

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 023 033**

51 Int. Cl.:

**A23C 9/127** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2015** E 15185867 (7)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2025** EP 3143879

54 Título: **Yogur con maduración reducida**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.05.2025**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.00%)**  
**Wilhelminasingel 39**  
**6221 BE Maastricht, NL**

72 Inventor/es:

**GRABINSKI, DOMINIK BOHDAN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 3 023 033 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

Yogur con maduración reducida

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un producto lácteo fermentado, que es un yogur. Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un yogur que tiene una maduración reducida. Según aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit de piezas. Según todavía otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido que tiene actividad de quimosina.

10 **Antecedentes de la invención**

La industria alimentaria utiliza diferentes bacterias, sobre todo en forma de fermentos, en particular bacterias lácticas, para mejorar el sabor y la textura de los alimentos, pero también para prolongar la vida útil de los mismos. En el caso de la industria láctea, las bacterias lácticas se utilizan intensamente para provocar la acidificación de la leche (por fermentación), pero también para texturizar el producto al que se incorporan. Entre las bacterias lácticas utilizadas en la industria alimentaria, se pueden mencionar los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Las especies bacterianas lácticas *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* se utilizan en particular en la formulación de los fermentos utilizados para la producción de leches fermentadas, por ejemplo yogures.

La acidez producida en el yogur depende principalmente de la actividad acidificante del cultivo de yogur (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*), y por tanto, de la cantidad de ácido láctico producido durante la maduración de la leche, y también de la acidez residual producida durante el almacenamiento en frío. La textura también varía durante el almacenamiento, y participa en las propiedades sensoriales del producto final. La receta del yogur también influye en las propiedades sensoriales del mismo, modificando la textura o la percepción del aroma.

Los productos lácteos fermentados, tales como los yogures, a menudo se fortifican con proteínas adicionales para aumentar el espesor de los productos. Las proteínas más utilizadas para este propósito son fuentes de proteína de leche tales como caseinatos, aislados de proteína de suero, y leche desnatada en polvo.

Los precios de las proteínas están aumentando debido a la creciente demanda. Esto también es válido para las proteínas de la leche. Por ello, la fortificación de productos lácteos fermentados con proteínas de leche es cada vez más cara. Como resultado, las empresas lácteas están buscando oportunidades para reducir el contenido de proteína de leche que se utiliza para la fortificación de los productos lácteos fermentados.

La reducción del contenido de proteína de leche en los productos lácteos fermentados tiene un coste. Las proteínas de leche son clave para generar una determinada fuerza de gel proteico dentro del producto lácteo. La reducción del contenido de proteína conduce a una reducción de la fuerza del gel, y como resultado, se reduce el espesor del yogur en la percepción sensorial. Esto es indeseable, y supone una fuerte restricción al grado en que se puede reducir el contenido de proteína en los productos lácteos fermentados. La solución para reducir el contenido de proteína es encontrar un medio para compensar la pérdida de fuerza del gel. Existen varios métodos conocidos por el experto en la técnica, tal como la introducción de agentes texturizantes. Se pueden utilizar agentes texturizantes, tales como estabilizadores y gelatina, para reducir la cantidad de proteína de leche añadida. Si bien el uso de agentes texturizantes, tales como estabilizadores, en el yogur puede ser más rentable que la adición de proteína de leche, su uso está restringido por las leyes de regulación y etiquetado.

Otra solución para proporcionar productos lácteos fermentados con mayor textura es añadir enzimas durante el procedimiento de fabricación para proteolizar la caseína de la leche, tal como la kappa-caseína. El documento US2005/0095317 describe un tratamiento kappa-caseinolítico mediante el uso de una quimosina, que se utiliza ampliamente en la producción de queso.

El documento WO2015/128417 describe variantes de quimosina con propiedades de coagulación de la leche mejoradas.

El documento US2011/008492 describe métodos para coagular la leche bovina y elaborar un producto lácteo tal como queso utilizando un coagulante idéntico o sustancialmente idéntico a una quimosina originaria de un animal del suborden Tylopoda.

El documento US2014/072670 describe métodos para producir de forma recombinante quimosina no bovina.

Sin embargo, una desventaja de añadir enzimas proteolíticas al procedimiento de fabricación de productos fermentados es que la fuerza proteolítica en el producto fermentado derivado, tal como el yogur, es demasiado alta, lo que da como resultado una mayor maduración del producto fermentado debido a la proteólisis en curso durante la vida útil del producto fermentado.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un procedimiento de fabricación de productos lácteos fermentados, en el que el producto lácteo fermentado proporcionado, es decir, el yogur, tenga una textura deseada, así como una maduración reducida.

## 5 **Definiciones**

El término "leche" pretende abarcar leches de origen mamífero y vegetal o mezclas de las mismas. Preferentemente, la leche procede de una fuente de mamíferos. Las fuentes de leche de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, la vaca, la oveja, la cabra, el búfalo, el camello, la llama, la yegua y el ciervo. En una realización, la leche proviene de un mamífero seleccionado del grupo que consiste en vaca, oveja, cabra, búfalo, camello, llama, yegua y ciervo, y combinaciones de los mismos. Las fuentes vegetales de leche incluyen, pero no se limitan a leche extraída de soja, guisante, cacahuete, cebada, arroz, avena, quinoa, almendra, anacardo, coco, avellana, cáñamo, semilla de sésamo y semilla de girasol. Además, el término "leche" se refiere no solo a la leche entera, sino también a la leche desnatada o cualquier componente líquido derivado de la misma.

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, la expresión "producto lácteo fermentado" se refiere a un producto que se ha fermentado con bacterias de ácido láctico tales como *Streptococcus thermophilus* y opcionalmente *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, pero también, opcionalmente, otros microorganismos tales como *Lactobacillus delbruekii* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, o cualquier microorganismo derivado de los mismos. Las cepas de ácido láctico distintas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, tienen como finalidad conferir al producto acabado diversas propiedades, tal como la de favorecer el equilibrio de la flora. El proceso de fermentación aumenta la vida útil del producto al tiempo que mejora y optimiza la digestibilidad de la leche. Hoy en día se pueden encontrar en el mundo muchos tipos diferentes de productos lácteos fermentados. Algunos ejemplos son la leche agria (por ejemplo, suero de leche), la crema agria y el yogur.

Como se utiliza aquí, el término "yogur" es un producto lácteo fermentado producido por fermentación de la leche por bacterias de ácido láctico, también conocidas como "cultivos de yogur". La fermentación de la lactosa en la leche produce ácido láctico, que actúa sobre la proteína de la leche para darle al yogur su textura. El yogur puede elaborarse a partir de leche de vaca, cuya proteína está compuesta principalmente por caseína, que es la que se utiliza más comúnmente para elaborar yogur, pero también puede utilizarse leche de oveja, cabra, búfalo, camello, llama, yegua, ciervo, búfalo de agua, ovejas y/o yeguas, y combinaciones de las mismas. El término "yogur" comprende además, aunque no se limita a, yogur tal como se define según la reglamentación francesa y europea, por ejemplo productos lácteos coagulados obtenidos por fermentación láctica únicamente por medio de bacterias de ácido láctico termófilas específicas (es decir, *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) que se cultivan simultáneamente y se encuentran vivas en el producto final en una cantidad de al menos 10 millones de UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de yogur. Es preferible que el yogur no reciba tratamiento térmico después de la fermentación. Los yogures pueden contener opcionalmente materias primas lácteas añadidas (por ejemplo, nata y/o proteínas) u otros ingredientes tales como azúcar o edulcorantes, uno o más aromatizantes, cereales o sustancias nutricionales, especialmente vitaminas, minerales y fibras. Este yogur responde ventajosamente a las especificaciones para leches fermentadas y yogures de la norma AFNOR NF 04-600 y/o de la norma codex StanA-Ila-1975. Para cumplir con la norma AFNOR NF 04-600, el producto no debe haber sido calentado después de la fermentación, y las materias primas lácteas deben representar un mínimo del 70% en peso del producto terminado. El yogur incluye el yogur sólido, el yogur batido, el yogur bebible, el petit suisse, el yogur tratado térmicamente, y los productos similares al yogur. Preferiblemente, el yogur será un yogur batido o un yogur bebible. Lo más preferible, el yogur es un yogur batido.

La expresión "composición de cultivo iniciador" o "composición" (también denominado "iniciador" o "cultivo iniciador"), como se utiliza aquí, se refiere a una composición que comprende una o más bacterias de ácido láctico, que son responsables de la acidificación de la base de la leche. Las composiciones de cultivos iniciadores pueden ser frescas (líquidas), congeladas o liofilizadas. Los cultivos liofilizados se tienen que regenerar antes del uso. Para la producción de un producto lácteo fermentado, la composición de cultivos iniciadores se añade habitualmente en una cantidad de 0,01 a 3%, preferiblemente de 0,01 a 0,02% en peso de la cantidad total de base de leche.

Como se utiliza aquí, la expresión "bacterias de ácido láctico" (BAL) o "bacterias lácticas" se refiere a bacterias de grado alimentario que producen ácido láctico como el principal producto final metabólico de la fermentación de hidratos de carbono. Estas bacterias están relacionadas por sus características metabólicas y fisiológicas comunes, y suelen ser bacilos o cocos grampositivos, de bajo contenido de GC, tolerantes al ácido, no esporulantes, no respirantes y con forma de bastón. Durante la etapa de fermentación, el consumo de lactosa por estas bacterias provoca la formación de ácido láctico, reduce el pH y conduce a la formación de un coágulo de proteína (de la leche). Estas bacterias son responsables de la acidificación de la leche y de la textura del producto lácteo fermentado. Como se utiliza aquí, la expresión "bacterias de ácido láctico" o "bacterias lácticas" abarca, pero no se limita a, bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., tal como *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium breve*.

Aquí, "quimosina" indica típicamente una proteasa aspártica, grupo 3.4.23.4 según la Nomenclatura Enzimática, 1992 de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, IUBMB. La quimosina es producida naturalmente por las células principales gástricas en los mamíferos jóvenes. La quimosina es el principal componente enzimático del cuajo. El cuajo de ternera se obtiene del revestimiento del abomaso (la cuarta y última cámara del estómago) de terneros jóvenes no destetados.

Aquí, la expresión "relación C/P" se refiere a la actividad de coagulación dividida entre la actividad proteolítica de una muestra de enzima específica. El método para medir la actividad de coagulación (C) cuantificará la eficiencia de la muestra de enzima para hidrolizar la kappa-caseína (k-CN) en una posición específica (F105M106). La actividad proteolítica (P) cuantificará la capacidad del coagulante para hidrolizar la caseína en pequeños fragmentos de péptidos (solubles en TCA) y aminoácidos.

Aquí, el término "IMCU" se entiende como Unidades Internacionales de Coagulación de la Leche. Una IMCU equivale a alrededor de 0,126 nmol de quimosina B bovina (por ejemplo, Maxiren o CHY-MAX). La fuerza de una enzima de coagulación de la leche (tal como la enzima quimosina presente en una composición de la presente invención) se determina como la actividad de coagulación de la leche (IMCU por ml o por gramo). Tras la adición de coagulante diluido a un sustrato de leche estándar, la leche floculará. El tiempo de coagulación de la leche es el período de tiempo desde la adición del coagulante hasta la formación de copos o grumos visibles en el sustrato de la leche. La fuerza de una muestra de coagulante se determina comparando el tiempo de coagulación de la leche para la muestra con el de un estándar de referencia, un normal. Esto se expresa en la norma IDF 157A:1997, que da la definición de IMCU: La actividad total de coagulación de la leche del primer lote de polvo estándar de referencia de quimosina de terneros se ha establecido de una vez por todas en 1000 Unidades Internacionales de Coagulación de la Leche por gramo (IMCU/g). Se establecerán preparaciones adicionales de estándares de referencia con respecto a la referencia anterior. Principio de la IMCU: Determinación del tiempo necesario para la floculación visible del sustrato de leche estándar cuajada con cloruro de calcio al 0,05%, pH 6,5. La IMCU/ml de una muestra se determina mediante la comparación del tiempo de coagulación con el de un estándar que tiene una actividad de coagulación de la leche conocida y que tiene la misma composición enzimática de la muestra.

Aquí, el término "maduración", o alternativamente, maduración, se define como la maduración del producto lácteo fermentado caracterizada por una proteólisis continua durante la vida útil del producto fermentado.

#### **Breve descripción del listado de secuencias**

SEQ ID NO: 1 expone la secuencia de ácido nucleico de la secuencia del gen proquimosina B de tipo salvaje de *Bos taurus* con adaptación de codones para la expresión en *K. lactis* y con enlazadores para permitir la clonación en pKLAC1.

SEQ ID NO: 2 expone la secuencia de aminoácidos de la secuencia de quimosina B madura de *Bos taurus*.

SEQ ID NO: 3 expone la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de proquimosina de *Camelus dromedarius* con adaptación de codones para la expresión en *K. lactis*.

SEQ ID NO: 4 expone la secuencia de aminoácidos de la secuencia de quimosina madura de *Camelus dromedarius*.

SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la caseína alfa-s1 de *Bos taurus*.

#### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de yogur, que comprende fermentar leche con bacterias de ácido láctico, y poner en contacto la leche con un polipéptido que tiene actividad de quimosina que tiene una relación C/P mayor que la relación C/P de la quimosina bovina, y en el que el polipéptido que tiene actividad de quimosina tiene una secuencia de aminoácidos que;

a. cuando se alinea con la quimosina que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido correspondiente al aminoácido 51 y/o 221, y en el que el polipéptido que tiene actividad de quimosina comparte al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia con un polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 2; y/o

b. cuando se alinea con SEQ ID NO: 4 comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido ubicado en el bolsillo de unión S2, y en el que un resto de aminoácido ubicado en el bolsillo de unión S2 corresponde a la posición 219, 223, 288, 290, 295 o 297 cuando se alinea con SEQ ID NO: 4, y en el que el polipéptido que tiene actividad de quimosina comparte al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia con un polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 4.

## ES 3 023 033 T3

Los inventores de la presente invención descubrieron que el uso de un polipéptido que tiene actividad de quimosina con una relación C/P mayor que la relación C/P de la quimosina bovina en la producción de productos lácteos fermentados da como resultado productos lácteos fermentados, tal como yogur, que tienen una maduración reducida.

5 En una realización preferida, el presente polipéptido que tiene actividad de quimosina es capaz de hidrolizar la alfa s1-caseína bovina en la posición F23F24 para formar  $\alpha$ s1-I CN (f24-199) más rápidamente que la quimosina de camello.

10 En otra realización preferida, la relación C/P es 2, por ejemplo 5, por ejemplo 10, tal como 10 veces mayor que la relación C/P de la quimosina bovina. Un polipéptido que tiene actividad de quimosina de la invención puede tener típicamente una alta actividad de coagulación de la leche específica (C) y una baja actividad proteolítica general, es decir, no específica, (P) con respecto a las proteínas de la leche. En consecuencia, la relación C/P debe ser preferiblemente lo más alta posible, ya que un valor de P relativamente alto durante el procedimiento de fabricación del yogur y durante la vida útil del yogur conducirá a la formación de péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres, que a su vez pueden conferir al yogur un sabor amargo indeseable. La relación C/P puede expresarse como  
15 una relación C/P relativa, por ejemplo con respecto a una quimosina tal como la quimosina bovina de SEQ ID NO: 2.

El presente polipéptido que tiene actividad de quimosina tiene una secuencia de aminoácidos que;

20 a. cuando se alinea con la quimosina que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido correspondiente al aminoácido 51 y/o 221; y/o

b. cuando se alinea con SEQ ID NO: 4 comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido ubicado en el bolsillo de unión S2, por ejemplo en una posición correspondiente al aminoácido 223.

25 Una proteína de este tipo normalmente será capaz de hidrolizar la alfa s1-caseína bovina en la posición F23F24 para formar  $\alpha$ s1-I CN (f24-199) más rápidamente que la quimosina de camello; y tendrá una relación C/P mayor que la relación C/P de la quimosina bovina.

30 Por lo tanto, en una posición correspondiente al aminoácido 51 y/o 221 como se define con referencia a SEQ ID NO: 2, puede estar presente un aminoácido diferente al presente en el aminoácido 51 y/o 221 en SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, en una posición correspondiente a un aminoácido en el bolsillo de unión S2 como se define con referencia a SEQ ID NO: 4, puede estar presente un aminoácido diferente al que está presente en esa posición dentro del bolsillo de unión S2 en SEQ ID NO: 4.

35 Un polipéptido que tiene actividad de quimosina en la invención es un polipéptido que tiene al menos alrededor de 90% de homología con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, por ejemplo al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 98% o al menos alrededor de 99% de homología con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

40 El aumento del desarrollo temprano de la leche fermentada está relacionado con la afinidad de una región específica de la alfa s1-caseína por los diferentes bolsillos de unión en el surco de unión del péptido del coagulante. En consecuencia, se describen aquí los aminoácidos en el bolsillo de unión S2 (Schechter y Berger (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 157-162) relevantes para esta afinidad, y esta afinidad se puede modular alterando los aminoácidos en este bolsillo para aumentar la tasa de hidrólisis de la alfa s1-caseína bovina en la posición F23F24 para formar  $\alpha$ s1-I CN (f24-199).  
45

Por ejemplo, la introducción de una cadena lateral de aminoácidos diferente en la posición V223, como se define con referencia a la secuencia de la quimosina bovina, conduce a un primer corte reducido en la alfa s1-caseína. Sin embargo, cualquier quimosina con un cambio de aminoácido en la posición correspondiente y otras posiciones vecinas en el bolsillo de unión S2 puede conducir a una afinidad alterada de la alfa s1-caseína por la quimosina, y a un cambio en la cinética del primer corte en la alfa s1-caseína.  
50

Los cambios de aminoácidos en las posiciones que son parte del bolsillo de unión de S2 son, muy notablemente, T219, F223, Q288, D290, L295 e I297 en la quimosina de camello o aminoácidos en posiciones equivalentes en otras quimosinas de mamíferos (por ejemplo, T219, V223, Q288, E290, K295 e I297 en la quimosina bovina), también pueden modular la afinidad de la alfa s1-caseína por la quimosina, y por lo tanto alterar la cinética del primer corte en la alfa s1-caseína.  
55

Por consiguiente, los polipéptidos preferidos que tienen actividad de quimosina de la invención pueden comprender la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 4 que porta una de las siguientes mutaciones:  
60

F223C, F223D, F223E, F223L, F223M, F223N, F223Q, F223V, F223Y, F223I Q288G, Q288H, Q288N, Q288R, Q288S

D290A, D290G, D290L, D290M, D290Q, D290S, D290T

65 L295F, L295I, L295K, L295M, L295R, L295T, L295Y, L295W

I297T, I297V

Se pueden utilizar combinaciones de dichas mutaciones en diferentes posiciones.

5 Describimos que los cambios en los aminoácidos A51 y K221 dentro de la secuencia de aminoácidos de la quimosina bovina son importantes para un aumento de C/P. La introducción de estos cambios en un coagulante de elección conducirá a un valor de C/P más alto, y por lo tanto a una mayor estabilidad de almacenamiento del yogur elaborado.

10 Otras posiciones que pueden sustituirse (según se define con referencia a la secuencia bovina de SEQ ID NO: 2) son 48, 50, 61, 62, 109, 117, 126, 135, 144, 160, 161, 201, 202, 203, 221, 240, 242, 244, 254, 267, 280, 292 o 295. Una o más de estas posiciones pueden modificarse de modo que sean diferentes del aminoácido en esa posición, como se define con referencia a la secuencia bovina de SEQ ID NO: 2.

15 Los polipéptidos de quimosina preferidos de la invención pueden comprender la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 que porta una de las siguientes mutaciones o combinaciones de mutaciones:

A51V;

20 K221L;

K221M;

K221V;

25 V223Q;

A51V y K221V;

A51V y K221M;

30 A51V, K221V, S135T, A126G, S273Y y Q240E;

A51I y K221T; o

35 A51V, K221V, N50D, N144H, N160D, S201D, Q242E, M267E y Q280E

40 Según la invención, se combinan dos propiedades que permiten, por ejemplo, la construcción de una variante de quimosina de ternera que tenga un valor de C/P útil más elevado, o la construcción de una variante de quimosina de camello que sea capaz de hidrolizar más rápidamente la alfa s1-caseína bovina en la posición F23F24 para formar  $\alpha$ s1-I CN.

Preferiblemente, los polipéptidos preferidos que tienen actividad de quimosina de la invención derivan de un mamífero, más preferiblemente de una vaca o de un camello.

45 La fermentación de la leche con bacterias de ácido láctico, y el contacto de la leche con un polipéptido que tenga actividad de quimosina con una relación C/P mayor que la relación C/P de la quimosina bovina, pueden realizarse al mismo tiempo. Alternativamente, la leche se pone primero en contacto con el polipéptido que tiene actividad de quimosina, y después se fermenta con bacterias de ácido láctico. A la inversa, la leche se fermenta primero con bacterias de ácido láctico, y después se pone en contacto con el polipéptido que tiene actividad de quimosina.

50 Alternativamente, una parte de la leche se pone en contacto con un polipéptido que tiene actividad de quimosina que tiene una relación C/P mayor que la relación C/P de la quimosina bovina mientras que otra parte de la leche se fermenta con bacterias de ácido láctico, en el que después ambas partes se pueden combinar para proporcionar el producto lácteo fermentado, es decir, el yogur.

55 Preferiblemente, las presentes bacterias de ácido láctico se seleccionan del grupo que consiste en *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., tal como *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* or *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium breve*. Más preferiblemente, las presentes bacterias de ácido láctico comprenden *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*. Esta combinación de cepas es ventajosa, por ejemplo, en un procedimiento para la producción de un producto lácteo fermentado tal como yogur, o en las propiedades finales del producto lácteo fermentado tal como yogur. Estas cepas pueden, por ejemplo, mejorar aún más la velocidad de acidificación o conferir ciertos sabores.

60

*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, cuando está presente en el método de la invención, puede comprender entre 0,1% y 10% de las UFC totales de las presentes bacterias de ácido láctico, preferiblemente entre 0,2% y 5%, más preferiblemente entre 0,5% y 2%, más preferiblemente entre 0,8 y 1,2%, lo más preferible 1%.

5 En una realización, el procedimiento de la invención proporciona un yogur en el que se han mejorado uno o más atributos de textura seleccionados del grupo que consiste en la reología, el aspecto, la estructura, la sensación en boca, y el regusto del yogur. Lo más preferible, la invención proporciona un procedimiento en el que se han mejorado los atributos reológicos del yogur, más preferiblemente el Brookfield y/o el esfuerzo cortante. En otra realización preferida, la invención proporciona un procedimiento en el que se ha mejorado el aspecto del yogur, más preferiblemente el brillo y/o la blancura. En aún otra realización preferida, la invención proporciona un procedimiento en el que se ha mejorado la estructura del yogur, más preferiblemente los aspectos visuales tales como la consistencia viscosa y/o el espesor visual y/o la suavidad. En otra realización preferida, la invención proporciona un procedimiento en el que se ha mejorado la sensación en boca del yogur, más preferiblemente el espesor y/o la cremosidad y/o la viscosidad y/o la fusión y/o la astringencia. En otra realización preferida, la invención proporciona un procedimiento en el que se ha mejorado el regusto del yogur, más preferiblemente la astringencia y/o la pungencia y/o el recubrimiento de grasa.

De manera altamente preferible, la invención proporciona un procedimiento de la invención en el que se han mejorado dos o más, preferiblemente tres o más, más preferiblemente cuatro o más atributos de textura seleccionados del grupo que consiste en Brookfield y el esfuerzo cortante y el brillo y la blancura y la viscosidad y el espesor visual y la suavidad y el espesor y la cremosidad y la astringencia y la pungencia y el recubrimiento de grasa.

El producto lácteo fermentado más preferido que se produce mediante el procedimiento de la invención es yogur como se define aquí anteriormente.

25 La leche que puede utilizarse en el procedimiento de la invención puede ser cualquier leche adecuada para la producción de un producto lácteo fermentado, tal como yogur. La leche se ha definido anteriormente, y puede abarcar leches de mamíferos y fuentes vegetales o mezclas de ellas. Preferentemente, la leche procede de una fuente de mamíferos. Las fuentes de leche de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, la vaca, la oveja, la cabra, el búfalo, el camello, la llama, la yegua y el ciervo. En una realización, la leche proviene de un mamífero seleccionado del grupo que consiste en vaca, oveja, cabra, búfalo, camello, llama, yegua y ciervo, y combinaciones de los mismos. Las fuentes vegetales de leche incluyen, pero no se limitan a leche extraída de soja, guisante, cacahuete, cebada, arroz, avena, quinoa, almendra, anacardo, coco, avellana, cáñamo, semilla de sésamo y semilla de girasol. Además, el término "leche" se refiere no solo a la leche entera, sino también a la leche desnatada o cualquier componente líquido derivado de la misma. El contenido de grasa en la leche, y en el producto lácteo fermentado posterior, es decir, el yogur, puede ser como se conoce aquí y como se hace referencia en los antecedentes de la invención.

En una realización preferida, el presente procedimiento comprende una etapa de inactivar el polipéptido que tiene actividad de quimosina que tiene una relación C/P mayor que la relación C/P de la quimosina bovina. Por ejemplo, inactivar mediante tratamiento térmico.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un yogur, preferiblemente un yogur de maduración reducida o de proteólisis reducida, que comprende bacterias de ácido láctica, y que comprende un polipéptido que tiene actividad de quimosina que tiene una relación C/P mayor que la relación C/P de la quimosina bovina como se definió anteriormente. Preferiblemente, el presente yogur tiene una maduración reducida en comparación con un yogur similar que comprende quimosina bovina. Más preferiblemente, el presente yogur tiene una mayor estabilidad de textura en comparación con un yogur similar que comprende quimosina bovina.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit de piezas que comprende bacterias lácticas y que comprende un polipéptido con actividad de quimosina que tiene una relación C/P mayor que la relación C/P de la quimosina bovina como se definió anteriormente.

Según aún otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del presente polipéptido que tiene actividad de quimosina que tiene una relación C/P mayor que la relación C/P de la quimosina bovina como se definió antes de producir yogur, preferiblemente para reducir la maduración en el yogur o para aumentar la vida útil del yogur tal como para aumentar la estabilidad de la textura del yogur. Más preferiblemente, la presente invención se refiere al uso del presente polipéptido para producir un yogur que tiene una vida útil de más de 4, más de 5, o más de 6 semanas. Preferiblemente más de 4, más de 5, o más de 6 semanas cuando se almacena en condiciones estándar en un refrigerador. Alternativamente, la presente invención se refiere al uso del presente polipéptido para aumentar la vida útil del yogur en al menos 1, 2, 3, 4 o 5 semanas. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso del presente polipéptido para aumentar la vida útil del yogur en al menos 1, 2, 3, 4 o 5 semanas en comparación con el yogur preparado con quimosina de vaca, preferiblemente quimosina de vaca de acuerdo con la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID No 2.

65 **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 1. Cepas bacterianas.

Se utilizó el cultivo iniciador Delvo®Yog para yogur batido como iniciador de inoculación directa, obtenido de DSM Food Specialties BV.

### 2. Quimosina.

Quimosina de ternera Maxiren® obtenida de DSM Food Specialties BV, y los polipéptidos de la invención obtenidos como se describe en el documento WO2013164481.

### 3. Preparación de yogur

El yogur batido se preparó utilizando un pasteurizador de flujo y un homogeneizador con enfriamiento posterior. La composición de la leche fue 3,4% de grasa y 3,5% de proteína, y se utilizó el cultivo iniciador. Los cuajos se agregaron junto con el cultivo iniciador con una dosis de 0,0002% en base a una formulación de 180 IMCU/ml. La temperatura de fermentación fue 42°C. La acidificación se controló usando Cinac a la misma temperatura. Una vez alcanzado un pH de 4,6, los yogures se homogeneizaron y envasaron en recipientes adecuados. Después, los recipientes se almacenaron a 4°C.

### 4. Análisis sensorial de yogures

El panel sensorial estuvo formado por 8 miembros que contaban con una formación específica en evaluación sensorial de yogures. Los productos se presentaron en vasos isotérmicos de plástico blanco con código de tres dígitos, almacenados a 4°C. Las muestras estaban aproximadamente a 10°C cuando se analizaron. A los panelistas se les proporcionó agua mineral y galletas enteras para limpiar el paladar entre muestras. Las sesiones se llevaron a cabo en una habitación con temperatura controlada a 20°C bajo iluminación blanca en cabinas individuales.

La adquisición de datos fue asistida por el software de análisis sensorial FIZZ. Se utilizan escalas tanto monádicas como hedónicas para evaluar los atributos de sabor y textura de los productos. Los atributos se evaluaron en el siguiente orden: textura visual con cuchara, textura en boca, sabor y aroma.

### 5. Análisis sensorial de yogures QDA

El análisis sensorial descriptivo se realizó utilizando el método de análisis descriptivo cuantitativo (Stone, H. y Sidel, JL "Sensory Evaluation Practises" 3ª edición, 2004). En primer lugar, los panelistas desarrollaron una lista de atributos que incluía definiciones mediante la evaluación de una amplia variedad de referencias y una amplia gama de yogures. En segundo lugar, se organizaron sesiones de capacitación para que los panelistas aprendieran a diferenciar y replicar consistentemente las muestras de yogur. Durante las medidas de QDA reales, las intensidades de los atributos seleccionados se obtuvieron por producto mediante el sistema de adquisición de datos sensoriales FIZZ (Biosystems; Francia), utilizando escalas de línea no estructuradas que oscilan de 0 - 100. Los productos se ofrecieron de forma semimonádica, y se evaluaron dos veces por los panelistas (n=14) mediante un diseño de Bloques Completos Balanceados, para evitar efectos de secuencia. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante análisis de varianza con la diferencia menos significativa de Fisher (LSD) como prueba post hoc (SenPac), y se modeló utilizando el análisis de componentes principales (PCA) (SenPac).

### 6. Esfuerzo cortante del yogur

Las muestras se midieron utilizando un reómetro Physica MCR501 equipado con un sistema de medida de cilindros concéntricos (CC-27). Se utilizó una trampa de disolvente para evitar al máximo la evaporación del agua. Las muestras se agitaron ligeramente con una cuchara antes de cargarlas en el reómetro. Antes de la medida, las muestras se dejaron reposar y calentar/enfriar hasta la temperatura de medida (25°C) durante 5 minutos. Se aplicó un protocolo experimental estándar que consistía en las siguientes dos secuencias de medida:

1. Un barrido de deformación para determinar la resistencia inicial del gel (módulo de corte dinámico): se trata de una prueba oscilatoria en la que a una frecuencia angular fija ( $\omega = 10 \text{ rad/s}$ ) se aplica una amplitud creciente: en una escala logarítmica la amplitud se incrementa del 0,01 al 100%, con 5 puntos de medida por década.
2. Después del barrido de deformación, los yogures se dejan reposar durante 30 segundos en el reómetro, y posteriormente se aplica un barrido de velocidad de corte para determinar el esfuerzo cortante en la boca: Consiste en aplicar a los yogures una velocidad de corte creciente que oscila de 0,001 a 1000  $\text{s}^{-1}$  en una escala logarítmica con 3 puntos de medida por década (sin ajuste de tiempo fijo: el software del reómetro determina el tiempo de corte necesario por punto de medida).

Este experimento proporciona una curva de flujo en la que el esfuerzo medido se representa en función de la velocidad de corte aplicada. Esta curva se puede combinar entonces con datos de la bibliografía para determinar el esfuerzo cortante relevante en la boca, como se explica a continuación.

5 Mediante el análisis sensorial de diversos productos alimenticios, Shama y Sherman identificaron ventanas de esfuerzos cortantes instrumentales y velocidades de corte correspondientes a productos con índices de espesor similares pero diferente comportamiento de pseudoplástico. Estas ventanas corresponden a los regímenes reológicos aplicados en la boca durante la medida del espesor. Se demostró que la velocidad de corte reguladora dependía de la viscosidad del propio producto. (véase la Figura 1 de Shama, F. y Sherman, P. Journal of Texture Studies, 4, 111-118. (1973), "Identification of stimuli controlling the sensory evaluation of viscosity II oral methods").

15 Para los yogures del ejemplo siguiente, el esfuerzo cortante (previsto) en la boca se determina trazando las curvas de flujo medidas experimentalmente (esfuerzo cortante medido en función de la velocidad de corte aplicada del experimento de barrido de velocidad de corte descrito anteriormente) en la Figura 1 antes mencionada de Shama y Sherman. El esfuerzo cortante previsto en la boca se define como el cruce entre las curvas de flujo medidas y el límite superior de las ventanas de "velocidad de corte - esfuerzo cortante" de la Figura 1 de Shama y Sherman. En la figura 2, los autores dan ejemplos de diversos alimentos. El esfuerzo cortante así obtenido dio una buena correlación con la percepción sensorial del espesor en la boca.

20 **7. Brookfield**

Las medidas de viscosidad se realizaron utilizando un viscosímetro Brookfield RVDVII+, que permite medir la viscosidad en un producto inalterado (directamente en el recipiente). El viscosímetro Brookfield determina la viscosidad midiendo la fuerza necesaria para girar el husillo dentro del producto a una velocidad determinada. Se utilizó el sistema Helipath con husillo T-C, ya que está diseñado para material tixotrópico que no fluye (gel, crema). Baja o sube lentamente un husillo giratorio en forma de T hacia la muestra, de modo que no siempre se corta la misma región de la muestra (trayectoria helicoidal). De esta forma, el viscosímetro mide constantemente la viscosidad del material reciente, y por tanto se considera el más adecuado para medir la viscosidad del yogur batido. Se utilizó una velocidad de 30 rpm para 31 puntos de medida, con un intervalo de 3 segundos. Se reportan los promedios de los valores entre 60 y 90 segundos.

**EJEMPLOS**

35 **Ejemplo 1**

El yogur se preparó como en los materiales y métodos con un polipéptido de la invención, y los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

	<b>Maxiren®</b>	<b>Polipéptido de la invención</b>
<b>Esfuerzo cortante previsto en la boca (Pa)</b>	18,95	19,08
<b>Calidad del yogur después de 4 semanas</b>	Buena	Buena
<b>Calidad del yogur después de 5 semanas</b>	Demasiado maduro	Buena
<b>Calidad del yogur después de 6 semanas</b>	Demasiado maduro	Buena

40 Los resultados anteriores muestran que el esfuerzo cortante previsto es más o menos comparable, mientras que el yogur producido con el presente polipéptido proporciona una maduración reducida del yogur.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para la producción de yogur, que comprende fermentar leche con bacterias de ácido láctico, y poner en contacto la leche con un polipéptido que tiene actividad de quimosina que tiene una actividad de coagulación dividida entre la actividad proteolítica (relación C/P) mayor que la relación C/P de la quimosina bovina, y en el que el polipéptido que tiene actividad de quimosina tiene una secuencia de aminoácidos que;
- 10 a. cuando se alinea con la quimosina que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido correspondiente al aminoácido 51 y/o 221, y en el que el polipéptido que tiene actividad de quimosina comparte al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia con un polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 2; y/o
- 15 b. cuando se alinea con SEQ ID NO: 4 comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido ubicado en el bolsillo de unión S2, y en el que un resto de aminoácido ubicado en el bolsillo de unión S2 corresponde a la posición 219, 223, 288, 290, 295 o 297 cuando se alinea con SEQ ID NO: 4, y en el que el polipéptido que tiene actividad de quimosina comparte al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia con un polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 4.
- 20 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la relación C/P es 2, por ejemplo 5, por ejemplo 10, tal como 10 veces mayor que la relación C/P de la quimosina bovina.
- 25 3. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el polipéptido que tiene actividad de quimosina comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 que porta una de las siguientes mutaciones o combinaciones de mutaciones:
- 30 A51V;  
K221L;  
K221M;  
K221V;
- 35 A51V y K221V;  
A51V y K221M;  
A51V, K221V, S135T, A126G, S273Y y Q240E;
- 40 A51I y K221T; o  
A51V, K221V, N50D, N144H, N160D, S201D, Q242E, M267E y Q280E.
- 45 4. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 62, en el que el polipéptido que tiene actividad de quimosina comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 4 que porta una de las siguientes mutaciones: F223C, F223D, F223E, F223L, F223M, F223N, F223Q, F223V, F223Y, F223I, Q288G, Q288H, Q288N, Q288R, Q288S, D290A, D290G, D290L, D290M, D290Q, D290S, D290T, L295F, L295I, L295K, L295M, L295R, L295T, L295Y, L295W, I297T o I297V.
- 50 5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido que tiene actividad de quimosina deriva de un mamífero.
- 55 6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5, en el que el polipéptido que tiene actividad de quimosina deriva de una vaca.
- 60 7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, 4 o 5, en el que el polipéptido que tiene actividad de quimosina deriva de un camello.
8. Yogur de maduración reducida, que comprende bacterias de ácido láctico y un polipéptido que tiene actividad de quimosina como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 65 9. Un kit de piezas que comprende bacterias de ácido láctico y un polipéptido que tiene actividad de quimosina como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y en el que dichas bacterias de ácido láctico comprenden *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*.

10. Uso de un polipéptido que tiene actividad de quimosina como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la producción de yogur.

5 11. Uso de un polipéptido que tiene actividad de quimosina como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para reducir la maduración en yogur o para aumentar la vida útil del yogur, en comparación con un yogur que comprende quimosina bovina.