



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 862**

51 Int. Cl.:
A23C 19/032 (2006.01)
A23C 19/04 (2006.01)
C12N 11/02 (2006.01)
A23C 19/05 (2006.01)
A23P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01985229 .2**
96 Fecha de presentación : **17.09.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1318723**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2003**

54 Título: **Selección de compuestos activos para la cuajada durante la obtención de queso.**

30 Prioridad: **19.09.2000 EP 00203272**
14.12.2000 EP 00204533

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.04.2010

73 Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es: **Haan, de, Ben, Rudolf y**
Roos, de, Andre, Leonardus

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Selección de compuestos activos para la cuajada durante la obtención de queso.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para el atrapamiento de un compuesto activo en la cuajada durante la fabricación de queso.

10 **Antecedentes de la invención**

Los procesos de fabricación tradicionales de queso implican coagular leche para formar cuajadas sólidas y suero líquido. Típicamente, la leche se coagula enzimáticamente usando cuajo. El cuajo puede ser de origen animal, pero actualmente también se usan cuajos bacterianos. La actividad del cuajo conduce a la hidrólisis del enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -caseína. Puesto que la κ -caseína es el factor principal que estabiliza las micelas de caseína, su hidrólisis desestabiliza las micelas, que entonces coagulan en presencia de una concentración crítica de Ca²⁺. Para la mayoría de los procesos de fabricación de queso, la temperatura a la que la leche del queso coagula es alrededor de 30°C. Tras la coagulación de la leche del queso, las partículas de la cuajada se separan del suero. La cuajada contiene aproximadamente 80% de la proteína procedente de la leche (caseínas), y el suero contiene el resto (proteína del suero). La cuajada se sala entonces y se prensa para producir queso fresco.

El queso fresco se envejece entonces (madura) en las condiciones de temperatura particulares necesarias para permitir que se desarrollen el sabor y la textura deseados. Si el periodo de envejecimiento o maduración es corto, el producto se conoce como queso joven. Periodos de envejecimiento más prolongados producen queso suave, maduro y extra-maduro. A medida que el queso se envejece durante procesos de envejecimiento más prolongados, se desarrolla más sabor, incrementado el valor del queso resultante. Aunque los quesos “viejos” y “muy viejos” se venden a mayores precios en el mercado que los quesos más jóvenes, son caros de producir debido a los costes sustanciales asociados con el almacenamiento y refrigeración durante el proceso de maduración prolongado. En muchos casos, la maduración requiere hasta tres a doce meses de almacenamiento a una temperatura de alrededor de 10°C.

Si la maduración se pudiese acelerar, esto daría como resultado una reducción en los considerables costes asociados con el almacenamiento del queso durante el proceso de maduración.

Muchas enzimas originadas por ejemplo del fermento usado, tales como proteasas, peptidasas y lipasas, se utilizan como herramientas para ajustar el desarrollo complejo del sabor de los quesos.

Durante la transición de la leche líquida al estado de gel, las caseínas presentes se separan de las fracciones del suero de la leche. Las caseínas constituyen aproximadamente el 80% de las proteínas de la leche que colectivamente forman la cuajada del queso. Las proteínas restantes se clasifican como proteínas del suero. En general, la cuajada se separa de la fracción del suero en alrededor de 30-50 minutos después de la adición del coagulante a la leche. Un problema clave al utilizar enzimas en la producción de queso es seleccionar estas enzimas para la cuajada, de tal forma que se retenga suficiente actividad enzimática en la cuajada del queso durante la gelación. Típicamente, las enzimas se pierden durante la fabricación del queso durante la separación de la cuajada/suero. Por lo tanto, existe la necesidad de un medio para retener enzimas de maduración en fracciones de cuajada durante la producción del queso.

Kallasapathy *et al.*, Australian Journal of Dairy Technology, Vol. 53 (1998), página 125, XP000772499, describe estudios sobre enzimas encapsulantes para acelerar la maduración de los quesos. Como materiales encapsulantes se describen gomas alimentarias tales como agar, alginato, goma gellan, kappa e iota-carrageenano y kappa-carrageenano-goma de algarroba.

C. Perols *et al.*, Enzyme and Microbial Technology 20 (1997), página 57-60, XP-000982955, describe el atrapamiento de enzimas en perlas de gel de konjac que funden en frío, para ser usadas para la liberación controlada para la maduración del queso.

M. Wright *et al.*: Cultured Dairy Products Journal, (mayo 1990), página 11-14, XP-000646533, describe el micro-encapsulamiento de lisozima para acelerar y modificar la maduración del queso cheddar.

B. Law *et al.*: North European Food and Dairy Journal, vol. 6/87 (1987), páginas 194-199, XP-000983091, da un repaso de los métodos para el microencapsulamiento de enzimas para la tecnología de quesos. Se mencionan lipasas encapsuladas en gelatina tratada con formaldehído.

A.G.W. Janssen: Voedingsmiddelen Technologie, n° 8 (8 de abril de 1999), página 32, XP000822923, describe un sistema de enzimas líquido para uso en la maduración acelerada del queso. Se describe que las proteasas se inmovilizan en partículas más grandes, de grado alimentario. Como partículas, se usan gotitas de aceite de soja, caseínas absorbidas en gotitas de aceite de soja, y micelas de caseína.

La patente U.S. n° 4.927.644 describe un método para el atrapamiento de enzimas en la cuajada del queso produciendo agregados enzimáticos sin agentes complejantes o inmovilizantes. Las partículas enzimáticas son insolubles en

leche y, cuando la cuajada se separa del suero, los agregados enzimáticos se quedan en la cuajada. Sin embargo, puesto que los agregados enzimáticos consisten esencialmente en enzima insoluble tras la separación de la cuajada y el suero, estas enzimas están, en el mejor de los casos, parcialmente disponibles para el proceso de obtención de queso.

- 5 La patente U.S. 3.746.621 describe una microcápsula que contiene enzimas, que comprende una enzima y partículas de un sólido hinchable finamente dividido encapsulado en una sustancia aglutinante. Más particularmente, describe una microcápsula que contiene enzimas que, en estado seco, protege a la enzima, pero cuando se pone en agua se rompe rápidamente formando una disolución acuosa de la enzima. Los ejemplos de una disolución aglutinante son disoluciones acuosas de un material soluble en agua, tal como gelatina, caseína, dextrina, dextrano, o similar. Los
10 ejemplos de partículas hinchables son sílice, arcilla, almidón, dextrano en polvo, gelatina, caseína y similar.

Sumario de la invención

- 15 Para resolver los problemas mencionados anteriormente, la invención proporciona métodos para la selección de compuestos activos, tales como enzimas, para la cuajada del queso. Los métodos permiten la liberación de los compuestos activos sólo después de la separación de la cuajada y el suero, y además el compuesto activo se distribuye homogéneamente en toda la cuajada.

20 En consecuencia, la presente invención proporciona una matriz que comprende:

- un hidrocoloide; y
- una enzima en una cantidad de 0,01 a 20% p/p (basada en la materia seca de la matriz);

- 25 en la que el hidrocoloide es una proteína, la matriz está en forma de partículas, y al menos 50% de las partículas de la matriz tienen un diámetro desde 1 hasta 50 μm , la matriz tiene de 20 a 99,9% (p/p) de contenido de materia seca, y la enzima está atrapada en la matriz.

30 La presente invención proporciona además:

- un método para la producción de un queso, que comprende la adición de una matriz de la invención, en el que la matriz comprende una enzima y se añade antes de la separación de las cuajadas y el suero.

Descripción detallada de la invención

- 35 Se ha encontrado sorprendentemente que se pueden atrapar enzimas en una matriz, que se escoge o produce de tal manera que este presente homogéneamente en la cuajada. La mayoría de las enzimas serán liberadas en la cuajada tras la separación de la cuajada del suero.

- 40 Según una realización de la invención, las enzimas están atrapadas en una matriz de material hidrocoloidal. La matriz consiste en proteínas. Los ejemplos de materiales adecuados son gelatina, caseína, suero, proteína de haba de soja, albúmina. La caseína y el suero son los hidrocoloides de grado alimentario preferidos para uso en la invención, debido a que ya están presentes de forma natural en el queso. También se pueden usar productos derivados de estos hidrocoloides, tales como, por ejemplo, caseinato sódico.

- 45 También se pueden usar uno o más de los hidrocoloides mencionados anteriormente, en combinación entre sí. En una realización preferida, se usan caseína y suero. La enzima se distribuye preferiblemente de forma homogénea por toda la matriz.

- 50 La enzima se incorpora en el producto de queso final debido a la matriz. En general, la enzima tendrá una función durante el proceso de maduración o de almacenamiento del queso. La enzima puede influir por ejemplo en la estructura, el sabor, la capacidad de almacenamiento y el proceso de envejecimiento del queso.

- 55 Una distribución homogénea de la enzima atrapada puede dar lugar a cierta pérdida inicial. Esto se puede reducir secando la matriz. En consecuencia, la matriz estará en una forma seca que contiene de 80 a 99,9% (p/p) de materia seca, dependiendo del hidrocoloide usado, como lo apreciará la persona experta, preferiblemente 90 a 99,5% (p/p) y lo más preferible de 92 a 98% (p/p de materia seca) cuando se añade a la leche.

- 60 En general, se añadirá de 0,01 a 5% (p/p) de matriz (que contiene el compuesto activo, es decir, una enzima) a la leche. Preferiblemente, se añade de 0,1 a 2% p/p en la obtención de queso normal. La propia matriz contendrá de 0,01 a 20% p/p (basado en la materia seca) de la enzima, preferiblemente de 0,05 a 10%, y más preferiblemente de 0,1 a 5% p/p.

- 65 Los ejemplos de enzimas que se añaden como el compuesto activo son proteasas, peptidasas, aminotransferasas, lisasas y lipasas, y sus combinaciones. Preferiblemente se usan enzimas solubles.

La función de hinchamiento de la matriz de hidrogel se usa para evitar la pérdida inicial de los compuestos activos. Las enzimas están presentes preferiblemente como enzimas solubles, y por lo tanto sólo se disolverán en la matriz de

hidrogel cuando la matriz se ponga en contacto con la leche. La matriz de hidrogel seca se hinchará inicialmente, y sólo cuando se absorba suficiente agua las enzimas se disolverán y difundirán en la leche. De esta manera es posible atrapar las enzimas durante un tiempo suficiente en la matriz, de forma que las enzimas sólo están sustancialmente disponibles después de la separación de la cuajada del suero.

Al menos 40%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 70%, e incluso más preferiblemente al menos 90% (p/p) de la enzima es retenida en la cuajada hasta después de la etapa de separación de la cuajada/suero. La retención o atrapamiento de la enzima en la cuajada o queso está determinado preferiblemente según el procedimiento como se describe en el Ejemplo 7. Debido a que la matriz está en general destinada al uso en la obtención de queso, las enzimas a atrapar tendrán ventajosamente un efecto en el queso o el proceso de obtención del queso, y en general son compuestos de grado alimentario.

También se ha encontrado que la selección del tamaño de partículas de la matriz es un aspecto importante de la invención. Las partículas apropiadas de la matriz deben de ser suficientemente grandes para ser atrapadas en la cuajada, por ejemplo mayores que $1\ \mu\text{m}$, según se mide mediante analizadores de tamaños de partículas por medio de la dispersión de la luz láser, como el Malvern Mastersizer. Las partículas de la matriz secas de menos de $50\ \mu\text{m}$ son suficientemente pequeñas para que estén presentes homogéneamente en la cuajada sin afectar a la estructura de la cuajada y el queso resultante. En consecuencia, el 50% (p/p), preferiblemente 70%, y más preferiblemente 90% de las partículas de la matriz seca de la invención tienen un tamaño de 1 a $50\ \mu\text{m}$, preferiblemente de 5 a $30\ \mu\text{m}$. Por tamaño de partículas se quiere decir aquí el diámetro más grande de una partícula.

La densidad de la matriz hinchada se ha de escoger de tal forma que la matriz esté distribuida homogéneamente en toda la cuajada. En consecuencia, la densidad relativa de la matriz hinchada (en forma húmeda) es preferiblemente próxima a la densidad de la leche. La densidad de la matriz se puede ajustar, si es necesario, añadiendo compuestos adicionales. Incorporando por ejemplo grasas o ceras en la matriz, se puede reducir la densidad de la matriz. Estos compuestos grasos se añaden preferiblemente a la matriz en forma dispersa. Para incorporar estos compuestos grasos, en general se usarán emulsionantes. Preferiblemente, el emulsionante es idéntico a la matriz. Por ejemplo, se puede usar caseinato de sodio para la matriz así como para el emulsionante. Típicamente, para la matriz se usará una concentración elevada de caseinato, mientras que los materiales grasos se emulsionarán en una disolución más pequeña de caseinato. La concentración y el tipo de grasa o cera también se pueden seleccionar para ralentizar el proceso de hinchamiento. En general, cuanto más grasa o cera se use, más lento es el proceso de hinchamiento.

Como se ha explicado anteriormente, existen varios mecanismos para controlar la liberación de la enzima a partir de la matriz a un tiempo seleccionado o preferido. La liberación de la enzima puede ser influida además activamente añadiendo compuestos tales como grasas o ceras, o seleccionando la relación apropiada de matriz/enzima. En general, cuanto mayor es esta relación, menor es la velocidad de liberación de la enzima.

Según una realización de la invención, la enzima se puede atrapar en la matriz introduciendo la enzima en una forma soluble de la matriz y cambiando subsiguientemente el entorno de la matriz, para hacer que la matriz solidifique. Según una realización, para obtener la solidificación, se usa un cambio del pH; por ejemplo, la reducción del pH de una disolución de caseinato de sodio coagulará la matriz.

Otra manera de retener la enzima en la matriz se puede lograr seleccionando hidrocoloides que sean fluidos a una temperatura más elevada, pero que solidifiquen a una temperatura más baja, tal como gelatina. Este medio de inmovilización de la enzima mediante reducción de la temperatura es posible. También se puede usar albúmina. Se puede usar un incremento de la temperatura para fijar el compuesto activo en una matriz de albúmina solidificada. En aún otra realización de la invención, se usa la selección de sales. En este caso, se escoge una matriz, con lo que se usan sales para fijar los hidrocoloides solubles.

Uno de los sistemas de matriz preferidos es la caseína. Típicamente, una disolución muy concentrada de caseinato de sodio se mezcla con el compuesto activo. Esta disolución acuosa contiene preferiblemente 10 a 40% p/p de caseinato de sodio, preferiblemente 10 a 35% p/p, más preferiblemente 15 a 30% p/p. Preferiblemente, el compuesto activo se disuelve en agua antes de añadirlo a la disolución concentrada de caseinato de sodio.

Después de mezclar se añade ácido a fin de reducir el pH hasta aproximadamente el punto isoeléctrico, para inducir la coagulación. Como resultado, el compuesto activo es atrapado completamente en la caseína coagulada. En el caso en el que se use una baja concentración de disolución de caseinato de sodio, se puede producir una superprecipitación, y parte de la actividad del compuesto activo se puede perder; por lo tanto se prefieren concentraciones elevadas de caseinato de sodio.

Subsiguientemente, la matriz coagulada aún húmeda se seca preferiblemente y se muele para producir partículas finas. Se pueden usar los procesos de secado y molienda conocidos en la técnica, tales como secado, secado a vacío, o secado en lecho fluidizado.

Después de secar y moler, la matriz de caseína tendrá un tamaño de partículas de 1 - $50\ \mu\text{m}$, más preferiblemente de 5 a $30\ \mu\text{m}$, e incluso más preferiblemente de 10 a $20\ \mu\text{m}$.

En general, una formulación adecuada para inmovilizar enzimas para uso en la invención se puede preparar de la siguiente manera.

Primero se mezcla una disolución de una matriz adecuada junto con la enzima.

El mezclamiento se puede hacer en un mezclador adecuado, por ejemplo con un mezclador de pasta eléctrico equipado con una batidora de mariposa. La mezcla solidifica a medida que el mezclamiento continúa.

Las partículas de la matriz obtenidas contienen la enzima, y se secan subsiguientemente, por ejemplo, en un secador de bandeja de vacío.

Las partículas secas se pueden moler, por ejemplo con un molino de corte centrífugo.

El polvo seco obtenido se puede almacenar a temperatura ambiente.

Otra matriz preferida para uso en la invención es la proteína del suero. La desnaturalización térmica desplegará tales proteínas globulares en enrollamientos más o menos al azar de cadenas peptídicas que, al enfriarse, formarán agregados vía diversos tipos de interacciones. Estas interacciones pueden ser de naturaleza electrostática, hidrófoba o covalente. Las interacciones reticulantes atraparán moléculas de agua, y se formará un gel. Un gel de proteína se puede definir como una matriz o red tridimensional en la que se producen interacciones polímero-polímero de manera ordenada, dando como resultado la inmovilización de grandes cantidades de agua mediante una pequeña proporción de la proteína.

Las funcionalidades del gel, tales como viscoelasticidad y aspecto externo (opalescencia), se determinan mediante variables del proceso tales como pH, fuerza iónica, valencia de los iones, concentración de los constituyentes, grado de desnaturalización proteínica y el tiempo de reacción. La gelación real tendrá lugar cuando ya se ha enfriado la disolución de las proteínas. Además, el momento de la gelación se puede iniciar mediante adición de iones tales como sodio o calcio.

Se ha encontrado que, durante el proceso de gelación de hidrocoloides, se pueden atrapar proteínas activas (tales como enzimas) o hidratos de carbono en la red reticulante del gel. Puesto que la gelación tendrá lugar a menores temperaturas, las proteínas activas no perderán actividad debido a la desnaturalización térmica.

El procesamiento posterior de tal gel a base de proteína del suero, que consiste en cortar el gel, secar y moler, dará como resultado partículas secas de proteína del suero de tamaño definido que contienen el compuesto activo atrapado. De esta manera se puede obtener una formulación de grado alimentario de un hidrocoloide bioactivo con una retención total de la actividad del compuesto activo. Durante el proceso de fabricación del queso, debido al tamaño de las partículas, el compuesto activo será atrapado sustancialmente en la cuajada y no terminará en la fracción del suero, o sólo terminará parcialmente en la fracción del suero.

La matriz de la presente invención se puede usar en la producción de queso duro o blando, tal como cheddar, gouda, edam, etc.

Medición

Este ejemplo describe el método que se usó para analizar la cantidad de amino-peptidasa activa. Se disolvió polvo de enzima en un tampón de fosfato de 0,05 M, pH = 7,2, a 20°C, suspendiendo 1 g de polvo de enzima en 99 ml de disolución de tampón. La disolución de enzima obtenida se diluye en consecuencia 10, 100 y 1000 veces para obtener la disolución apropiada para los análisis de actividad enzimática final.

La disolución enzimática obtenida se analiza incubando 0,1 ml de disolución enzimática como tal, o diluida en un intervalo de dilución. La incubación (30°C) se realiza en una cubeta mezclando con 0,9 ml de una disolución 260 ppm de L-fenilalanina-para-nitroanilida (adquirida de Sigma P 4673) en 0,05 M de tampón de fosfato, pH = 7,2, frente a un blanco en el tiempo. La medición se realizó a 30°C, durante 4 minutos, usando un espectrofotómetro Uvicon 933. La actividad se calculó a partir de la extinción delta por minuto usando un coeficiente de extinción molar de 8800 ml/mol*cm.

Medición de la actividad enzimática presente en la matriz

Este ejemplo describe el método que se usó para analizar la cantidad de amino-peptidasa inmovilizada activa. Se suspendió 1 g de las partículas de enzima en 100 ml de un tampón de fosfato (0,05M, pH = 7,2, 20°C). Se varió el tiempo de suspensión para obtener información sobre el tiempo de liberación de la enzima activa a partir de las partículas.

La disolución enzimática disuelta se aísla de la dispersión pipeteando directamente, o centrifugando la dispersión y pipeteando a partir de la capa superior transparente.

ES 2 335 862 T3

La disolución enzimática obtenida se analiza incubando a 30°C 0,1 ml de disolución enzimática como tal y 0,1 ml de muestras procedentes de un intervalo de dilución de 10, 100 y 1000 veces, para obtener la concentración enzimática apropiada. La incubación en la cubeta se realizó con 0,9 ml de una disolución 260 ppm de L-fenilalanina-para-nitroanilida (adquirida de Sigma P 4673) en 0,05 M de tampón de fosfato, pH = 7,2, frente a un blanco en el tiempo.

La medición se realizó a 30°C, durante 4 minutos, usando un espectrofotómetro Uvicon 933.

La actividad se calculó a partir de la extinción delta por minuto usando un coeficiente de extinción molar 8800 ml/mol*cm.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención

Ejemplo comparativo 1

Se determinó la concentración óptima de matriz necesaria para obtener un sistema enzimático de matriz solidificada sin humedad externa (sinerasa) concomitante durante la gelación. Esto permitió que se minimizase la pérdida de enzima durante la formulación.

Se disolvió caseinato de sodio, tipo Miprodan 30 (adquirido de MD Foods Ingredients, Dinamarca), en agua del grifo a 20°C en concentraciones de 10% (p/p), 15% (p/p), 20% (p/p) y 25% (p/p).

La solidificación se obtuvo calentando 1000 g de proteína disuelta hasta 50°C para reducir la viscosidad, y solidificando en consecuencia la disolución durante la agitación añadiendo una disolución de 4M de tampón de acetato pH = 4,0.

Todas las concentraciones de caseína sódica se comportan adecuadamente, pero los mejores resultados se obtuvieron con una concentración de al menos 20% (p/p) de caseinato de sodio.

Ejemplo 2

La enzima Accelerzyme™ AP 2000 (una amino-peptidasa) se inmovilizó en caseinato de sodio tipo Miprodan 30.

Se añadieron lentamente 250 g de caseinato de sodio a 715 g de agua del grifo a 20°C. Los dos se agitaron entonces juntos con un mezclador de pasta eléctrico en el soporte 1, tipo N-50, (de Hobart), equipado con un batidor de mariposa.

Cuando el caseinato de sodio se dispersó completamente en el agua, la mezcla se calentó hasta 50°C y se mezcló hasta que el caseinato de sodio se disolvió completamente.

Se disolvieron 10 g de Accelerzyme AP 2000 (DSM-Gist, Delft, Holanda) en 25 g de agua del grifo a 50°C, y después se añadió a la mezcla de caseinato de sodio mientras se agitaba.

A la disolución agitada se añadieron lentamente 30 g de tampón de acetato de Na (4M, pH = 4,0) en porciones de 5 g, y esta disolución se agitó hasta que se produjo la solidificación completa de la disolución.

Las partículas obtenidas se recogieron y se secaron subsiguientemente extendiendo sobre las bandejas de secado de un secador de bandejas de vacío toda la noche a 30°C y 0,1 bares de presión absoluta.

Las partículas secas obtenidas se molieron entonces con un molino de corte centrífugo tipo ZM1 (de Retsch), con un filtro metálico de caudal máximo de 120 µm.

El 90% de las partículas contadas tuvieron un tamaño medio de partículas de 10-15 µm cuando se midieron con un analizador de tamaño de partículas Malvern Mastersizer S.

El polvo obtenido se recogió y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

Ejemplo 3

La enzima Accelerzyme™ AP 2000 se inmovilizó en una matriz de proteína de suero gelada. Se usó un aislado de proteína de suero (WPI) de tipo Bipro (Danisco International Inc.).

Se disolvieron 10 g de WPI toda la noche en 100 ml de agua destilada milli-Q, con agitación lenta. La disolución se dializó extensamente (corte del peso molecular de la membrana porosa molecular aproximadamente 3.5000 Da - Spectra-Por) en 5 l de agua milli-Q, para reducir la fuerza iónica. El agua se renovó dos veces.

ES 2 335 862 T3

La disolución se calentó durante 30 minutos hasta 85°C. Tras enfriar hasta 30°C, se añadieron 664 mg de la Accelerzyme a 100 ml de la disolución de WPI. El pH de la disolución se ajustó hasta pH = 10 con NaOH 0,1 N. Se añadió a la disolución 5% en volumen de una disolución de CaCl₂ (0,2 M). La gelación se produjo a 30°C, para dar un gel transparente. El gel se cortó en pequeños trozos (tamaño de alrededor de cc) y se congelaron (-20°C).

El gel se secó entonces a vacío durante 48 horas, y se molió entonces en un mortero. El polvo obtenido se recogió y se almacenó a 4°C para uso posterior.

Ejemplo 4

Se evaluó el comportamiento en suspensión de las partículas descritas en los Ejemplos 2 y 3.

A fin de tener una buena interpretación visible de las capacidades de la suspensión de las partículas obtenidas, las partículas se introdujeron en un medio de leche sintética diseñado por Jenness y Koops (Jenness R. y Koops J. Neth Milk Dairy J. (1962)).

Se añadió 1 g de los polvos obtenidos en los Ejemplos 2 y 3 a 100 ml del medio de Jenness-Koops, y se mezcló.

La suspensión se observó en busca de sedimentación, flotamiento en la superficie y suspensión al azar en la disolución durante 30 minutos. No se observó sedimentación ni flotamiento.

Ejemplo 5

Se estudió la liberación de la enzima a partir de las partículas obtenidas en el Ejemplo 2 durante la hidratación.

Las partículas se suspendieron para adecuarse al método usado en el Ejemplo 4, y se agitaron suavemente durante 3 días.

Se tomaron muestras de la fase acuosa de la suspensión agitada en diversos puntos de tiempo, y se midieron subsiguientemente para determinar la actividad enzimática específica.

Los resultados se presentan en la Tabla 1.

TABLA 1

Liberación de la enzima durante la hidratación del polvo de enzima seco

Tiempo de la muestra después de la hidratación	Actividad enzimática relativa en la fase acuosa, %
30 minutos	0
60 minutos	3
90 minutos	6
72 horas	56

Actividad relativa: con relación a la actividad enzimática antes de la fijación en la matriz.

Ejemplo 6

Se estudió la liberación de la enzima a partir de las partículas obtenidas en el Ejemplo 3 durante la hidratación.

Las partículas se suspendieron para adecuarse al método usado en el Ejemplo 4, y se agitaron suavemente durante una hora.

Se tomaron muestras de la fase acuosa de la suspensión agitada en diversos puntos de tiempo, y se midieron subsiguientemente para determinar la actividad enzimática específica.

ES 2 335 862 T3

Los resultados se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2

Tiempo de disolución (min)	Actividad de Accelerzyme en el sobrenadante (%)
10	9,8
20	34,9
40	47,5
60	53,6

Ejemplo 7

El polvo de enzima del Ejemplo 2 se introdujo en el queso.

El queso se obtuvo según el siguiente método (Shakeel-Ur-Rehm an, McSweenly, P.L.H. y Fox, 8.F., 1998. Protocol for the manufacture of miniature cheeses. Lait 78, 607-620).

Se pasteurizó un 1 litro de leche fresca calentando durante 30 minutos a 63°C.

La leche pasteurizada se transfirió entonces a una cuba de plástico para quesos de boca ancha (200 ml), y se enfrió hasta 31°C.

Se añadió fermento (2% en el caso de fermento fresco, Direct Set® DS 5LT1 adquirido de DSM -Food Specialties Australia, saquito de 0,5 unidades 1,8 unidades/1,000l que corresponde a 0,72 ml de fermento/200 ml), y se incubó durante 20 minutos.

Se añadieron 132 µl de CaCl₂ (1 M), seguido de la adición de 43,5 µl de cuajo (Maxiren® 15 T adquirido de DSM Food Specialties).

Se añadieron 2 g de una formulación según el Ejemplo 2, y la mezcla se agitó entonces durante 10 minutos.

Después de 50 minutos, se formó un coágulo sólido. El coágulo se cortó manualmente mediante alambre estirado 1 cm de separación a través de un marco. La curación se permitió durante 2 minutos, seguido de una agitación suave durante 10 minutos. La temperatura se incrementó gradualmente hasta 38°C durante 30 minutos, y la mezcla de cuajadas/suero se agitó continuamente. Al alcanzar un pH de 6,2, las mezclas de cuajadas/suero se centrifugaron a temperatura ambiente durante 60 minutos a 1.700 g. El suero se drenó, y las cuajadas se mantuvieron en un baño de agua a 36°C. Los quesos se invirtieron cada 15 minutos hasta que el pH disminuyó hasta 5,2-5,3, y entonces se centrifugaron a 1.700 g durante 20 minutos. Después de un drenaje adicional del suero, los quesos se salaron con salmuera (20% de NaCl, 0,05% de CaCl₂.H₂O) durante 30 minutos a temperatura ambiente en botellas. Después de salar, los quesos se retiraron de las cubas para quesos, se limpiaron con un papel de tejido, se envasaron a vacío y se maduraron a 12°C. Se estableció un balance de masas para controlar la posible pérdida de actividad enzimática durante la producción. Se tomaron muestras en cada etapa en el proceso de fabricación del queso. Las muestras se almacenaron a -20°C. En la Tabla 3 se da un balance de masas de las muestras obtenidas.

ES 2 335 862 T3

TABLA 3

Balance de masas del proceso de obtención del queso

Balance de masas del queso	% de actividad enzimática encontrada
Después de añadir el fermento	24
Después de añadir CaCl_2	39
Después de cortar	35
Después de incrementar la temperatura	23
Después de la primera etapa de centrifugación	37
Fracción de suero	0

Debido al atrapamiento de la enzima en la matriz, no se encontrará toda la actividad en el queso/cuajada.

REIVINDICACIONES

1. Una matriz que comprende:

- un hidrocoloide; y

- una enzima en una cantidad de 0,01 a 20% p/p (basada en la materia seca de la matriz),

en la que el hidrocoloide es una proteína, la matriz está en forma de partículas y al menos 50% de las partículas de la matriz tienen un diámetro de 1 a 50 μm , y la matriz tiene de 80 a 99,9% (p/p) de contenido de materia seca, y la enzima está atrapada en la matriz.

2. Una matriz según la reivindicación 1, en la que la enzima es soluble o parcialmente soluble en agua.

3. Una matriz según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que el hidrocoloide se selecciona de suero, un derivado de suero, caseína, un derivado de caseína, y una combinación de al menos dos de estos hidrocoloides.

4. Una matriz según la reivindicación 3, en la que el hidrocoloide es suero o un derivado de suero.

5. Una matriz según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la enzima es una proteasa, una peptidasa, una amino transferasa, una lisasa, una lipasa, o una combinación de las mismas.

6. Un método para la producción de queso, que comprende la adición de una matriz como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la matriz se añade antes de la separación de la cuajada del suero.

7. Uso de una matriz en la separación de queso, comprendiendo dicha matriz:

- un hidrocoloide; y

- un compuesto activo en una cantidad de 0,01 a 20% p/p (basada en la materia seca de la matriz),

en el que el hidrocoloide es una proteína, la matriz está en forma de partículas y al menos 50% de las partículas de la matriz tienen un diámetro de 1 a 50 μm , la matriz tiene de 80 a 99,9% (p/p) de contenido de materia seca, y el compuesto activo está atrapado en la matriz.

8. Uso según la reivindicación 7, en el que el compuesto activo es soluble o parcialmente soluble en agua.

9. Uso según la reivindicación 7 o reivindicación 8, en el que el compuesto activo es una enzima.

10. Uso según la reivindicación 9, en el que la enzima es una proteasa, una peptidasa, una amino transferasa, una lisasa, una lipasa, o una combinación de las mismas.

11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el hidrocoloide se selecciona de suero, un derivado de suero, caseína, un derivado de caseína, y una combinación de al menos dos de estos hidrocoloides.

12. Uso según la reivindicación 11, en el que el hidrocoloide es suero o un derivado de suero.