

436419

Int. Cl.: A23L

16 MAR. 1977

CONCEDIDA

PATENTE DE INVENCION

Que por veinte años se solicita a favor de BAXTER LABORATO-
RIES, INC, de nacionalidad Estadounidense, con domicilio en
Morton Grove, Illinois 60053 (Estados Unidos), y que ha de
recaer sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA AROMATIZACION DE UN -
5 PRODUCTO ALIMENTICIO QUE CONTENGA GRASAS TRIGLICERIDAS LIPO
LIZADAS".

Memoria Descriptiva

10 El registro de la Patente de Invención que se so
licita tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva
en todo el territorio nacional y sus posesiones de un proce
dimiento para la aromatización de un producto alimenticio -
que contenga grasas triglicéridas lipolizadas, conforme se
describe a continuación.

**POOR
QUALITY**

436410

Esta invención se relaciona con un sistema aromatizador enzimáticamente producido mediante ciertas especies del género Mucor y más particularmente con la producción de una perfeccionada grasa lipolizada mediante un preparado de enzima obtenido del Mucor miehei.

Los aromas enzimáticamente producidos son comunes a muchos tipos de alimentos, especialmente los producidos mediante fermentación. Por ejemplo, en la fabricación de productos alimenticios, tales como artículos de bollería, blanqueados de café, chocolate con leche, margarina y similares, es deseable dotar al producto terminado de un sabor a leche o mantequilla. En ciertos tipos de quesos y productos de ellos, especialmente los denominados quesos blandos y quesos fuertes, tales como las variedades de tipo italiano, los distintos matices aromáticos dependen de varios sistemas enzimáticos empleados durante la producción de los quesos.

En el caso de alimentos que contienen grasas, la principal acción enzimática es una lipólisis o disociación hidrolítica de triglicéridos catalizada con enzimas. Aunque pueden producirse otras formaciones de aromas enzimáticos simultáneamente con la lipólisis, la presente invención se relaciona principalmente con este último tipo de actividad.

Naturalmente, durante muchos años las industrias alimentarias se han visto plagadas de lipólisis espontáneas o incontrolables, de las que pueden resultar unos indeseables aromas o una desagradable rancidez. Sin embargo, en los años recientes, el desarrollo de una lipólisis controlada ha tenido por resultado muchos y perfeccionados productos alimenticios. Así, es práctica común en las industrias lácteas el tratamiento de grasas de la leche con enzimas lipolíticas para

producir los aromas deseados. La enzima lipolítica actúa sobre los triglicéridos produciendo ácidos grasos libres que, a su vez, pueden convertirse en otros compuestos, tales como cetonas, en algunos casos. La cantidad y tipo de ácidos grasos producidos dependen de la cantidad y tipo de grasa en el producto alimenticio, de la cantidad y tipo de producto enzimático lipolítico y del tiempo y temperatura de tratamiento con la enzima lipolítica. Puede verse información adicional sobre la lipólisis controlada convencional en el J. Amer. Oil Chem. Soc. 49, 559-62 (1971) y en las referencias citadas en el mismo.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un perfeccionado sistema aromatizante para grasas triglicéridas y alimentos que contienen grasas y, en particular, una grasa láctea lipolizada perfeccionada mediante una preparación enzimática a partir del Mucor Stiebeli.

Se conocen varias enzimas lipolíticas, por ejemplo la lipasa pancreática, la esterasa pregastrica, la lipasa láctea y la lipasa fungal. En particular, las lipasas fungales se obtienen, por ejemplo, del Aspergillus, tal como se describe en la patente estadounidense nº 2.480.090, del Rhizopus, según se describe en la patente estadounidense nº 3.262.863, y del Mucor, como puede verse en la patente de igual nacionalidad nº 3.616.233. El efecto de estas lipasas fungales respecto al desarrollo de rancidez en las grasas, con relación al Aspergillus, se describe en J. Gen. Appl. Microbiol. 10, 13- 22 (1964); con relación al Rhizopus se describe en Aggr. Biol. Chem. 33, 729-38 (1969); y con relación al Mucor se expone en Appl. Microbiol. 16, 617-19 (1968) y 17, 606-10 (1969) Típicos esterasas y lipasas comercialmente obtenibles y am-

pleadas hasta ahora, son las esterases progástricas, tales como las obtenibles en el Dairyland Food Laboratory, bajo los nombres comerciales de "Italase" y "Capalase"; la lipasa pancreática obtenible en los Farnco Laboratories bajo el nombre comercial de "Farnlipase PL"; y la lipasa fungal obtenible en Rohm and Haas bajo el nombre comercial de "Lipase B".

Debido a la escasez de enzimas lipolíticas de origen animal, la obtención de sistemas enzimáticos lipolíticos de una fuente microbiana ofrece la potencial ventaja de una mayor disponibilidad y además la posibilidad de un producto de calidad más uniforme, mediante fermentación controlada del organismo. Sin embargo, no todas las enzimas lipolíticas microbianas proporcionan el deseado sistema aromatizante.

Se ha descubierto ahora la posibilidad de obtener un sistema aromatizante de grasas triglicépidas enzimáticamente producido y de excelente calidad, a partir del organismo microbiano Mucor miehei. Este sistema aromatizante enzimático se define aquí en términos de la relación entre la actividad de esterasa (EA) y la actividad de lipasa (LA) ó EA/LA.

Tal como aquí se define, la actividad de esterasa es la actividad de la enzima sobre las grasas solubles en agua, concretamente las grasas que tienen longitudes de cadena de carbono de 4 a 10 aproximadamente. Inversamente, la actividad de lipasa es la actividad de la enzima sobre las grasas insolubles en agua, concretamente las grasas que tienen longitudes de cadena de carbono de 12 aproximadamente y mayores, particularmente de 12 a 22.

De acuerdo con la presente invención, se ha descu

bierto inesperadamente que el sistema enzimático lipolítico producido por ciertas especies del género Mucor, y particularmente el Mucor michei, frente al de otros hongos, tales como Aspergillus y Rhizopus, posee la deseable propiedad de expresar una mayor actividad de esterasa que de lipasa, de manera similar a la de esterases pregástricas, comercialmente empleadas, de la ternera, del cabrito y del cordero. Es decir, muestra una relación EA/LA superior a 1. A modo de comparación, los sistemas lipolíticos producidos por el Aspergillus y el Rhizopus han resultado mostrar relaciones EA/LA inferiores a 1, siendo por consiguiente inadecuados para los fines de esta invención. Preferiblemente, la relación EA/LA es superior a 2, siendo eminentemente adecuadas unas relaciones de 2 a 10 aproximadamente, de acuerdo con esta invención.

La actividad de esterasa se mide preferiblemente mediante un ensayo sobre tributirina, en tanto que la actividad de lipasa se mide preferiblemente mediante un ensayo sobre un sustrato de aceite de oliva. Estos ensayos pueden ligarse a cabo como sigue.

Método de esterasa

Este método se usa para determinar la esterasa que hidroliza a la tributirina. Se incuba esterasa con una solución de tributirina a un pH de 6 y a 37°C. El ácido que se libera en la mezcla de reacción durante 10 minutos es titulado a un pH de 8,7. Los resultados reflejan una relación lineal entre el ritmo de reacción y la concentración de enzima dentro del nivel recomendado.

Soluciones

1.- Solución sustrato.

Añadir 13 gramos de goma arábica U.S.P. a 114 ml de solución de acetato sódico 0,05 M (6,8 g $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a 1 litro), agregar luego unos 50 mg de timol y agitar durante 25 minutos para disolver. Añadir 22,7 g de tributitina (75 m mol) a la solución de goma neutralizada y emulsionar en un mezclador Waring durante 5 minutos. Ajustar la emulsión con NaOH 0,5 N a un pH de 6,0. Se necesita menos de 1ml del álcali. La solución puede usarse durante 3 días por lo menos si se guarda en un refrigerador. Antes de cada uso, agitar bien y reajustar a un pH de 6,0 si fuese necesario.

Para el "blanco de enzima" (véanse "Controles" más abajo), usar una solución de 13 g de goma arábica en 114 ml de acetato sódico 0,05 M. Ajustar la solución de goma-acetato a un pH de 6,0 lo que requiere de 3 a 4 ml de NaOH 0,1 N.

2.- NaOH 0,02 N.

3.- Neutralizador acetato, pH 5,9 a 6,2 0,05 M.

Disolver 6,8 g de acetato sódico $3\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml aproximadamente de agua, añadir 1,0 ml de ClH 1N y completar hasta 1 litro con agua destilada.

4.- Soluciones enzimáticas.

Preparar todas las soluciones y diluciones series con neutralizador acetato (nº 3 anterior). Las concentraciones requeridas se describen más abajo en "amplitud de valores".

Procedimiento

Agitar la solución sustrato y agregar con pipeta 50,0 ml a un matraz de Erlenmeyer de 125 ml. Añadir 10,0 ml

de solución enzimática, mezclar rápidamente y retirar una parte alícuota de 10,0 ml, que se añade a 40 ml de agua e inmediatamente se titula con NaOH 0,02 N a un pH de 8,7. Inmediatamente después de la retirada de la parte alícuota disponer la mezcla restante en un baño a 37° (lo que se -
 5 considera el punto de tiempo cero), donde se mantiene duran-
 te 40 minutos con agitación continua (agitador magnético su-
 mergido). Exactamente 40 minutos después del punto de tiem-
 po cero, retirar otra parte alícuota de 10,0 ml, colocarla
 10 en 40 ml de agua y titular a un pH de 8,7. La diferencia en-
 tre las dos titulaciones expresa el grado en que ha sido hi-
 drolizada la tributirina por la enzima.

Controles

15 No se necesita un blanco sustrato, pero los prepa-
 rados enzimáticos crudos pueden requerir un blanco enzimáti-
 co. Proceder como se describe anteriormente, pero usar la so-
 lución de goma arábiga ajustada sin tributirina, en lugar de
 la solución sustrato normal. Corregir el resultado principal
 20 sustrayendo el incremento de titulación observado en el con-
 trol.

Unidades

Una unidad de esterasa produce, bajo las condicio-
 25 nes del ensayo, un microequivalente de ácido por minuto.

La actividad de esterasa (EA) es el número de uni-
 dades por gramo de preparado

Cálculo

(1)

ml NaOH x N NaOH x 1000 x ml mezcla digerida
 EA-----
 30 minutos x g preparado en mezcla digerida x ml parte alícuota

donde ml NaOH es el incremento de titulación para una parte alícuota de 10 ml y N NaOH es la normalidad del NaOH usado para la titulación.

5

$$\text{Así, EA} = \frac{\text{ml NaOH} \times 0,02 \times 1000 \times 60}{40 \times \text{g preparado} \times 10} \quad (2)$$

10

$$\text{EA} = \frac{\text{ml NaOH} \times 3}{\text{g preparado en mezcla digerida}} \quad (3)$$

Amplitud de valores

15 La dilución de la muestra deberá ser tal que se obtengan incrementos de titulación comprendidos entre 0,5 y 1,5 ml. Deberán efectuarse ensayos repetidos, si fuese necesario, para obtener resultados comprendidos dentro de dicha amplitud de valores.

20 El progreso de la hidrólisis de la tributirina es lineal con el tiempo y es posible realizar el ensayo en períodos de digestión inferiores a 40 minutos. Naturalmente, luego ha de ajustarse la ecuación (3) mediante el adecuado factor de tiempo.

Método de lipasa

25 Este método se usa para determinar la lipasa que hidroliza el aceite de oliva. Se incuba lipasa con una emulsión de aceite de oliva a un pH de 6,5 y a 30°C. El ácido - que se libera en la mezcla de reacción durante 5 minutos se titula a un pH de 8,0. Los resultados reflejan una relación
30 prácticamente lineal entre el ritmo de la reacción y la con-

centración enzimática dentro de la amplitud de valores recomendada.

Sustancias químicas

- 5 1.- Aceite de oliva, U.S.P.
2.- Amerchol L-101 (esteroles libres derivados de lanolina), American Cholesterol Products, Edison, New Jersey.
3.- Barbital sódico, N.F.
- 10 4.- Goma arábiga, U.S.P.
5.- Acetato sódico - $3H_2O$, C.P.
6.- Cloruro sódico, C.P.
7.- NaOH 0,5 N.
8.- NaOH 0,02 N.
- 15 9.- ClH 0,1 N.
10.- Alcohol etílico (el nº 23A desnaturalizado es adecuado).

Equipo

- 20 1.- Mezcladora Waring.
2.- Dos agitadores magnéticos, uno de los cuales es adecuado para su inmersión en un baño de agua (Modelo MS-7, Tri-R Instruments, Jamaica Nueva York).
- 25 3.- Medidor de PH para titulaciones, equipado con un pequeño electrodo combinado (tal como el nº 4850-L15, A.H. Thomas).
4.- Microbureta, 10 ml, con divisiones de 0,02 ml (Kimble nº 17107F con aguja de jeringa tipo -
- 30 Luer 20G, 1-1/2").

Soluciones

1.- Emulsión sustrato.

Agitar magnéticamente 30-g de goma arábiga y 270 ml de agua destilada durante 30 minutos a temperatura ambiente.

5 Romper cualesquiera terrones presentes con una barra de vidrio. Enfriar a 5° C. Pesar 6 g de Amerchol en una bombona de 400 ml, añadir 72 g de aceite de oliva y 222 g de la solución de goma arábiga enfriada. Agitar con una barra de vidrio y verter en la mezcladora Waring. Mezclar durante 5 minutos. Ajustar a un

10 pH de 6,5 con NaOH 0,5 N, enfriar a 5° C y mezclar de nuevo durante 7 minutos. La temperatura puede haber aumentado a un máximo de 47° C y el pH a 6,5. La emulsión es estable durante 8 días por lo menos, si se guarda en el refrigerador. No deberá dejarse descender la temperatura por debajo de 1° C.

15 2.- Neutralizador.

a) Solución de almacenamiento. Disolver 9,7 g de acetato sódico - $3H_2O$ y 14,7 g de barbital sódico con agua destilada a 500 ml. Esta solución es de barbital 0,14 N y acetato 0,14 N, a un pH de 9,9. Guardar en el refrigerador.

20 b) Solución de trabajo. Diluir 40 ml de solución de almacenamiento, 16 ml de solución de ClNa al 8,5 % y 53ml de ClH 0,1 N con agua destilada a 200 ml, pH de 6,5. Para ajustes menores, usar ClH 0,1 N ó NaOH 0,1 N. Guardar en el refrigerador; desecharla si aparecen cristales durante su

25 almacenamiento.

3.- Soluciones enzimáticas.

Para el ensayo de preparados sólidos, preparar primeramente una solución de almacenamiento agitando magnéticamente la muestra en una adecuada cantidad de agua durante unos

30 30 minutos antes de preparar la dilución final mediante adi-

cional dilución con agua. La solución de almacenamiento es estable durante varias horas a 5° C, pero la dilución final altamente diluida deberá usarse dentro de los 5 minutos. Para el ensayo de materiales desconocidos, es necesario hallar la dilución adecuada mediante tanteo. Los preparados cuya actividad es aproximadamente conocida deberán diluirse entre 1 y 3,6 unidades de lipasa por ml. El término "unidades de lipasa" se define más adelante.

10 Procedimiento

Se mezclan la emulsión y el neutralizador en una relación de 3:1 en peso, respectivamente, para proporcionar el sustrato. Se introducen porciones de 8,0 ml en vasos graduados de 100 ml que contienen barras agitadoras magnéticas. Agitar magnéticamente la solución sustrato. Realizar cada réplica de muestra (blanco y muestra) conteniendo sustrato, como sigue:

Blanco

- 20
- 1.- Añadir 40 ml de alcohol etílico.
 - 2.- Añadir 2,0 ml de muestra de solución enzimática

Muestra

- 25
- 1.- Equilibrar el sustrato en un baño de agua a 30° C.
 - 2.- Añadir 2,0 ml de muestra de solución enzimática
 - 3.- Incubar a 30° C durante 5,0 minutos.
 - 4.- Añadir 40 ml de alcohol etílico.

30 Titular tanto el blanco como la muestra con NaOH 0,02 N a un pH de 8,0.

Cálculos

1 unidad de lipasa (LU) = cantidad de lipasa requ^{er}
rida para dar 1 micromol
de H⁺ por minuto

5 Actividad de lipasa(LA) = número de LU/gramo de -
preparado.

LA = ml NaOH x NaOH N x 10³/mg preparado enzimáti-
co añadido x 10⁻³ x minutos.

10 Cuando se usan NaOH 0,02 N y un tiempo de reacción
de 5 minutos, LA = ml NaOH x 4000/mg enzima.

U.S.P. = United States Pharmacopoeia (Farmacopos
Estadounidense)

N.F. = National Formulary (Formulario Nacional)

C.P. = Chemically Pure (Químicamente Puro).

15 Se comprenderá que la presente invención no se li-
mite a los métodos anteriormente expuestos para medir la acti-
vidad de osterasa y la actividad de lipasa, pues resultarán -
evidentes para los expertos en la materia otros métodos y mo-
dificaciones de los expuestos, tras la lectura de la presente
20 descripción.

La producción del deseado sistema aromatizante de
enzimas lipolíticas puede llevarse a cabo mediante procedi-
mientos de fermentación convencionales, seguidos de adecuados
métodos de recuperación. Así, se incuba un medio nutriente,
25 que contiene carbono, nitrógeno y cantidades ínfimas de mine-
rales, todos ellos asimilables, con un cultivo de una especie
de Mucor, especialmente Mucor michai, y se fermenta bajo con-
diciones aeróbicas sumergidas, a un pH de 3 a 8 aproximadamen-
te y a una temperatura de 20 a 50°C aproximadamente, durante
30 2 a 14 días, aproximadamente. Ejemplos de razas seleccionadas

de Mucor miehei que pueden ser fermentadas de este modo para producir el deseado sistema aromatizante enzimático, se hallan a disposición del público sin restricción alguna bajo las designaciones codificadas de NRRL A 13, 131 y A 13, 042 en los Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois. Otras razas adecuadas de Mucor miehei resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de la presente descripción.

De acuerdo con la práctica anterior, las esterases y lipasas han sido generalmente separadas o inactivadas como operación adjunta a la recuperación del deseado producto cuajado, tal como se describe en las patentes estadounidenses Nos. 3.616.233 y 3.763.811, acción alemana nº 2.232.996 y patente británica nº 1.207.892.

De acuerdo con la presente invención, el deseado sistema aromatizante enzimático se recupera mediante separación de la masa en fermentación, para proporcionar una adecuada relación EA/LA, tal como aquí se define. Esto puede llevarse a cabo mediante filtración de la masa a un bajo pH de 4 a 5 aproximadamente, extracción de la pasta del filtro a un elevado pH de 10 a 12 aproximadamente, acidificación del extracto a un pH de 7 aproximadamente y ulterior recuperación mediante filtración o concentración del extracto acidificado por evaporación o ultrafiltración y posterior secado del concentrado, tal como mediante pulverización y similares procedimientos.

Se comprenderá que para ciertos usos es deseable emplear un sistema de enzimas lipolíticas que se halle también sustancialmente libre de actividad enzimática en el cuajo. Esto puede conseguirse empleando el procedimiento de re-

cuperación antes descrito u otras técnicas de purificación evidentes para los expertos en la materia.

5 El sistema aromatizante de enzimas lipolíticas recuperado puede añadirse a la leche, grasa láctea, aceite de manteca, queso, chocolate con leche, aceite de margarina, blanqueadores de café y otros alimentos y componentes alimenticios que contengan grasas triglicéridas, e incubarse a temperaturas comprendidas entre 10 y 50° C durante 2 horas a 20 días, para producir deseables aromas similares al de la leche y la mantequilla. Puede usarse para acelerar o intensificar aromas de formación natural en dichos alimentos y componentes alimenticios, pudiendo mezclarse con conocidos agentes productores de aromas para obtener una variedad de tonalidades aromáticas. Por ejemplo, puede mezclarse con las composiciones enzimáticas de esterases pnegástricas de la patente estadounidense nº 2.531.329 (obtenibles como "Italase" en el Dairyland Food Laboratory) o bien puede usarse conjuntamente con las composiciones aromatizantes desarrolladas con el Penicillium roqueforti de la patente estadounidense número 20 3.100.153. Generalmente, la enzima lipolítica recuperada se añade en cantidades del 0,001 al 0,1 % aproximadamente en peso del sustrato que contiene grasa triglicérida y, en el caso de la leche, preferiblemente en cantidades de 1/8 a 2 onzas por 1000 libras de leche, aproximadamente.

25 Ejemplo de grasas triglicéridas que pueden tratarse con el sistema aromatizante de enzimas lipolíticas de esta invención para desarrollar deseables aromas, son las grasas animales, tales como la de leche, manteca de cerdo y sebo, y grasas vegetales, tales como el aceite de semilla de algodón, aceite de heba de soja, aceite de maíz, aceite de -

30

cacahuete, aceite de azafrán, aceite de palma, aceite de co-
co y mezclas de aceites de margarina y de manteca.

Ejemplos de quesos en los que puede usarse el sis-
tema aromatizante de enzimas lipolíticas de esta invención
5 para desarrollar aromas deseables, son los de Provolone, Ro-
mano, Feta, Pizza, Mozzarella, Cheddar, Suizo, Azul, Parmesa-
no, Colby, Goude y Edam.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la
invención, aunque se comprenderá que ésta no se limita a ta-
10 los ejemplos, que se ofrecen a modo de ilustración, sin carác-
ter limitativo.

Ejemplo 1

Se transfiere Mucor miehei, NRRL 15,042 desde un
15 medio de cultivo oblicuo de agar bajo condiciones asépticas a
un matraz de Erlenmeyer de 1 litro, que contiene 200 ml del
siguiente medio:

	Harina de haba de soja (Nutrisoy 300 C)	1,5 %
	Suero seco	3,0
20	Fécula de maíz enzimáticamente degradada	12,0
	Agua	<u>83,5</u>
	Total	100,0 %

Se incuba el matraz en un agitador rotatorio a
37° C durante 114 horas, partiendo con un pH inicial de 6
25 aproximadamente. Se recupera el deseado sistema de enzimas
lipolíticas como sigue: Se ajusta el caldo en fermentación
a un pH de 5 y luego se filtra. Se extrae el filtrado con
solución diluida de NaOH a un pH de 10 a 11 y se acidifica
el extracto a un pH de 7. Luego se filtra el extracto acidi-
30 ficado y se evapora a un concentrado dotado de un valor EA -

de 25,8 y una relación EA/LA de 2,6 en una operación de recuperación (A) y se filtra, evapora y seca por pulverización a un sólido dotado de una relación EA/LA de 3,5, en otra operación de recuperación (B).

5 Se usa enzima lipolítica derivada del Mucor miehei producida como anteriormente se indica en la operación de recuperación A, con la indicada relación EA/LA de 2,6, para desarrollar un deseable aroma de queso, como sigue.

10 Se muelen muestras de una libra de queso Current A Cheddar (queso de un tiempo de 2 a 4 semanas, con un aroma - suave) con una trituradora eléctrica Sunbeam, modelo de mesa, y se mezcla con ellas enzima lipolítica mediante mezclado adicional, hasta que se distribuye uniformemente en proporciones de 440 mg por libra de queso. Las combinaciones mezcladas de
15 enzima y queso se disponen entonces en platillos Petri de plástico estériles. Se colocan estos platillos en un recipiente anaeróbico para inhibir el desarrollo de moho y se incuban varias muestras durante 4 días a 20° C, incubándose otras muestras durante 11 días a 20° C. Después de estos períodos de in-
20 cubación, se probaron las propiedades organolépticas del queso y se observó que presentaba un limpio perfil aromático similar al producido por la Esterasa preestrica C comercialmente obtenible (Dairyland Foods Laboratory), probada de idéntica manera. Ambos quesos produjeron una deseable rancidez de
25 ligera a media. A modo de comparación, un preparado de esterasa obtenido del Aspergillus flavus resultó poseer una relación EA/LA de 0,08 y en la prueba anterior produjo un perfil de tipo butírico-caproico-cáprico indeseablemente áspero y un ligero regusto metálico.

Ejemplo 2

Se usó Mucor miehei, NRRL 13,042, para preparar un sistema de enzimas lipolíticas como en el Ejemplo 1, con la excepción de que la fermentación se llevó a cabo en un tanque de producción con un medio nutriente acuoso que contenía un
5 16% de fécula de maíz licuada con alfa-amilasa bacteriana, un 4 % de harina de haba de soja desengrasada Kaysoy y un 2 % de suero dulce secado por pulverización. Tras recogerse después de 77 horas de fermentación, se ensayó la masa para determi-
10 ner los valores de EA y LA, como sigue:

$$EA = 24,9; \quad LA = 2,8; \quad EA/LA = 8,9.$$

El producto enzimático lipolítico se recupera y usa para producir un deseable aroma de queso como en el Ejem-
15 plo 1, con buenos resultados sustancialmente equivalentes.

En los siguientes Ejemplos, la enzima lipolítica del Mucor miehei es el sistema enzimático preparado de acuerdo con el procedimiento de los Ejemplos 1 y 2 anteriores, - con valores EA comprendidos entre 10 y 100.

20

Ejemplo 3

Se añade enzima lipolítica de Mucor miehei a leche para queso antes de la edición del cultivo iniciador en una proporción de 1/8 a 2 onzas por 1000 libras de leche, para el
25 desarrollo de lipólisis controlada a fin de producir aromas - que variaban entre delicado y mantecoso por un lado y pimentoso y marcadamente picante por el otro, en la fabricación de - variedades de queso de tipo italiano, concretamente Asiago-
30 Mozzarella, Provolone y Romano, respectivamente, recibiendo la leche para las variedades de queso Romano y otras de inten

so aroma los mayores niveles de tratamiento con enzimas lipolíticas.

Ejemplo 4

5 Se añade enzima lipolítica de Mucor miehei a leche para queso antes de la adición del cultivo iniciador en una proporción de 1/8 a 1/4 de onza por 1000 libras de leche, para el desarrollo de lipólisis controlada a fin de producir mayores cantidades de ácidos grasos de cadenas cortas respecto a
10 ácidos grasos de cadenas largas a metabolizar con los productos finales de esporas de Penicillium roqueforti para producir un aroma deseable y el nivel conveniente de cetonas metilicas y CO₂ en el queso azul y en el sabor del mismo.

Ejemplo 5

15 Se añade enzima lipolítica de Mucor miehei a la forma macerada de quesos Cheddar, Colby, Romano, Suizo, Mozzarella, Azul, Gouda, Edam, Provolone y Parmesano, en un porcentaje del 0,01 al 0,1 % del peso del queso molido o sólido del mismo, con y sin otras enzimas, para producir quesos enzimáticamente modificados, de elevado aroma, a utilizar en la sustitución de sólidos de queso en la fabricación de queso pasteurizado, alimentos aderezados con queso y polvo, unturas y tapas del mismo material, así como sales de la misma sustancia
20 y condimentos para ensaladas. Para obtener una estabilidad en el aroma, se inactiva la enzima lipolítica en el queso modificado con ella mediante tratamiento del producto a 70° C durante 15 minutos y a un pH de 5,0.

Ejemplo 6

Se convierte en aceite de manteca una mantequilla preparada a partir de crema batida y lavada con agua, calentando a 39° C y centrifugando para separar el suero residual de la manteca. El aceite de manteca de este tipo general se trata con enzima lipolítica de Mucor miehei en un porcentaje del 0,005 al 0,05 % del peso de la grasa de dicho aceite de manteca esterilizado. El aceite tratado con enzima lipolítica se incuba a una temperatura de 22 a 37° C durante 1 a 3 días para un adecuado desarrollo del aroma antes de la inactivación a 70° C durante 15 minutos a un pH de 5,0. El aceite de manteca tratado con enzima lipolítica se usa solo y con otros ácidos aromatizantes, concretamente acético y butírico y/u otras sustancias químicas aromatizantes, concretamente dig cetilo, como agente aromatizante y texturizador en aroma de mantequilla, margarina, productos lácteos de imitación, dulces de un tipo de chocolate con leche y salsas y unturas de mantequilla.

Ejemplo 7

Se añade enzima lipolítica de Mucor miehei a 200 veces su peso de crema esterilizada de un contenido del 35 % en grasa de manteca. Después de ajustarse la crema a un pH ácido con ácido láctico o cultivo láctico, se agita la mezcla a 37° C durante 4 horas. Se somete la resultante mezcla a un método convencional de preparación de mantequilla para producir ésta con un excelente y perfeccionado aroma.

Ejemplo 8

Se añade enzima lipolítica de Mucor miehei en un

porcentaje del 0,001 al 0,01 con y sin otros sistemas enzimáticos a una suspensión reconstituida del 9 al 14 % de sólidos lácticos de grasa integral antes de una incubación de 22 a 33° C durante 4 a 8 horas. La lipólisis controlada se inactiva de manera similar a la descrita en el Ejemplo 6. El polvo de leche integral modificado con enzima lipolítica se usa para comunicar un aroma de tipo lácteo a productos alimenticios tales como dulces de chocolate con leche, blanqueadores de café, imitaciones de queso y productos alimenticios lácteos.

Ejemplo 9

Se usan sólidos de queso modificados con enzimas lipolíticas de Mucor miehei, preparados como en el Ejemplo 5, en formulaciones de alimentos para animales domésticos, concretamente para perros, en un porcentaje del 1,0 al 10,0 % del total de sólidos de la formulación, para comunicar un aroma apetitoso y perfeccionado a tales formulaciones.

Ejemplo 10

Se usa enzima lipolítica de Mucor miehei para tratar queso "salvego" mediante un procedimiento como el descrito en el Ejemplo 5, seguido de tratamiento térmico a 77° C durante 15 segundos para destruir indeseables bacterias y mohos en dicho queso e inactivar eficazmente la enzima lipolítica en el producto. El citado queso tratado con enzima lipolítica es aceptable para formulaciones alimenticias destinadas a animales domésticos.

Ejemplo 11

Se use polvo lácteo integral tratado (modificado) con enzima lipolítica de Mucor miehei, preparado como en el Ejemplo 8, en un porcentaje del 5,0 al 15,0 %, en la fabricación de un perfeccionado blanqueador de café de aroma más -
5 completo.

Ejemplo 12

Se usa polvo de leche integral tratado (modificado) con enzima lipolítica de Mucor miehei preparado como en el -
10 Ejemplo 8, en un porcentaje del 2,0 al 10,0 %, en la fabricación de una perfeccionada crema agria de imitación, más rica y completa.

Ejemplo 13

Se prepara un queso azul a partir de leche cruda, se homogeneiza a 90° F y se blanquea con peróxido de benzofilo. Se calienta la leche a 86° F y se inocula con un 1 % de un iniciador de Streptococcus lactis. Tras un breve período de retención, se inocula la leche con un producto cuajada microbiológicamente a partir de un desarrollo de la raza de Mucor miehei designada NRRL A 13,042, en una proporción de 3 onzas por 1000 libras de leche y 1/8 a 1/4 de onza de enzima lipolítica de Mucor miehei por 1000 libras de leche. Se agita la mezcla hasta obtenerse una cuajada de firmeza satisfactoria. Luego se inocula esta cuajada con esporas de Penicillium roqueforti, se separa del suero y se transfiere a vasos de prensado. Se cala la cuajada introducida en tales vasos mediante inmersión en salmuera durante 3 días y se empaqueta en una bolsa de plástico ("Cryovac") sometida a vacío.
15
20
25
30

Se practican pequeños orificios por todo el queso para la admisión de aire y favorecer el desarrollo de moho. Luego se madura el queso colocándolo en una sala de curado durante dos meses a 50° F y a una humedad del 90 % para producir un queso azul de excelente calidad, con un aroma perfeccionado respecto al obtenido sin la adición de la enzima lipolítica.

Ejemplo 14

Se prepara un queso de tipo Romano a partir de leche parcialmente desnatada que contiene aproximadamente un 2 % de grasa. Se calienta la leche a 88-90° F y se añade un 1 % de proporciones iguales de cultivos de Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus. Se añade cuajo en cantidad suficiente para coagular la leche en 15 a 17 minutos (aproximadamente 3 onzas por 1000 libras). Se añade enzima lipolítica de Mucor miehei a razón de 1 a 2 onzas por 1000 libras de leche. Se corta la resultante cuajada con cuchillas de 3/8 de pulgada. Después de cortarse, se cuece la cuajada a 116-118° F durante 30 minutos y luego se separa del suero. Se coloca la cuajada en vasijas de prensado, se prensa, se seca en anaquales durante 2 a 4 días y luego se sala hasta un contenido salino del 4 al 5 %. Luego se cura el queso a 50-60° F y a una humedad relativa del 70 %, para producir un queso Romano de excelente calidad y de perfeccionado aroma respecto al obtenido sin la adición de la enzima lipolítica.

Ejemplo 15

Se incuban una manteca líquida como la describe en

la patente estadounidense nº 2.815.286 y una manteca plás-
tica como la expuesta en la patente de igual nacionalidad
nº 2.132.393, cada una de ellas con un 1 a un 15 % en peso
de enzima lipolítica de Mucor miehei a 90º F durante 1 a -
5 24 horas para producir los aromas deseables, seguido de inac-
tivación de la enzima a 70º F durante 15 minutos, a un pH de
5,0.

Para los expertos en la materia resultarán eviden-
tes otros diversos ejemplos y modificaciones de los anterio-
res, con la lectura de la precedente descripción, sin apar-
tarse del espíritu y ámbito de la invención. Todos esos otros
ejemplos y modificaciones se incluyen en el ámbito de las ad-
10 juntas reivindicaciones.

Los términos en que se ha redactado esta memoria
15 deberán ser tomados siempre en sentido amplio, no limitativo.

NOTA DE REIVINDICACIONES

Se reivindica como de propia y nueva invención,
20 a favor de BAXTER LABORATORIES, INC, con domicilio en Morton
Grove, Illinois 60053 (Estados Unidos), lo especificado en -
las siguientes reivindicaciones:

1.- Procedimiento para la aromatización de un pro-
ducto alimenticio que contenga grasas triglicéridas lipoliza-
das, caracterizado en que comprende la puesta en contacto de
25 dicho producto alimenticio, portador de grasas triglicéridas,
con un sistema de enzimas lipolíticas, producto de la fermen-
tación de Mucor miehei, en una cantidad suficiente para efec-
tuar la lipólisis, teniendo dicho sistema de enzimas lipolí-
ticas una relación EA/LA superior a 1.
30

2.- Procedimiento para la aromatización de un producto alimenticio que contenga grasas triglicéridas lipolizadas, según la reivindicación 1, caracterizado en que la grasa triglicérida comprende una grasa animal.

5 3.- Procedimiento para la aromatización de un producto alimenticio que contenga grasas triglicéridas lipolizadas, según la reivindicación 1, caracterizado en que la grasa triglicérida comprende una grasa vegetal.

10 4.- Procedimiento para la aromatización de un producto alimenticio que contenga grasas triglicéridas lipolizadas, según la reivindicación 1, caracterizado en que el producto alimenticio que contiene grasa triglicérida comprende un medio graso lácteo.

15 5.- Procedimiento para la aromatización de un producto alimenticio que contenga grasas triglicéridas lipolizadas, según la reivindicación 1, caracterizado en que si el producto alimenticio que contiene grasa triglicérida es leche la citada enzima lipolítica se añade en una proporción de 1/8 a 2 onzas aproximadamente por 1000 libras de leche para producir un acentuado aroma de queso.

20

6.- Procedimiento para la aromatización de un producto alimenticio que contenga grasas triglicéridas lipolizadas, según la reivindicación 1, caracterizado en que si el producto alimenticio es queso, se agrega al mismo, durante su fabricación, del 0,01 al 0,1 % aproximadamente en peso del citado sistema aromatizante de enzimas lipolíticas.

25

7.- Procedimiento para la aromatización de un producto alimenticio que contenga grasas triglicéridas lipolizadas, según la reivindicación 1, caracterizado en que si el producto alimenticio es aceite de manteca se pone la misma en

30

contacto con 0,005 al 0,05 % aproximadamente del citado sistema aromatizante de enzimas lipolíticas, sobre la base del peso de la grasa de manteca, y se incuba a 22 - 37° C aproximadamente, durante 1 a 3 días.

5 8.- Procedimiento para la aromatización de un producto alimenticio que contenga grasas triglicéridas lipolizadas, según la reivindicación 1, caracterizado en que si el producto alimenticio es polvo de leche integral, se pone en contacto el citado polvo de leche integral con el citado sistema aromatizante de enzimas lipolíticas en una proporción -
10 del 0,001 al 0,01 % aproximadamente sobre la base del peso - de los sólidos de la grasa de la leche integral, y se incuba a 22 - 33° C durante 4 a 8 horas, aproximadamente.

15 9.- "PROCEDIMIENTO PARA LA AROMATIZACION DE UN PRODUCTO ALIMENTICIO QUE CONTENGA GRASAS TRIGLICÉRIDAS LIPOLIZADAS".

Tal y como se deja descrito en la memoria precedente, que consta de veinticinco hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

Madrid, 3 de Abril de 1.975

D.A. de BAXTER LABORATORIES, INC

Victor Gil Vega

