

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 002**

51 Int. Cl.:

**A23C 9/12** (2006.01)

**A23C 9/123** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2010 PCT/EP2010/053282**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10103126**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2010 E 10708771 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2405764**

54 Título: **Método para producir un producto de leche acidificada**

30 Prioridad:

**13.03.2009 DK 200900346**

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

**13.03.2019**

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)**

**Boege Allé 10-12**

**2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

**FAERGEMAND, MERETE;**

**GILLELADEN, CHRISTIAN y**

**QVIST, KARSTEN BRUUN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 704 002 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Método para producir un producto de leche acidificada

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para producir un yogur con textura mejorada y sensación en boca agradable.

**10 Antecedentes de la invención**

El mercado para productos de leche acidificada, que incluye leches fermentadas, tal como yogur que se puede coger con cuchara, de tipo firme y líquido (bebible), está aumentando a nivel mundial y hay un interés en mejorar la calidad y economía de este producto.

15 Los productos de leche acidificada en general se producen por la acidificación de una base de leche, tal como una leche fresca pasteurizada o una leche reconstituida a partir de proteína de leche en polvo y agua. La acidificación puede tener lugar mediante la adición de una sustancia química, tal como glucono delta-lactona (GDL) o ácido lactobiónico (LBA), o puede estar producida por la fermentación de la leche con bacterias del ácido láctico.  
20 Opcionalmente, el producto de leche acidificada se mezcla con una solución de jarabe de azúcar, y/o se somete a un tratamiento de homogenización.

Se puede usar transglutaminasa (TGasa o TG) para aumentar la viscosidad y la firmeza de gel de los productos de leche fermentada, tal como, por ejemplo, yogur. Mientras que la TGasa aumenta significativamente la firmeza de gel  
25 del yogur, el espesor en boca del yogur tiende a volverse acuoso y ligero.

Lauber S et al. (2000), European Food Research and Technology, vol. 210, no. 5, páginas 305-309 enseña el efecto de la transglutaminasa en yogures para aumentar su resistencia a la rotura.

30 Bönisch et al. (2007), Food Hydrocolloids, vol. 21, no. 4, páginas 585-595 y Bönisch et al. (2007), International Dairy Journal, vol. 17, no. 11, páginas 1360-137 enseñan el efecto de la transglutaminasa en yogures para aumentar la viscosidad y firmeza.

El documento EP 0 610 549 A1 enseña el uso de transglutaminasa para prevenir la sinéresis en yogures.

35 Lorenzen P C et al. (2005), Kieler Wirtschaftliche Forschungsberichte, vol. 57, no. 2, páginas 97-115 enseña el uso de transglutaminasa en yogures para aumentar la viscosidad y reducir la sinéresis.

El documento EP 2 011 402 A1 enseña el uso de transglutaminasa para reducir la sinéresis y aumentar la sensación de riqueza de yogures.

El documento WO 2009/010257 A2 enseña el uso de transglutaminasa en bebidas de yogur.

45 El documento WO 2007/060288 A1 divulga el uso de transglutaminasa para la producción del producto de leche escandinavo viili.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un método para la fabricación de un yogur con fibrosidad disminuida comparado con un producto de leche acidificada estándar.

**50 Compendio de la invención**

Los presentes inventores han observado que cuando se produce yogur usando un cultivo bacteriano de ácido láctico que produce exopolisacárido (EPS) en combinación con TGasa, es posible producir un yogur con alta firmeza de gel, así como un alto espesor en boca agradable y una sensación en boca agradable.

55 Sorprendentemente, se ha encontrado que usando una combinación de un cultivo que produce EPS (que normalmente proporciona una textura fibrosa al yogur) junto con TGasa, es posible producir un yogur con una alta firmeza de gel, alto espesor en boca y una textura firme, más que la textura fibrosa normalmente inducida cuando solo se usa el cultivo iniciador.

60 Por tanto, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que un yogur producido con transglutaminasa y un microorganismo productor de polisacáridos tiene, por ejemplo, sensación en boca mejorada y fibrosidad reducida comparado con un yogur producido de la misma manera, pero sin el tratamiento de transglutaminasa.

65 Por consiguiente, La presente invención se refiere a un método para producir un yogur con fibrosidad disminuida, dicho método comprende:

- 5 a) proporcionar un sustrato de leche;  
 b) tratar el sustrato de leche con una enzima que tiene actividad transglutaminasa; y  
 c) fermentar el sustrato de leche con un cultivo iniciador de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* para producir el yogur, en donde dicho cultivo iniciador produce un exopolisacárido (EPS).

10 El método de la invención disminuirá la fibrosidad de un yogur, y mejorará la textura y/o el espesor en boca y/o la sensación en boca de un yogur, produciendo de esta manera un producto que tiene una sensación en boca agradable.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de transglutaminasa en combinación con un microorganismo que produce un exopolisacárido (EPS) para disminuir la fibrosidad de un producto de leche acidificada, tal como un yogur, por ejemplo, un yogur de tipo firme o que se puede coger con cuchara.

15 **Divulgación detallada de la invención**

En su aspecto más amplio, la presente invención se refiere a un método para producir un yogur con fibrosidad disminuida, dicho método comprende:

- 20 a) proporcionar un sustrato de leche;  
 b) tratar el sustrato de leche con una enzima que tiene actividad transglutaminasa; y  
 c) fermentar el sustrato de leche con un cultivo iniciador de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* para producir el yogur, en donde dicho cultivo iniciador produce un exopolisacárido (EPS).

25 Formas de realización interesantes del método de la invención son:

- un método, en donde el yogur se produce sustancialmente sin, o completamente sin ninguna adición de un espesante y/o estabilizante, tal como pectina, gelatina, almidón, almidón modificado, carragenano, alginato, y goma guar.
- un método, en donde la etapa b) se realiza antes o durante la etapa c).
- un método, en donde el sustrato de leche se somete a pasteurización antes de la acidificación y el tratamiento con enzima se realiza antes de la pasteurización.
- un método, en donde el sustrato de leche se somete a un tratamiento con calor antes del tratamiento con la enzima que tiene actividad transglutaminasa.
- un método, en donde se añade glutatión al sustrato de leche antes del tratamiento con la enzima que tiene actividad transglutaminasa.
- un método, en donde se añade un hidrolizado de proteína al sustrato de leche antes del tratamiento con la enzima que tiene actividad transglutaminasa.
- un método, en donde el hidrolizado de proteína se selecciona del grupo que consiste en: un hidrolizado de proteína de leche (tal como hidrolizado de caseína, Nz Case o Maxicurd); una peptona (tal como peptona de patata); un extracto de levadura; y un extracto de levadura hidrolizado.
- un método, en donde el yogur tiene un contenido no graso sólido de leche de menos del 8%.
- un método, en donde el yogur tiene un contenido en grasa de menos del 2%.
- un método, en donde el yogur tiene un contenido en grasa de menos del 0,5%.
- un método, en donde la enzima que tiene actividad transglutaminasa se produce de forma recombinante.
- un método, en donde la enzima que tiene actividad transglutaminasa se obtiene de una bacteria que pertenece al género *Streptomyces*.

50 También se divulga un producto de leche acidificada obtenible por el método de la invención. El producto puede estar embalado, por ejemplo, en un envase sellado que tiene un volumen en el intervalo de 25 a 1500 ml. El producto de leche acidificada está libre, o sustancialmente libre, de estabilizantes y espesantes como HM pectina, LM pectina, almidón, almidón modificado, gelatina, CMC, fibra de soja/polímero de soja, alginato. Mediante sustancialmente libre se debe entender que el producto comprende menos del 20% (p/p) (por ejemplo, menos del 10%, menos del 5% o incluso menos del 2% o el 1%) de estabilizantes o espesantes.

60 En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de transglutaminasa en combinación con un microorganismo que produce un exopolisacárido (EPS) para disminuir la fibrosidad de un producto de leche acidificada, tal como un yogur, por ejemplo, un yogur de tipo firme o que se puede coger con cuchara.

60 Formas de realización interesantes de esta invención son:

- el uso de transglutaminasa para disminuir la fibrosidad de un producto de leche acidificada que se ha producido usando un microorganismo que produce una textura viscosa/fibrosa en el producto de leche acidificada tal como un yogur de tipo firme o que se puede coger con cuchara.

- Los términos “fibroso” o “fibrosidad” se refieren a la textura del yogur y/o producto de leche acidificada. Por ejemplo, la textura de un yogur se evalúa mediante evaluación sensorial. Se saca una cucharada de yogur de la muestra y se evalúa la propiedad de fibroso. Cuanto más largo se vuelve la hebra antes de que se rompa más fibroso es el producto. La fibrosidad también se puede evaluar de forma instrumental: usando un reómetro con un sistema de cilindros concéntricos una curva de flujo mide la tensión de corte como función de las velocidades de corte desde 10 a 350 s<sup>-1</sup> (barridos arriba y abajo). El área del bucle de histéresis entre la curva de flujo hacia arriba y hacia abajo (velocidades de corte desde 0 a 241 s<sup>-1</sup>) se calculó en % del área bajo la curva superior. El área del bucle de histéresis se correlaciona con la fibrosidad percibida sensorial.
- El término “textura firme” se refiere a lo opuesto de textura fibrosa. Así cuando la fibrosidad de un yogur disminuye, la textura se vuelve “más firme”.
- El término “productos de leche acidificada” se refiere a cualquier producto basado en leche que se ha acidificado, e incluye productos de leche fermentada, y bebidas de leche acidificada.
- El término “yogur” cubre un producto de leche producido por fermentación mediante un cultivo iniciador de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en donde el cultivo iniciador produce un exopolisacárido (EPS).
- Las “bebidas de leche acidificada” incluyen cualquier producto bebible basado en sustratos de leche acidificada, lo que incluye, por tanto, bebidas de leche fermentada y bebidas de yogur líquido. Las bebidas de leche acidificada son bebibles en el sentido que están en forma líquida y se consumen como bebidas, es decir, son adecuadas para beber en lugar de ser comidas con una cuchara (“espeso”). “En forma líquida” significa que los productos están en el estado fluido de la materia mostrando de esta manera una disposición característica para fluir. Por tanto, la forma de un líquido habitualmente está determinada por el envase que llena, al contrario que, por ejemplo, una sustancia de tipo gel, que es blanda, pero no fluye libremente, tal como, por ejemplo, yogur o pudín. Las bebidas de leche acidificada según la invención pueden tener una viscosidad que permita al consumidor beber los productos usando una paja si lo desea.
- En un aspecto interesante, las bebidas de leche acidificada tienen una viscosidad medida como tiempo de descarga desde una pipeta de 10 ml que es sustancialmente el mismo que el tiempo de descarga de una bebida de leche acidificada producida sin transglutaminasa. En este contexto, un tiempo de descarga que es sustancialmente el mismo significa que está aumentado menos del 20%, preferiblemente aumentado menos del 15% y más preferiblemente aumentado menos del 10%.
- Un producto de leche acidificada puede tener un pH de menos de 4,6, preferiblemente menos de 4,4, más preferiblemente menos de 4,2 e incluso más preferiblemente aproximadamente pH 4,0 o menos. En un aspecto, el producto de leche acidificada tiene un pH de menos de 3,8, tal como menos de 3,6.
- La acidificación se realiza como una fermentación con un microorganismo y/o mediante la adición de un ácido, tal como un ácido orgánico (por ejemplo, ácido láctico, ácido lactobiónico o GDL). El sustrato de leche se acidifica por fermentación con un microorganismo. Opcionalmente, tal acidificación por fermentación se combina con acidificación química del sustrato de leche, por ejemplo, mediante adición de un ácido como se ha descrito anteriormente.
- Un producto de leche acidificada puede tener un contenido en grasa del 0 al 2%, preferiblemente por debajo del 1,5%, por debajo del 1% o por debajo del 0,5%, más preferiblemente de aproximadamente el 0,1% o menor. El producto de leche acidificada puede tener un contenido sólido no graso de leche de menos del 20%, preferiblemente menos del 8,5%, menos del 8%, menos del 7,5%, menos del 7%, menos del 6,5% o menos del 6%, y más preferiblemente de aproximadamente el 5%.
- Un producto de leche acidificada puede tener un contenido en proteína de entre el 0,5 y el 4%. En un aspecto preferido, el producto de leche acidificada tiene un contenido en proteína de por debajo del 1%. En otro aspecto preferido, el producto de leche acidificada tiene un contenido en proteína de entre el 2% y el 3%.
- Un producto de leche acidificada puede tener un periodo de validez de más de 7 días, preferiblemente más de 14 días, más preferiblemente más de 28 días, tal como más de 3 meses. Mediante el término “periodo de validez” como se usa en el presente documento se debe entender el periodo de tiempo desde la finalización de un producto y hasta que este producto, cuando se almacena de forma apropiada y en las condiciones recomendadas por el fabricante, se vuelve inaceptable para el consumidor.
- Sensación en boca es la interacción física y química de un producto en la boca, un aspecto de la reología de alimentos. Se evalúa desde la percepción inicial en el paladar, a través de la deglución hasta el retrogusto. El término describe todas las observaciones táctiles relacionadas con la textura y sensación de textura en la boca (o sensaciones que se producen en la cavidad bucal, relacionadas con los tejidos bucales y su estado percibido, por ejemplo, recubrimiento), incluyendo la característica “cremosidad” que habitualmente se refiere a la sensación en boca de la nata. (Barnes et al., 1991, Journal of Dairy Science 74:2089-2099, Lawless y Heyman (1999) Sensory evaluation of food: principles and practices. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, MD).

“Espesor en boca” se puede describir como el grado de espesor cuando se traga el yogur a una velocidad de comida normal-alta; el alto espesor en boca corresponde a un producto espeso que lleva tiempo tragar (Meilgaard, M., Civille, V.G., Carr, B.T., eds. 1999. *Sensory Evaluation Techniques* (3ª Edición). Nueva York: CRC Press.).

5 El término “espeso” se debe entender como para ser consumido usando una cuchara. El término “producto de leche fermentada que se puede coger con cuchara” incluye “yogur batido”. El término “yogur batido” se refiere específicamente a un producto de yogur que sostiene un tratamiento mecánico después de la fermentación, lo que produce un ablandamiento y licuación del coágulo formado en la etapa de fermentación. El tratamiento mecánico típicamente, pero no exclusivamente, se obtiene por agitación, bombeo, filtración u homogenización del gel de yogur, o mezclándolo con otros ingredientes. Los yogures batidos típicamente, pero no exclusivamente tienen un contenido sólido no graso de leche del 9 al 15%. El término “producto de leche fermentada de tipo firme” incluye un producto basado en leche que se ha inoculado con un cultivo iniciador, por ejemplo, un cultivo iniciador de yogur, y embalado después de la etapa de inoculación y luego fermentado en el envase. El término “producto de leche fermentada bebible”, “bebida de leche acidificada” y “bebida de leche fermentada” incluye bebidas tal como “yogur para beber” y similares. El término “yogur para beber” típicamente cubre un producto de leche producido por fermentación mediante la combinación de una especie de *Lactobacillus* (por ejemplo, *L. bulgaricus*) y *Streptococcus thermophilus*. El “yogur para beber” típicamente se consume bebiendo el yogur, por ejemplo, directamente del envase o de un vaso/taza o similar. El yogur para beber típicamente tiene un contenido sólido no graso de leche del 8% o más. Además, el recuento de cultivo vivo para bebidas de yogur para beber típicamente es al menos 10E6 unidades formadoras de células (UFC) por ml.

25 “Sustrato de leche”, en el contexto de la presente invención, puede ser cualquier material de leche cruda y/o procesada que se puede someter a acidificación según el método de la invención. Por tanto, los sustratos de leche útiles incluyen, pero no están limitados a, soluciones/suspensiones de cualquier leche o productos similares a leche que comprenden proteína, tal como leche entera o semidesnatada, leche desnatada, suero de mantequilla, leche en polvo reconstituida, leche condensada, leche seca, suero, filtrado de suero, lactosa, líquido madre de la cristalización de lactosa, concentrado de proteína de suero, o nata. Obviamente, el sustrato de leche se puede ser leche. El término “leche” se debe entender como la secreción láctea obtenida ordeñando cualquier mamífero, tal como vacas, ovejas, cabras, búfalos o camellos. En una forma de realización preferida, la leche es leche de vaca.

35 En un aspecto de la presente invención, el sustrato de leche está más concentrado que la leche cruda, es decir, el contenido en proteína es mayor que en la leche cruda. En este aspecto, el contenido en proteína es más del 5%, preferiblemente más del 6%, tal como más del 7%, más preferiblemente más del 8%, tal como más del 9% o más del 10%. Preferiblemente, el contenido en lactosa también es mayor que en la leche cruda, tal como más del 7%, más del 8%, más del 9%, más del 10%, más del 11% o más del 12%. En una forma de realización preferida de este aspecto, el sustrato de leche es una solución acuosa concentrada de leche desnatada en polvo que tiene un contenido en proteína de más del 5% y un contenido en lactosa de más del 7%.

40 En el contexto de la presente invención, los porcentajes que definen el contenido del sustrato de leche o el contenido del producto de leche acidificada son porcentajes en masa, es decir, la masa de una sustancia (por ejemplo, proteína o lactosa) como un porcentaje de la masa de la solución entera (sustrato de leche o producto de leche acidificada). Por tanto, en un sustrato de leche que tiene un contenido en proteína de más del 5%, la masa de las proteínas constituye más del 5% de la masa del sustrato de leche.

45 Preferiblemente, al menos parte de la proteína en el sustrato de leche es proteína natural en la leche, tal como caseína o proteína de suero. Sin embargo, parte de la proteína puede ser proteínas no naturales de la leche.

50 El término “hidrolizado” se refiere a cualquier sustancia producida por hidrólisis. El término no se pretende que esté limitado a sustancias producidas por cualquier método específico de hidrólisis. Se pretende que el término incluya “hidrolizados” producidos por reacciones enzimáticas, así como no enzimáticos. Por ejemplo, cualquiera de las enzimas hidrolíticas conocidas (por ejemplo, proteasas, serina proteasas, metaloproteasas, hidrolasas, etc.) son capaces de producir hidrolizados dentro del significado de cómo se usa el término en el presente contexto. De forma similar, los métodos no enzimáticos de hidrólisis (por ejemplo, hidrólisis por ácido/base, etc.) también producen hidrolizados dentro del significado de cómo se usa el término en la presente solicitud. El término “hidrolizado de proteína” se refiere a un hidrolizado producido por hidrólisis de una proteína de cualquier tipo o clase. Cualquier proteína conocida puede ser hidrolizada para producir un hidrolizado de proteína dentro del significado del término. Un “hidrolizado de proteína” se puede producir por métodos enzimáticos, así como no enzimáticos y puede incluir fragmentos de proteína (por ejemplo, polipéptidos) que varían en tamaño desde dos a 100 o más aminoácidos. Además, como se usa en el presente documento, un “hidrolizado de proteína” no está limitado a un único compuesto producto, sino que puede incluir una distribución heterogénea o mezcla de productos de hidrólisis (por ejemplo, fragmentos de proteína). También puede incluir un compuesto homogéneo o fracción purificada de productos de hidrólisis. El término “proteína” se refiere a cualquier composición compuesta de aminoácidos y reconocida como una proteína por los expertos en la materia. Los términos “proteína”, “péptido”, y “polipéptido” se usan de forma intercambiable en el presente documento. El término “hidrolizado de proteína de leche” se refiere a un hidrolizado

producido por hidrólisis de una proteína de leche de cualquier tipo o clase, por ejemplo, una caseína o una proteína de suero.

Las proteasas utilizables en la presente invención es en particular proteasas de la clase EC 3.4.-.- de la Nomenclatura de Enzimas de la IUBMB, especialmente de las subclases EC 3.4.21.-, EC 3.4.22.-, EC 3.4.23.- y EC 3.4.24.-. Las clases comprenden serina proteasas, proteasas de *Bacillus*, cisteína proteasas, aspártico proteasas, metaloproteasas, proteasas clasificadas en EC 3.4.21.62, EC 3.4.22.2, EC 3.4.23.4, EC 3.4.24.28, Neutrase®, Alcalase®, subtilisina A (tipo VIII), papaína, quimosina, Colorase N, Optimase o Protease N "Amano". La proteasa se puede usar en forma purificada, por ejemplo, aislada de un microorganismo, tal como una proteasa originaria de una bacteria del ácido láctico, o se puede producir in situ por un microorganismo, tal como la bacteria del ácido láctico usada para la fermentación.

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

"Homogeneización" como se usa en el presente documento significa mezclado intensivo para obtener una suspensión soluble o emulsión. Si la homogeneización se realiza antes de la fermentación, se puede realizar de modo que se rompa la grasa de la leche a tamaños menores de modo que no se separe más de la leche. Esto se puede lograr forzando la leche a alta presión a través de orificios pequeños.

"Pasteurización" como se usa en el presente documento significa el tratamiento del sustrato de leche para reducir o eliminar la presencia de organismos vivos, tal como microorganismos. Preferiblemente, la pasteurización se logra manteniendo una temperatura especificada durante un periodo de tiempo especificado. La temperatura especificada habitualmente se logra calentando. La temperatura y duración se pueden seleccionar para destruir o inactivar ciertas bacterias, tal como bacterias dañinas. Puede seguir una etapa de enfriamiento rápido.

"Fermentación" en los métodos de la presente invención significa la conversión de hidratos de carbono a alcoholes o ácidos mediante la acción de un microorganismo. Preferiblemente, la fermentación en los métodos de la invención comprende la conversión de lactosa a ácido láctico.

"Microorganismo" puede incluir cualquier bacteria u hongo que sea capaz de fermentar el sustrato de leche. Los microorganismos usados para la mayoría de los productos de leche fermentada se seleccionan del grupo de bacterias generalmente denominadas bacterias del ácido láctico. Como se usa en el presente documento, el término "bacteria de ácido láctico" designa una bacteria gram positiva, microaerofílica o anaerobia, que fermenta azúcares con la producción de ácidos incluyendo ácido láctico como el ácido predominantemente producido, ácido acético y ácido propiónico. Las bacterias de ácido láctico industrialmente más útiles se encuentran en el orden "Lactobacillales" que incluye *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp., y *Propionibacterium* spp. Además, las bacterias que producen ácido láctico que pertenecen al grupo de las bacterias anaerobias estrictas, bifidobacterias, es decir, *Bifidobacterium* spp., en general se incluyen en el grupo de bacterias de ácido láctico. Estas se usan con frecuencia como cultivos de alimentos solas o en combinación con otras bacterias de ácido láctico. Las bacterias de ácido láctico normalmente se suministran a la industria láctea o bien como cultivos congelados o liofilizados para la propagación iniciadora en masa o como los denominados cultivos "Direct Vat Set" (DVS), que se pretenden para inoculación directa en un recipiente o cuba de fermentación para la producción de un producto lácteo, tal como un producto de leche acidificada. Tales cultivos en general se denominan "cultivos iniciadores" o "iniciadores".

Las cepas de cultivos iniciadores comúnmente usadas de bacterias de ácido láctico en general se dividen en organismo mesófilos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo a aproximadamente 30°C y organismos termófilos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo en el intervalo de aproximadamente 40°C a aproximadamente 45°C. Los organismos típicos que pertenecen al grupo mesófilo incluyen *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Las especies bacterianas de ácido láctico termófilas incluyen como ejemplos *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

También las bacterias anaerobias estrictas que pertenecen al género *Bifidobacterium* incluyendo *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum* se usan comúnmente como cultivos iniciadores lácteos y en general se incluyen en el grupo de bacterias de ácido láctico. Además, se usan especies de *Propionibacteria* como cultivos iniciadores lácteos, en particular para la fabricación de queso. Además, organismos pertenecientes el género *Brevibacterium* se usan comúnmente como cultivos iniciadores de alimentos.

Otro grupo de cultivos iniciadores microbianos son cultivos fúngicos, incluyendo cultivos de levaduras y cultivos de hongos filamentosos, que se usan particularmente en la fabricación de ciertos tipos de queso y bebidas. Los ejemplos de hongos incluyen *Penicillium roqueforti*, *Penicillium candidum*, *Geotrichum candidum*, *Torula kefir*, *Saccharomyces kefir* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En la presente invención, el microorganismo usado para la fermentación del sustrato de leche es una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

5 Opcionalmente, el sustrato de leche fermentada se puede someter a tratamiento con calor para inactivar el microorganismo.

Los procesos de fermentación que se van a usar en la producción de productos de leche acidificada se conocen bien y el experto en la materia sabe cómo seleccionar las condiciones de proceso adecuadas, tal como temperatura, oxígeno, cantidad y características de microorganismo(s) y tiempo de proceso. Obviamente, las condiciones se fermentación se seleccionan de modo que apoyen la consecución de la presente invención, es decir, obtener un producto de leche fermentada adecuado en la producción de una bebida de leche acidificada.

15 Asimismo, el experto en la materia sabrá como y cuando se tienen que usar aditivos tales como, por ejemplo, hidratos de carbono, saborizantes, minerales, enzimas (por ejemplo, cuajo, lactasa y/o fosfolipasa) en la producción de yogur según la invención.

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

25 En una forma de realización, se añade un jarabe al sustrato de leche fermentada. "Jarabe" en el contexto de la presente invención es cualquier ingrediente aditivo adicional que da sabor y/o dulzor al producto final, es decir, el yogur. Puede ser una solución que comprende, por ejemplo, azúcar, sacarosa, glucosa, azúcar líquido de fructosa, aspartamo, alcohol de azúcar, concentrado de fruta, zumo de naranja, zumo de fresa y/o zumo de limón. La mezcla del sustrato de leche fermentada y el jarabe se puede homogenizar usando cualquier método conocido en la técnica. La homogenización se puede realizar de modo que se obtenga una solución homogénea líquida que sea suave y estable. La homogenización de la mezcla del sustrato de leche acidificada y el jarabe se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica, tal como forzando la leche a alta presión a través de orificios pequeños.

35 En otra forma de realización de la invención, se añade agua al sustrato de leche fermentada, y la mezcla de sustrato de leche fermentada y agua se homogeniza.

Los métodos de la presente invención comprenden el tratamiento del sustrato de leche con una enzima que tiene actividad transglutaminasa. El tratamiento con enzima se puede realizar antes de la fermentación, tal como antes de la inoculación con el microorganismo. El tratamiento con enzima se puede realizar al mismo tiempo que la fermentación. En una forma de realización, la enzima se añade antes, al mismo tiempo o después de la inoculación del sustrato de leche con un microorganismo, y la reacción enzimática en el sustrato de leche tiene lugar esencialmente al mismo tiempo que se fermenta. De forma alternativa, el tratamiento enzimático se puede realizar después de la fermentación. Si el sustrato de leche acidificada se mezcla y opcionalmente homogeniza con el jarabe, el tratamiento enzimático se puede realizar antes o después de esto. La enzima se puede añadir al mismo tiempo o después que el jarabe, pero antes de la homogenización, o se puede añadir después de que el sustrato de leche acidificada y el jarabe se hayan mezclado y homogenizado.

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

55 En otra forma de realización preferida, el sustrato de leche se somete a tratamiento con calor, tal como pasteurización, antes del tratamiento con transglutaminasa. El tratamiento con calor se puede realizar de modo que más del 50%, preferiblemente más del 60%, más del 70% o más del 80% de la proteína de suero en el sustrato de leche se desnaturalice. En el contexto de la presente invención, la proteína de suero se desnaturaliza cuando sedimenta a pH 4,5. En una forma de realización más preferida, el sustrato de leche se somete a tratamiento con calor seguido por homogenización antes del tratamiento con transglutaminasa. Opcionalmente, el sustrato de leche fermentada se puede someter a tratamiento con calor, tal como pasteurización, para inactivar el microorganismo. Se puede realizar otro tratamiento con calor después del tratamiento enzimático de modo que se inactive la enzima.

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

Se puede realizar otro tratamiento con calor, tal como una pasteurización, después del tratamiento enzimático de modo que se inactive la enzima.

65

La enzima que tiene actividad transglutaminasa se añade en una cantidad adecuada para alcanzar el grado deseado de modificación de proteína en las condiciones de reacción elegidas. La enzima se puede añadir a una concentración de entre 0,0001 y 1 g/l de sustrato de leche, preferiblemente entre 0,001 y 0,1 g/l de sustrato de leche. Dosificando en unidades, la enzima se puede añadir a una concentración de entre 0,5 TGHU (unidades de transglutaminasa hidroxamato) y 20 TGHU de TGasa/g de proteína en el sustrato de leche, preferiblemente entre 2 y 10 TGHU de TGasa/g de proteína en el sustrato de leche.

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

El tratamiento enzimático en los métodos de la invención se puede realizar añadiendo la enzima al sustrato de leche y dejando que la reacción enzimática tenga lugar durante un tiempo de ocupación apropiado a una temperatura apropiada. El tratamiento enzimático se puede llevar a cabo en las condiciones elegidas para adaptarse a la enzima modificadora de proteína seleccionada según principios bien conocidos en la técnica. El tratamiento también se puede realizar poniendo en contacto el sustrato de leche con una enzima que se ha inmovilizado.

El tratamiento enzimático se puede realizar a cualquier pH adecuado, tal como, por ejemplo, en el intervalo de pH 2-10, tal como a un pH de 4-9 o 5-7. Puede ser preferido dejar que la enzima actúe al pH natural del sustrato de leche o, si se obtiene acidificación debido a la fermentación, la enzima puede actuar al pH natural del sustrato de leche durante el proceso de fermentación, es decir, el pH disminuirá gradualmente desde el pH del sustrato de leche sin fermentar hasta el pH del sustrato de leche fermentada.

El tratamiento enzimático se puede realizar a cualquier temperatura apropiada, por ejemplo, en el intervalo 1-80°C, tal como 2-70°C. En una forma de realización de la presente invención, el tratamiento enzimático se puede realizar preferiblemente a una temperatura en el intervalo 40-50°C. En otra forma de realización, el tratamiento enzimático se puede realizar preferiblemente a una temperatura por debajo de 10°C.

Opcionalmente, después de que se haya dejado actuar a la enzima sobre el sustrato de leche, la proteína enzima se puede eliminar, reducir, y/o inactivar por cualquier método conocido en la técnica, tal como por tratamiento con calor y/o reducción de pH.

Opcionalmente, se pueden añadir otros ingredientes al producto de leche acidificada, tal como color; estabilizantes, por ejemplo, pectina, almidón, almidón modificado, CMC, etc.; o ácidos grasos poliinsaturados, por ejemplo, ácidos grasos omega 3. Tales ingredientes se pueden añadir en cualquier punto durante el proceso de producción, es decir, antes o después de la fermentación, antes o después de tratamiento enzimático, y antes o después de la adición opcional de jarabe.

En el contexto de la presente invención, una enzima que tiene actividad transglutaminasa puede ser una enzima que cataliza la transferencia de acilo entre el grupo gamma carboxilamida de glutamina unida a péptido (donante de acilo) y aminos primarias (aceptor de acilo), por ejemplo, lisina unida a péptido. Las amidas de ácido y los aminoácidos libres también reaccionan. Las proteínas y péptidos se pueden, por tanto, entrecruzar de esta manera. La transglutaminasa también puede, por ejemplo, si las aminos están ausentes, catalizar la desanimación de residuos de glutamina en proteínas con H<sub>2</sub>O como el aceptor de acilo.

Una transglutaminasa también se puede denominar como, por ejemplo, proteína glutamina-gamma-glutamil transferasa, factor XIIIa, fibrinolisina, factor estabilizante de fibrina, glutamilpéptido gamma-glutamiltransferasa, poliamina transglutaminasa, transglutaminasa tisular, o R-glutaminiil-péptido:amino gamma-glutamil transferasa. El grupo de transglutaminasas comprende, pero no está limitado a las enzimas asignadas a la subclase EC 2.3.2.13. En el contexto de la presente invención, la transglutaminasa también se puede denominar como TGasa o TG.

Una transglutaminasa que se va a usar según la invención preferiblemente está purificada. El término "purificada" como se usa en el presente documento cubre preparaciones de proteína enzima donde la preparación se ha enriquecido para la proteína enzima en cuestión. Tal enriquecimiento podría, por ejemplo, ser: la eliminación de las células del organismo del que se produjo la proteína enzima, la eliminación del material no proteico mediante una precipitación específica de proteína o el uso de un procedimiento cromatográfico donde la proteína enzima en cuestión selectivamente se adsorbe y eluye de una matriz cromatográfica. La transglutaminasa se puede haber purificado hasta un grado de modo que solo cantidades menores de otras proteínas estén presentes. La expresión "otras proteínas" se refiere en particular a otras enzimas. Una transglutaminasa que se va a usar en el método de la invención puede estar "sustancialmente pura", es decir, sustancialmente libre de otros componentes del organismo en el que se ha producido, que puede ser o bien un microorganismo natural o un microorganismo huésped genéticamente modificado para la producción recombinante de la transglutaminasa. Sin embargo, para los usos según la invención, la transglutaminasa no necesita ser tan pura. Puede, por ejemplo, incluir otras enzimas.

En un aspecto preferido, la transglutaminasa que se va a usar en el método de la invención se ha purificado para contener al menos el 20%, preferiblemente el menos el 30%, al menos el 40% o al menos el 50% (p/p) de transglutaminasa de la proteína total. La cantidad de transglutaminasa se puede calcular de una medida de actividad

de la preparación dividida por la actividad específica de la transglutaminasa (actividad/mg de EP), o se puede cuantificar por SDS-PAGE o cualquier otro método conocido en la técnica. La cantidad de proteína total se puede, por ejemplo, medir por análisis de aminoácidos.

- 5 En una forma de realización de los métodos de la invención, la enzima que tiene actividad transglutaminasa se produce de forma recombinante.

En otras formas de realización de la presente invención, la enzima que tiene actividad transglutaminasa puede ser de origen animal, vegetal o microbiano. Las enzimas preferidas se obtienen de fuentes microbianas, en particular de hongos filamentosos o levaduras, o de una bacteria. Para los fines de la presente invención, el término "obtenida de" como se usa en el presente documento en relación con una fuente determinada significa que la enzima se origina de la fuente. La enzima se puede producir de la fuente o de una cepa en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima se ha insertado, es decir, una cepa recombinante. En una forma de realización preferida, el polipéptido obtenido de una fuente determinada se secreta extracelularmente.

15 La enzima se puede obtener, por ejemplo, de una cepa de *Agaricus*, por ejemplo, *A. bisporus*; *Ascovaginospora*; *Aspergillus*, por ejemplo, *A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. oryzae*; *Chaetomium*; *Chaetotomastia*; *Dictyostelium*, por ejemplo, *D. discoideum*; *Mucor*, por ejemplo, *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*; *Rhizomucor*, por ejemplo, *R. pusillus*; *Rhizopus*, por ejemplo, *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, por ejemplo, *S. libertiana*; *Trichophyton*, por ejemplo, *T. rubrum*; *Whetzelinia*, por ejemplo, *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, por ejemplo, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis*; *Chryseobacterium*; *Citrobacter*, por ejemplo, *C. freundii*; *Enterobacter*, por ejemplo, *E. aerogenes*, *E. cloacae* *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, por ejemplo, *E. herbicola*; *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*; *Klebsiella*, por ejemplo, *K. pneumoniae*; *Miriococcum*; *Myrothesium*; *Mucor*; *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*; *Phytophthora*, por ejemplo, *P. cactorum*; *Proteus*, por ejemplo, *P. vulgaris*; *Providencia*, por ejemplo, *P. stuartii*; *Pycnoporus*, por ejemplo, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus sanguineus*; *Salmonella*, por ejemplo, *S. typhimurium*; *Serratia*, por ejemplo, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, por ejemplo, *S. flexneri*; *Streptomyces*, por ejemplo, *S. antibioticus*, *S. castaneoglobisporus*, *S. lydicus*, *S. mobaraensis*, *S. violeceoruber*; *Streptoverticillium*, por ejemplo, *S. mobaraensis*; *Trametes*; *Trichoderma*, por ejemplo, *T. reesei*, *T. viride*; *Yersinia*, por ejemplo, *Y. enterocolitica*.

20 En una forma de realización preferida, la enzima es una transglutaminasa obtenida de una bacteria, por ejemplo, una Actinobacteria de la clase Actinobacteria, tal como de la subclase Actinobacteridae, tal como del orden Actinomycetales, tal como del suborden Streptomycineae, tal como de la familia Streptomycetaceae, tal como de una cepa de *Streptomyces*, tal como *S. lydicus* o *S. mobaraensis*. En otra forma de realización, la enzima es una transglutaminasa obtenida de un hongo, por ejemplo, de la clase *Oomycetes*, tal como del orden *Peronosporales*, tal como de la familia *Pythiaceae*, tal como de los géneros *Pythium* o *Phytophthora*, tal como de una cepa de *Phytophthora cactorum*.

30 Según la presente invención, la actividad transglutaminasa se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica, tal como incubando la enzima con grupo gamma carboxamida de glutamina unida a proteína o péptido y un grupo amino, por ejemplo, lisina unida a proteína o péptido, en un tampón a varios pH y temperaturas, por ejemplo, MES 50 mM a pH 6,5 a 37°C durante 30 minutos. La detección de la actividad enzimática se puede seguir por la liberación de amoniaco (por ejemplo, kit obtenido de Roche NH3-11877984) o usando hidroxilamina como donante de grupo amino (la cantidad de ácido glutámico gamma hidroxamato formado en la reacción se detecta como un complejo rojo con iones férricos en condiciones ácidas medido a 510 nm) o por la determinación de la épsilon-(gamma-glutamil)lisina por análisis de aminoácidos.

## Referencias

- 50 WO09016257A (Novozymes); US2009061046A (NovoZymes); WO9421129A (Novozymes); WO2007/060288A, WO05016027A; WO0110232A; EP0671885; US4289789  
Food Control, Volumen 16, Número 3, Marzo 2005, Páginas 205-209  
Journal of Dairy Science, Vol. 85, No. 7, 1705-1708  
Journal of Dairy Research (2008) 75 450-456  
55 International Dairy Journal, Volumen 16, Numero 2, Febrero 2006, Páginas 111-118

Todas las referencias citadas en este documento de patente se incorporan al presente documento en su totalidad mediante referencia.

## Dibujo

La figura 1 representa la firmeza de gel como función de la dosis de TGasa, véase el ejemplo.

## Ejemplo

- 65 Se hizo yogur a partir de 3 X 200 ml de leche entera:

Muestra 1: Leche entera con el 2% añadido de leche desnatada en polvo (LDP).

Muestra 2: Leche entera con el 1% añadido de LDP y 0,2 unidades de TGasa por gramo de proteína sustrato (U/g).

Muestra 3: Leche entera con el 1% añadido de LDP y 0,5 U/g de TGasa.

5 En todos los casos se usó leche entera fresca de Arla Foods (Arla Ekspress, "Sødmælk"). A la leche se añadió leche desnatada en polvo y se dejó hidratar durante la noche a 5C. Después la leche se trató con calor a 90C durante 20 minutos y se enfrió a la temperatura de fermentación de 43C. Después de enfriar a 43C, se añadió la cantidad necesaria de TGasa (Ajinomoto Activa YG) a la leche. Después de ello se añadió el cultivo (YL-F800, Chr. Hansen A/S) y la leche se incubó a 43C hasta alcanzar un pH de 4,7. Después la muestra se enfrió a 5C y se almacenó hasta la medida. Al día siguiente se midieron las propiedades reológicas del yogur usando un reómetro StressTech. Las medidas se hicieron a 13C. En una prueba se midió la firmeza de gel del yogur mediante un denominado barrido de frecuencia, que mide el módulo complejo ( $G^*$ ) del gel como función de la frecuencia de oscilación. El valor de  $G^*$  a 1 Hz se usó como la "firmeza de gel" del yogur. La viscosidad del yogur se midió mediante una denominada medida a velocidad constante, que mide la tensión de corte del yogur como función de la velocidad de corte. Se ha encontrado previamente que la tensión de corte a una velocidad de  $300 \text{ s}^{-1}$  se correlaciona bien con el "espesor en boca" percibido sensorial, y por tanto este valor se usó para evaluar el "espesor en boca" de los yogures. El área que se forma entre la curva de tensión de corte, cuando se aumenta la velocidad de corte y se disminuye de nuevo con frecuencia se denomina como el "bucle de histéresis". Se ha encontrado previamente que la proporción del área del "bucle de histéresis" dividido por la tensión de corte a  $300 \text{ s}^{-1}$  es una medida de la fibrosidad del yogur, y por tanto este valor (la proporción) se usó para describir la fibrosidad de los yogures.

25 La figura 1 muestra claramente que cuando se añade TGasa al yogur, incluso cuando sustituye al 1% de LDP, la firmeza de gel del yogur mejora significativamente (como función de la dosis de TGasa).

30 La tabla siguiente (Tabla 1) muestra la tensión de corte a  $300 \text{ s}^{-1}$  ("Espesor en boca") y la fibrosidad (medida como se ha descrito). Está claro que el "espesor en boca" de yogur aumenta, mientras que la fibrosidad disminuye. Esto muestra que la TGasa junto con un cultivo que produce EPS puede producir un yogur con alta firmeza de gel, alto "espesor en boca" y una textura más firme, que la anticipada de usar el cultivo que produce EPS son TGasa.

Muestra	Tensión de corte a $300 \text{ s}^{-1}$ (Pa)	Área del bucle de histéresis (-)	Proporción del área del bucle: tensión de corte superior (-)
YF-L800 (añadido 2% de LDP)	100,50	11835,73	0,44
YF-L800 (añadido 1% de LDP + 0,2 U/g TGasa)	105,97	12416,99	0,43
YF-L800 (añadido 1% de LDP + 0,5 U/g TGasa)	124,43	11611,65	0,36

Tabla 1

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir un yogur con fibrosidad disminuida, en donde dicho método comprende:
  - 5 a) proporcionar un sustrato de leche;
  - b) tratar el sustrato de leche con una enzima que tiene actividad transglutaminasa; y
  - c) fermentar el sustrato de leche con un cultivo iniciador de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* para producir el yogur, en donde dicho cultivo iniciador produce un exopolisacárido (EPS).
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa b) se realiza antes o durante la etapa c).
3. El método de la reivindicación 1, en donde el sustrato de leche se somete a pasteurización antes de la acidificación y el tratamiento con enzima se realiza antes de la pasteurización.
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde se añade glutatión al sustrato de leche antes del tratamiento con la enzima que tiene actividad transglutaminasa.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el yogur se selecciona del grupo que consiste en: un yogur de tipo firme, un yogur bebible, y un yogur que se puede coger con cuchara.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el yogur tiene un contenido sólido no graso de leche de menos del 8%.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, en donde el yogur tiene un contenido en grasa de menos del 2%.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el yogur tiene un contenido en grasa de menos del 0,5%.
- 30 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la enzima que tiene actividad transglutaminasa se produce de forma recombinante.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la enzima que tiene actividad transglutaminasa se obtiene de una bacteria que pertenece al género *Streptomyces*.
- 35 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el yogur se produce sin ninguna adición de un espesante y/o estabilizante seleccionados del grupo que consiste en pectina, gelatina, almidón, almidón modificado, carragenano, alginato y goma guar.
- 40 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde se añade un hidrolizado de proteína al sustrato de leche antes del tratamiento con la enzima que tiene actividad transglutaminasa.
13. Uso de transglutaminasa en combinación con un microorganismo que produce un exopolisacárido (EPS) para disminuir la fibrosidad de un producto de leche acidificada.
- 45 14. El uso de la reivindicación 13, en donde dicho producto de leche acidificada es un yogur.
15. El uso de la reivindicación 14, en donde dicho yogur es un yogur de tipo firme o que se puede coger con cuchara.

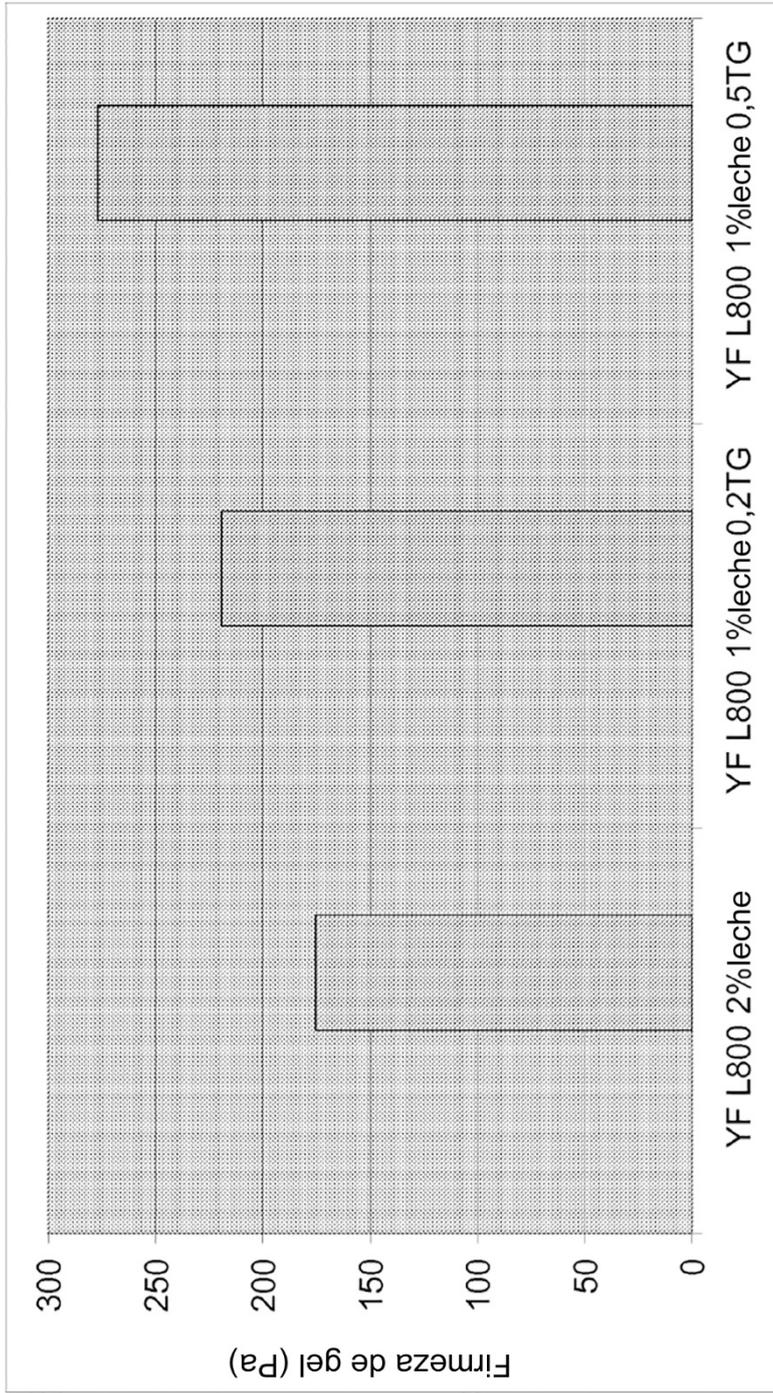


Figura 1