agua 50 %. En una realización adicional de la presente invención, la enzima se disuelve en una suspensión de sorbitol 75 % / agua 25 %.
- 15 El pH de la suspensión puede ajustarse al intervalo deseado con un ácido aprobado para uso alimentario, tal como ácido láctico, GDL (glucono-delta lactona), ácido cítrico, ácido acético, ácido oxálico, ácido málico, ácido pantoténico, ácido propiónico y/o ácido clorhídrico, o cualquier mezcla/combinación de los mismos en forma de ácido o sal. En una realización de la presente invención, se utiliza ácido láctico para ajustar el pH.

- 20 La preparación enzimática líquida de la presente invención también puede contener opcionalmente un conservante tal como benzoato de sodio (Na). En una realización, la preparación enzimática líquida de la presente invención no contiene ningún conservante adicional, es decir, la formulación carece de conservantes. En otra realización, la preparación enzimática líquida de la presente invención contiene un conservante adicional. En una realización adicional, la preparación enzimática líquida de la presente invención contiene benzoato de sodio como conservante. En una realización adicional más, la preparación de enzima líquida de la presente invención contiene benzoato de
- 25 sodio como conservante, en una cantidad de 0,1 a 1 %, preferentemente en una cantidad de 0,7 %.

La preparación enzimática líquida de la presente invención mantiene su actividad a temperatura ambiente durante aproximadamente 1,5 a seis meses y en un frigorífico durante un mínimo de 5 a 24 meses.

- 30 En una realización de la invención, la formulación líquida comprende una enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas. En otra realización de la invención, la formulación líquida comprende dos o más enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas. En una realización, la enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas en la formulación de la presente invención es transglutaminasa. En otra realización, la enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas en la formulación de la presente invención es tirosinasa. En otra realización, la enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas en la formulación de la presente invención es la proteína glutaminasa. En otra realización, las enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas en la
- 35 formulación de la presente invención son transglutaminasa y proteína glutaminasa. En otra realización, las enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas en la formulación de la presente invención son transglutaminasa y tirosinasa. En otra realización, las enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas en la formulación de la presente invención son transglutaminasa y lacasa. En una realización adicional, las enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas en la formulación de la presente invención son transglutaminasa, proteína glutaminasa y lacasa. En una realización adicional más, las enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas en la formulación de la presente invención son transglutaminasa, proteína glutaminasa y tirosinasa.

- 40 La presente invención también se refiere a un método para preparar una formulación enzimática líquida en la que a la suspensión de poliol-agua que comprende del 25 % al 100 % (p/p) de poliol, seleccionada de glicerol y sorbitol y que tiene un valor de pH dentro del intervalo de 4,4 a 5,1, se la añade al menos una enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas seleccionada de transglutaminasa, tirosinasa o proteína glutaminasa. En una realización de la presente invención, el pH de la suspensión de poliol-agua se ajusta a un valor dentro del intervalo de 4,4 a 4,8. En una realización de la presente invención, el pH de la formulación enzimática se ajusta a 4,4. En otra realización de la presente invención, el pH de la suspensión de poliol-agua se ajusta a 4,6. En una realización adicional de la presente invención, el pH de la suspensión de poliol-agua se ajusta a 4,8. En otra realización adicional
- 50 de la presente invención, el pH de la formulación enzimática se ajusta a 5,1.

En una realización de la presente invención la enzima se disuelve en una suspensión de poliol-agua al 25 %. En otra realización de la presente invención, la enzima se disuelve en una suspensión de poliol-agua al 50 %. En una realización adicional de la presente invención, la enzima se disuelve en una suspensión de poliol-agua al 75 %. En una realización de la invención, el poliol es glicerol. En otra realización de la invención, el poliol es sorbitol.

- 55 En el presente método, el pH de la suspensión puede ajustarse al intervalo deseado con un ácido autorizado para uso alimentario (calidad alimentaria, GRAS siglas del inglés *generally recognized as safe*, que significa "que se considera seguro"), tal como ácido láctico, GDL, ácido cítrico, ácido acético, ácido oxálico, ácido málico, ácido pantoténico, ácido propiónico y/o ácido clorhídrico o cualquiera de sus mezclas/combinaciones en forma de ácido o sal. En una realización, en el procedimiento de la presente invención se utiliza ácido láctico para ajustar el pH.

En el procedimiento de la presente invención, en la formulación enzimática líquida también puede incluirse opcionalmente un conservante, tal como benzoato de sodio. En una realización, el procedimiento de la presente invención no comprende la adición de un conservante. En otra realización, el procedimiento de la presente invención comprende una adición de un conservante. En una realización adicional, el procedimiento de la presente invención comprende la adición de benzoato de sodio como conservante. En una realización adicional más, el procedimiento de la presente invención comprende la adición de benzoato de sodio como conservante, en una cantidad de 0,1 a 1 %, preferentemente en una cantidad de 0,7 %.

En una realización, el procedimiento de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- a) el pH de una suspensión de poliol-agua se ajusta con uno o más ácidos de calidad alimentaria a un valor dentro del intervalo de 4,4 a 5,1
- b) a la suspensión se la añade una enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas
- c) opcionalmente se añade un conservante.

En otra realización, el procedimiento de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- a) a una suspensión de poliol-agua se la añade una enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas
- b) el pH de la suspensión se ajusta con uno o más ácidos de calidad alimentaria a un valor dentro del intervalo de 4,4 a 5,1
- c) opcionalmente se añade un conservante.

En una realización de la presente invención, a la suspensión se la añade una enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas. En otra realización de la presente invención, a la suspensión se la añaden dos o más enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas. En una realización, la enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas es transglutaminasa. En otra realización, la enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas es tirosinasa. En otra realización, la enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas es la proteína glutaminasa. En otra realización, las enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas son transglutaminasa y proteína glutaminasa. En otra realización, las enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas son transglutaminasa y tirosinasa. En otra realización, las enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas son transglutaminasa y lacasa. En una realización adicional, las enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas son transglutaminasa, proteína glutaminasa y lacasa. En otra realización adicional, las enzimas reticulantes y/o modificadoras de proteínas lácteas son transglutaminasa, proteína glutaminasa y tirosinasa.

La invención se describirá con más detalle mediante los siguientes ejemplos. De ninguna manera en absoluto, los ejemplos se interpretarán como limitantes de las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo comparativo 1

Preparación de transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en suspensión de glicerol-agua a pH 5,2 a una temperatura de 4 °C

La transglutaminasa derivada de la cepa de *Streptovorticillium mobaraense* que tiene una actividad de 16.300 nkat/g (Activa® TG, Ajinomoto), se disolvió en actividad de 274 nkat/g en una suspensión de glicerol-agua (p/p) al 50 % cuyo pH se ajustó a 5,2 con ácido láctico. La actividad enzimática se monitorizó durante 7 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

El día 7, solo se retiró el 50 % de la actividad de la transglutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación de siete días.

Ejemplo comparativo 2

Preparación de transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en agua a pH 5,2 a una temperatura de 4 °C

La transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) se disolvió en actividad de 274 nkat/g en agua que tenía un pH de 5,2 ajustado con ácido láctico. La suspensión contenía también como conservante benzoato de sodio al 0,7 %.

La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

El día 50, solo se retiró el 43 % de la actividad de la transglutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación de 50 días.

EJEMPLO 1

Preparación de transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en suspensión de glicerol-agua a pH 4,6 a una temperatura de 4 °C

La transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) se disolvió en actividad de 274 nkat/g en una suspensión de glicerol-agua (p/p) al 50 % que tenía un pH de 4,6 ajustado con ácido láctico.

La actividad enzimática se monitorizó durante 7 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

- 5 El día 7, se retiró el 100 % de la actividad de la transglutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación de siete días.

Ejemplo 2

Preparación de transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en suspensión de glicerol-agua a pH 4,6 a una temperatura de 4 °C

- 10 La transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) se disolvió en actividad de 326 nkat/g en una suspensión de glicerol-agua (p/p) al 50 % que tenía un pH de 4,6 ajustado con ácido láctico. La suspensión también contenía como conservante benzoato de sodio al 0,7 %.

La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

- 15 El día 50, se retiró el 100 % de la actividad de la transglutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación de 50 días.

Ejemplo 3

Preparación de transglutaminasa Activa®TG-YG (Ajinomoto) en suspensión de glicerol-agua a pH 4,6 a una temperatura de 4 °C

- 20 La formulación de transglutaminasa líquida se preparó disolviendo la preparación de transglutaminasa Activa®TG-YG de Ajinomoto, que contenía una transglutaminasa derivada de la cepa *Streptovercillium mobaraense* y glutatión, en una suspensión de glicerol-agua al 50 % (p/p) que tenía un pH de 4,6 ajustado con ácido láctico.

La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

- 25 El día 50, se retiró el 100 % de la actividad de la transglutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación de 50 días.

Ejemplo 4

Preparación de transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en suspensión de glicerol-agua a pH 4,4 a una temperatura de 4 °C

- 30 La preparación líquida de transglutaminasa se preparó disolviendo la transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en actividad de 274 nkat/g en suspensión de glicerol-agua al 50 % (p/p) cuyo pH se ajustó con ácido láctico a 4,4.

La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

- 35 El día 50, se retiró el 100 % de la actividad de la transglutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación de 50 días.

Ejemplo 5

Preparación de transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en suspensión de glicerol-agua a pH 4,8 a una temperatura de 4 °C

- 40 La preparación líquida de transglutaminasa se preparó disolviendo la transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en actividad de 274 nkat/g en suspensión de glicerol-agua al 50 % (p/p) cuyo pH se ajustó con ácido láctico a 4,8.

La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

El día 50, se retiró el 100 % de la actividad de la transglutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación de 50 días.

- 45 **Ejemplo 6**

Preparación de transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en suspensión de glicerol-agua a pH 5,1 a una temperatura de 4 °C

5 La preparación líquida de transglutaminasa se preparó disolviendo la transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en actividad de 274 nkat/g en suspensión de glicerol-agua al 50 % (p/p) cuyo pH se ajustó con ácido láctico a 5,1 a 4 °C.

La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

El día 50, se retiró el 100 % de la actividad de la transglutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación de 50 días.

10 **Ejemplo 7**

Preparación de transglutaminasa Saprana TG (Yiming Biological Products Co, China) en suspensión de glicerol-agua a pH 4,6 a una temperatura de 4 °C

15 La preparación líquida de transglutaminasa se preparó disolviendo la transglutaminasa Yiming Saprana TG derivada de la cepa de *Streptovorticillium mobaraense* en suspensión de glicerol-agua al 50 % (p/p) cuyo pH se ajustó con ácido láctico a 4,6.

La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

El día 50, se retiró el 100 % de la actividad de la transglutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación de 50 días.

20 **Ejemplo 8**

Preparación de transglutaminasa Reactyn CL 1000 TG (Campus SpA, Italia) en suspensión de glicerol-agua a una temperatura de pH 4,6 a 4 °C

La preparación líquida de transglutaminasa se preparó disolviendo la transglutaminasa Reactyn CL 1000 TG de Campus en suspensión de glicerol-agua al 50 % (p/p) cuyo pH se ajustó con ácido láctico a 4,6.

25 La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

El día 50, se retiró el 100 % de la actividad de la transglutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación de 50 días.

Ejemplo 9

30 **Preparación de transglutaminasa TG-PG (Ajinomoto) en suspensión de glicerol-agua a pH 4,6 a una temperatura de 4 °C**

35 La preparación líquida se preparó disolviendo una preparación enzimática TG-PG (Ajinomoto) en suspensión de glicerol-agua al 50 % (p/p) que tenía un pH de 4,6 ajustado con ácido láctico. La preparación TG-PG (Ajinomoto) contenía una transglutaminasa derivada de la cepa de *Streptovorticillium mobaraense* y una proteína glutaminasa derivada de *Chryseobacterium proteolyticum*.

La actividad de la transglutaminasa de la preparación líquida fue de 100 U/g y la actividad de la proteína glutaminasa de la preparación líquida fue de 100 U/g.

La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

40 El día 50, se retiró el 100 % de la actividad de la transglutaminasa y el 100 % de la actividad de la proteína glutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación de 50 días.

Ejemplo 10

Preparación de transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en suspensión de glicerol al 75%/agua al 25 % a pH 4,6 a una temperatura de 4 °C

45 La transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) se disolvió en actividad de 326 nkat/g en suspensión de glicerol al 75 %/agua al 25 % (p/p) que tenía un pH de 4,6 ajustado con ácido láctico.

La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días a una temperatura de 4 °C. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

El día 50, se retiró el 100 % de la actividad de la transglutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación.

5 **Ejemplo 11**

Preparación de transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en suspensión de glicerol al 25 %/agua al 75 % a pH 4,6 a una temperatura de 4 °C

La transglutaminasa Activa® TG (Ajinomoto) se disolvió en actividad de 326 nkat/g en una suspensión de glicerol al 25 %/agua al 75 % (p/p) que tenía un pH de 4,6 ajustado con ácido láctico.

10 La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días a una temperatura de 4 °C. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

El día 50, se retiró el 72 % de la actividad de la transglutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación.

Ejemplo 12

15 **Preparación de transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en suspensiones de glicerol-agua a pH 4,4 - 4,8 a una temperatura de 22 °C**

Las preparaciones líquidas de transglutaminasa se prepararon disolviendo transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en actividad de 2789 nkat/g en suspensión de glicerol-agua al 50 % (p/p) cuyo pH se ajustó con ácido láctico a un intervalo de 4,4 - 4,8.

20 La actividad enzimática de las preparaciones se monitorizó durante 13 semanas a una temperatura de 22 °C. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de las preparaciones.

Después de dos semanas de almacenamiento, la actividad de la enzima en las preparaciones comenzó a disminuir. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación.

Ejemplo 13

25 **Preparación de transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en suspensiones de glicerol-agua a pH 4,4 - 4,8 a una temperatura de 4 °C**

Las preparaciones líquidas de transglutaminasa se prepararon disolviendo transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en actividad de 2789 nkat/g en suspensión de glicerol-agua al 50 % (p/p) cuyo pH se ajustó con ácido láctico a un intervalo de 4,4 - 4,8.

30 La actividad enzimática de las preparaciones se monitorizó durante 26 semanas a una temperatura de 4 °C. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de las preparaciones.

Después de 26 semanas de almacenamiento, se retiró el 89 % de la actividad enzimática. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación.

Ejemplo 14

35 **Preparación de transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en suspensiones de glicerol-agua a pH 4,4 - 4,8 a una temperatura de -20 °C**

Las preparaciones líquidas de transglutaminasa se prepararon disolviendo transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en actividad de 2789 nkat/g en suspensión de glicerol-agua al 50 % (p/p) cuyo pH se ajustó con ácido láctico a un intervalo de 4,4 - 4,8.

40 La actividad enzimática de las preparaciones se monitorizó durante 26 semanas a una temperatura de -20 °C. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de las preparaciones.

Después de 26 semanas de almacenamiento, se retiró el 97 % de la actividad enzimática. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación.

Ejemplo 15

45 **Preparación de tirosinasa en suspensión de glicerol-agua a pH 4,6 a una temperatura de 4 °C**

La enzima tirosinasa se disolvió en actividad de 100 U/g en suspensión de glicerol-agua al 50 % (p/p) cuyo pH se ajustó con ácido láctico a 4,6.

La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

- 5 Después de 50 días de almacenamiento, se retiró el 97 % de la actividad de la tirosinasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación.

Ejemplo 16

Preparación de proteína glutaminasa en suspensión de glicerol-agua a pH 4,6 a una temperatura de 4 °C

- 10 La proteína glutaminasa se disolvió en actividad de 100 U/g en suspensión de glicerol-agua al 50 % (p/p) cuyo pH se ajustó con ácido láctico a 4,6.

La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

Después de 50 días de almacenamiento, se retiró el 96 % de la actividad de la proteína glutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación.

- 15 **Ejemplo 17**

Preparación de transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en suspensión de sorbitol-agua a pH 4,6 a una temperatura de 4 °C

La preparación líquida de transglutaminasa se preparó disolviendo transglutaminasa Activa®TG (Ajinomoto) en actividad de 274 nkat/g en suspensión de sorbitol-agua al 50 % (p / p) cuyo pH se ajustó con ácido láctico a 4,6.

- 20 La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

El día 50, se retiró el 100 % de la actividad de la transglutaminasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación de 50 días.

Ejemplo 18

- 25 **Preparación enzimática líquida que contiene TG-PG (Ajinomoto) y tirosinasa en suspensión de glicerol-agua a pH 4,6 a una temperatura de 4 °C**

La preparación líquida se preparó disolviéndola en suspensión de glicerol-agua al 50 % (p/p) que tenía un pH de 4,6 ajustado con ácido láctico, una preparación enzimática de TG-PG (Ajinomoto) y tirosinasa. La actividad de la transglutaminasa de la preparación líquida fue de 100 U/g, la actividad de la proteína glutaminasa de la preparación líquida fue de 100 U/g y la actividad de la tirosinasa de la preparación líquida fue de 100 U/g.

- 30 La actividad enzimática se monitorizó durante 50 días. Adicionalmente, se monitorizó la pureza microbiológica de la preparación.

El día 50, se retiró el 100 % de la actividad de la transglutaminasa, el 100 % de la actividad de la proteína glutaminasa y el 98 % de la actividad de la tirosinasa. No se detectó crecimiento microbiano durante la prueba de conservación.

- 35 Será obvio para una persona experta en la técnica que, a medida que la tecnología avanza, el concepto inventivo puede implementarse de varias maneras. La invención y sus realizaciones no están limitadas a los ejemplos descritos anteriormente, sino que pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación enzimática líquida, **caracterizada porque** comprende al menos una enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas seleccionada de transglutaminasa, tirosinasa o proteína glutaminasa en suspensión de poliol-agua que comprende poliol del 25 % al 100 % (p/p) seleccionada de glicerol y sorbitol, y que tiene un valor de pH dentro del intervalo de 4,4 a 5,1.
2. Un procedimiento de preparación de una formulación enzimática líquida, **caracterizado porque** al menos una enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas seleccionada de transglutaminasa, tirosinasa o proteína glutaminasa, se añade a la suspensión de poliol-agua que comprende poliol del 25 % al 100 % (p/p) seleccionada de glicerol y sorbitol, y que tiene un valor de pH dentro del intervalo de 4,4 a 5,1.
- 10 3. La formulación según la reivindicación 1 o el procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado porque** la suspensión de poliol-agua comprende poliol del 50 % al 75 %.
4. La formulación o el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el pH es de 4,6.
- 15 5. La formulación o el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la formulación comprende transglutaminasa y proteína glutaminasa.
6. La formulación o el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la formulación también comprende lacasa y/o tirosinasa.
7. La formulación o el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la formulación carece de conservantes.
- 20 8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, **caracterizado porque** el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- 25 a) el pH de la suspensión de poliol-agua se ajusta con ácido de calidad alimentaria a un valor dentro del intervalo de 4,4 a 5,1,
b) a la suspensión se la añade al menos una enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas,
c) opcionalmente se añade un conservante.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, **caracterizado porque** el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- 30 a) a una suspensión de poliol-agua que comprende poliol del 25 % al 100 %, se la añade al menos una enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas
b) el pH de la suspensión se ajusta con uno o más ácidos de calidad alimentaria a un valor dentro del intervalo de 4,4 a 5,1
c) opcionalmente se añade un conservante.
- 35 10. Un procedimiento para mantener la actividad de al menos una enzima reticulante y/o modificadora de proteínas lácteas seleccionada de transglutaminasa, tirosinasa o proteína glutaminasa, en una formulación enzimática líquida, **caracterizado porque** el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- a) añadir poliol a una solución enzimática acuosa para proporcionar una suspensión de poliol-agua que comprende poliol del 25 % al 100 % seleccionada de glicerol y sorbitol, y
b) ajustar el pH de la suspensión de poliol-agua a un valor dentro del intervalo de 4,4 a 5,1.
11. El procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado porque** el pH se ajusta a un valor de 4,6.
- 40 12. El procedimiento según la reivindicación 10 u 11, **caracterizado porque** la formulación carece de conservantes.