

328347

P - 32.468



A 90614 Case P.C. 4638/A/B/MJW  
(SDG)

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud  
de

PATENTE DE INTRODUCCION

formulada el 24 de junio de 1.966 con el núm. 328.347

en

E S P A Ñ A

por DIEZ años

a nombre de CHAS. PFIZER & CO. INC., entidad norteamericana,  
establecida en 235 East 42nd Street, Nueva York, N. Y., Esta-  
dos Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR UNA ENZIMA PARA CUAJAR  
LA LECHE SUAVEMENTE PROTEOLITICA".

=====

5 El presente invento se refiere a una nueva y útil enzi-  
ma y a un método para su producción. Además, se refiere a  
la utilización de esta nueva enzima en un método mejorado  
para cuajar o coagular la leche. Esta enzima coaguladora de  
la leche ha resultado ser particularmente aplicable para la  
preparación de queso, que está caracterizado por excelentes  
propiedades de textura, gusto y estabilidad del sabor.

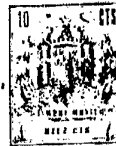


En el método clásico para fabricar queso, se ha utilizado durante muchos años el cuajo, una preparación que contiene enzima. El cuajo es añadido a la leche y la enzima, la renina, ejerce una suave acción proteolítica sobre la caseína y otras proteínas presentes. Esta descomposición de la proteína hace que los sólidos de la leche se coagulen y se dice que la leche se ha coagulado. La cuajada sólida es entonces liberada desde una suspensión predominantemente acuosa de bajo contenido en sólidos, denominada suero, y después es mezclada con sal, después se configura en bloques o piezas redondas y finalmente se cura para formar queso.

El cuajo es preparado a partir del cuarto estómago de terneras lechales. Ya que se deriva de una fuente de suministro que varía con las estaciones y en número total, el cuajo está sometido a amplias fluctuaciones de precio. Aunque el cuajo es eminentemente apropiado para su utilización en la fabricación de queso, sus antecedentes de precio y disponibilidad variables han hecho que muchos investigadores busquen un material sustitutivo.

La técnica anterior contiene muchas referencias de preparaciones de enzima vegetales y microbianas. Algunas de estas coagulan la leche totalmente de forma igualmente eficaz que la enzima presente en las preparaciones de cuajo. Sin embargo, hasta ahora se ha observado que todos los quesos hechos a partir de estas preparaciones desarrollan sabores desagradables, usualmente caracterizados como agrios o ásperos durante los procesos requeridos de envejecimiento natural, que requieren comúnmente desde aproximadamente un mes hasta aproximadamente un año. Se cree que estos sabores se desarrollan por la actividad proteolítica residual y algo fuerte de las enzimas que sustituyen a la renina.

328347



La conveniencia de liberar al fabricantes de quesos de su dependencia de una fuente de suministro animal ha activado la selección de cientos de microorganismos para determinar si alguno de ellos elabora una enzima que coagula-  
5 se la leche tan rápidamente como la renina, que tuviese un nivel de actividad de proteasa sustancialmente equivalente a la de la renina y que no contribuyese al desarrollo de un sabor agrio característico en el queso después de tiempos de curado hasta de aproximadamente un año.

10 Se ha encontrado ahora que cepas de Endothia parasitica elaboran dicha enzima deseables coaguladora de la leche suavemente proteolítica. Esta enzima puede ser utilizada en lugar de todo o parte de la resina animal en procedimientos normales de fabricación de quesos y es totalmente equi-  
15 valente a la renina en el tiempo de coagulación, en la actividad deseada de proteasa y en la ausencia de producción, de sabores desagradables y del gusto agrio en el queso durante el almacenamiento. Se hace especial mención al hecho sorprendente de que la nueva enzima de este invento ha resultado  
20 acelerar el envejecimiento del queso Cheddar, cuando se compra con la renina. Por ejemplo, algunos de los quesos Cheddar preparados con la presente enzima tienen un sabor apreciable, pero delicado y suave, con mucha consistencia después de solamente 9 meses de envejecimiento; en contraste,  
25 se requieren ordinariamente 18 meses de envejecimiento; para alcanzar el mismo estado de curado cuando se utiliza resina animal. La presente enzima puede ser utilizada ventajosamente también con renina, si se desea, proporcionando la renina la actividad de coagulación y proporcionando la presente en-  
30 zima el efecto de envejecimiento acelerado.

328347



Por ésto, un objeto principal del presente invento es crear un medio mejorado para coagular leche, cuyo medio es independiente de una fuente de suministro animal.

5 Es un nuevo objeto del presente invento crear un medio mejorado para preparar queso, independiente de una fuente animal de suministro de renina, cuyo medio proporciona queso de calidad uniforme, excelente gusto y exención del desarrollo de sabores desagradables durante el curado.

10 Otro objeto más del presente invento es crear un medio para obtener queso totalmente curado con menos consumo de tiempo que lo que ha sido negeneralmente posible hasta ahora.

15 Éstos y otros objetos fácilmente evidentes para los técnicos en la materia pueden ser logrados fácilmente por la práctica del procedimiento del presente invento que comprende en esencia: Én un procedimiento para fabricar queso que incluye la operación de preparar cuajadas o coágulos a partir de la leche, la mejora que comprende sustituir todo o parte de la renina en dicha operación por la enzima coaguladora de la  
20 leche elaborada por una cepa de Endothia parasítica.

25 El presente invento considera una enzima suavemente proteolítica, coaguladora de la leche caracterizada (a) por ser soluble en agua; (b) por ser no dializable; (c) por tener su capacidad coaguladora de la leche destruída por calentamiento a aproximadamente 60°C durante 5 minutos; (d) por tener estabilidad máxima a un pH de aproximadamente 4,5; (e) por ser precipitable a partir de una solución acuosa de la misma por sulfato de amonio y (f) por tener un punto eléctrico iónico de aproximadamente 5,5.

30 Además, se considera un procedimiento para producir

328347



dicha enzima coaguladora de la leche, suavemente proteolítica de este invento, que comprende inocular un medio que contiene fuentes de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas con un hongo de la especie Endothia parasítica,  
5 permitir que tenga lugar fermentación aerobia hasta que se produzca una cantidad sustancial de dicha enzima, y después recuperar la enzima así producida desde el medio de fermentación.

Para ayudar al público en la práctica del presente invento, en una de sus realizaciones, un cultivo de una de las  
10 cepas especialmente preferidas del microorganismo que elabora la enzima coaguladora de la leche del presente invento ha sido puesta en depósito en el American Type Culture Collection Washington, D. C. y designada ATCC 14.729. Utras  
15 cepas del organismo Endothia parasítica que pueden ser utilizadas para obtener la presente enzima y para practicar este invento pueden ser obtenibles por el público de: Central Bureau Voor Schimmelculture, Bearn, Holanda, 6 cepas designadas por Luino; Brescia; Angera III; Luino-xanthostroma; CBS 36 y CBS 54, respectivamente, y de Commonwealth  
20 Mycological Institute, Kew, Inglaterra, la cepa designada por CMI 59.815.

La cepa ATCC 14.729 del nuevo organismo después de 7 días de crecimiento sobre un medio de agar dextrosa y patata, tenía un color de superficie sustancialmente similar  
25 al amarillo de cadmio de Ridgeway; el color del reverso cromo-naranja de Ridgeway. Después de 40 días de crecimiento tanto la superficie como el reverso tenían el mismo color; entre naranja-cromo y naranja Rufus sobre la carta de colores normalizados de Ridgeway.  
30

328347



Se ha de sobreentender que en la práctica del procedimiento mejorado del presente invento no se pretende la limitación al organismo antedicho. Específicamente se desea y se pretende incluir subcultivos, mutantes naturales, derivados transformadores, variantes y similares, y mutantes  
5 producidos artificialmente a partir de los antedichos organismos por diversos medios tales como irradiación con rayos X o luz ultravioleta, tratamiento con mostazas nitrogenadas y similares.

10 El organismo es mantenido sobre patata dextrosa agar (PDA) y puede ser hecho crecer en un medio que contiene una fuente de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas. En un medio de inoculación particularmente preferido, que será descrito en los ejemplos detallados, están presentes,  
15 entre otros ingredientes, un derivado de caseína hidrolizado, extracto de levadura, almidón, hierro, zinc, manganeso, cobre, cobalto y boro en cantidades controladas.

El agente de inoculación es preparado haciendo crecer en el medio sobre un agitador rotativo a 28°C en presencia de  
20 aire durante aproximadamente 3 a 5 días durante cuyo tiempo se observa que tiene lugar un buen crecimiento. Sin embargo, tal como es evidente para los técnicos en la materia, se pueden utilizar otras técnicas y medios comunmente empleados para la preparación de dichos agentes de inoculación.

25 La enzima coaguladora de la leche del presente invento es obtenida llevando el agente de inoculación a un medio esteril que será ilustrado en detalle seguidamente. Este medio contiene fuentes de hidratos de carbono, de nitrógeno y de sales inorgánicas. Puede contener, entre otros ingredientes,  
30 harina de soja glucosa, nitratos, fosfatos, sulfatos,

328347 3 SEP



sodio, potasio y magnesio. Contiene también leche, preferiblemente en una concentración de aproximadamente 10 g./l.

5 Se prefiere, pero no es crítica, utilizar 5 % del agente de inoculación basado sobre el medio de crecimiento, y conducir la fermentación a 28°C con una circulación de aire de aproximadamente 0,5 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto, mientras que la suspensión está siendo agitada rápidamente a aproximadamente 1.7<sup>00</sup> r.p.m. Después de aproximadamente 48 horas, se encuentra que el  
10 pH que inicialmente es de 6,8 aproximadamente, ha bajado a desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 6,5, y que aproximadamente 0,5 ml del caldo de cultivo coagularán aproximadamente 5,0 ml de leche en un espacio de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 minutos.

15 Desde luego, tal como es evidente para los técnicos en la materia se pueden emplear otras técnicas y condiciones para hacer que este organismo elabore cantidades sustanciales de la presente enzima coaguladora de la leche, y las condiciones de fermentación tales como tiempo,  
20 temperatura y concentración en ion hidrógeno pueden ser hechas variar ampliamente sin apartarse del alcance del invento.

La enzima puede ser utilizada después de una concentración apropiada del caldo de cultivo sin aislamiento desde el caldo de cultivo para coagular leche en el procedimiento mejorado del presente invento. Sin embargo se  
25 prefiere, ya que se controla mejor la uniformidad de carga a carga, aislar y purificar la enzima y utilizar la preparación purificada en la operación de fabricación de queso.  
30 Para aislar la enzima, los caldos de fermentación son fil-

320347



trados y la torta de filtro es lavada con una pequeña cantidad de agua desionizada. El filtrado y los líquidos de lavado combinados son enfriados y después son secados por congelación; los sólidos aislados se encuentra que dan como análisis desde aproximadamente 1:7500 hasta 1:9700 (la significación del análisis se describe más abajo). Nueva purificación de la preparación de enzima se lleva a cabo por reconstitución de los sólidos secados por congelación en agua desionizada, después de lo cual la enzima es precipitada por la adición de aproximadamente 2 volúmenes de acetona que previamente ha sido enfriado a aproximadamente 25°C la solución en acetona - agua es decantada después, dejando detrás de sí un precipitado congelado, viscoso. El precipitado es después nuevamente suspendido en una pequeña cantidad de agua y es secado rápidamente por congelación, se repite el proceso y el residuo después del secado por congelación tiene una actividad correspondiente a aproximadamente 1:45.000.

Se puede lograr una nueva purificación disolviendo la preparación de enzima en agua y dializando frente a agua. Esto se lleva a cabo preferiblemente en un refrigerador con agua fría durante al menos aproximadamente 4 días. Los materiales no dializables son después secados por congelación y se encuentra que contiene por encima de 80 % de la actividad original; este representa al menos aproximadamente una purificación doble. El producto final está indicado por poseer una actividad correspondiente a aproximadamente 1: 100.000.

Desde luego pueden ser empleados otros métodos de recuperación, muy bien dentro de la práctica de los técnicos en la materia, por ejemplo, la enzima soluble en agua puede ser separada de la solución o filtrado salificándola añadiendo algo de sal orgánica líquida, tal como sulfato de amónico, seguidamente ilustrado, o por la adición de un no disolvente

328347



tal como etanol, en lugar de acetona, hasta una concentración suficientemente alta para producir la precipitación de la enzima.

5 Con respecto a la actividad de la preparación de enzima del presente invento, las unidades de actividad están relacionadas con la fuerza de los polvos de cuajo normalizados y son determinados por técnicos de análisis que implican ensayos de tiempo de coagulación de leche. Los métodos de ensayo son utilizados comunmente por los técnicos en la materia  
10 para determinar la fuerza de preparación de cuajo. Cuando una preparación de cuajo comercial es calificada por 1:10.000, por ejemplo, significa que 1 g coagulará 10 litros de leche dulce a 35°C en un espacio de 40 minutos. Preparaciones de cuajo están también disponibles comunmente con fuerzas de  
15 1:100.000 y de 1:7.600.000.

Datos electroforéticos para la enzima de este invento indican que tiene un punto eléctrico iónico de aproximadamente 5,5. Así en la solución de acetato de sodio 0,25 M no muestra movilidad a un pH de 5,5, y por encima del pH 5,5  
20 emigra o se desplaza hacia el ánodo. Además, con un pH 4,5 en acetato sódico 0,025 M sobre papel horizontal a 250 voltios y 8 miliamperios constantes, la presente enzima emigra o se desplaza hacia el electrodo negativo una distancia de aproximadamente 2,5 cm durante 5 horas. En contraste, la re-  
25 nina animal cristalina se desplaza solo 0,5 cm bajo las mismas condiciones.

En el procedimiento mejorado del presente invento, aplicado para fabricar queso Cheddar pueden ser empleadas las técnicas normalizadas utilizadas en la fabricación de queso  
30 sustituyendo al extracto de cuajo de fuente animal usualmente

328347



5 empleado por una cantidad sustancialmente equivalente de la preparación de enzima derivada del organismo del presente invento. No es necesario cambiar ninguna de las otras condiciones de fabricación de queso cuando se utiliza la enzima. Los quesos obtenidos por la utilización de la operación mejorada del presente invento son totalmente equivalentes en sus propiedades a los obtenidos cuando se utiliza extracto de cuajo.

10 La utilización de la preparación de enzima en la producción de queso Cheddar está ilustrada en detalle seguidamente. Este procedimiento está basado en las técnicas americanas comúnmente empleadas de fabricación de queso. Véase por ejemplo Prescott y Dunn, Industrial Microbiology, tercera edición Nueva York, McGraw-Hill Bookco. Inc., 1.959, capítulo 21, "Queso" y las referencias allí citadas. Se ha de entender, sin embargo, que el presente invento considera mejoras en la operación de coagulación de leche comunes a todos los procedimientos para fabricar quesos, en los que se han utilizado hasta ahora preparaciones de cuajo. Entre los quesos fabricados de esta manera están los denominados quesos "duros" y "blandos", y el queso de bola.

20 La calidad del queso preparado por el procedimiento mejorado del presente invento es determinada fácilmente tomando muestras a intervalos durante el curado y evaluándolas en cuanto a textura, firmeza, formación de gas y desarrollo de sabor. No se observa evidencia de actividad indeseable de proteasas en los quesos hechos por el procedimiento mejorado del presente invento. En los quesos Cheddar, el coágulo permanece firme, no muestra tendencia a volver a disolverse en el suero, y es totalmente equivalente al preparado con cuajo animal. No se observa que aparezcan sabores desagradables o

25

30

328347



acritud en el gusto del queso durante el curado; En contras-  
te cuando se utilizan preparaciones de enzimas elaboradas  
por otros microorganismos o las procedentes de fuentes vege-  
tales, se observa que la firmeza y textura del queso prepa-  
5 rado a partir de éstas desagradan y que, usualmente en un  
espacio de un mes, se han desarrollado sabores desagrada-  
bles y gustos agrios indeseables característicos de una ac-  
tividad proteolítica continuada.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos del produc-  
10 to y procedimientos del presente invento. Se ha de sobreent-  
ender que estos definen maneras en las que se puede lle-  
var a cabo el proceso mejorado pero no han de ser conside-  
rados de ninguna manera como limitativos.

Ejemplo I: Endothia parasitica, ATCC 14.729 es arras-  
15 trada por lavado desde un plano inclinado de patata-dextro-  
sa-agar, bajo condiciones estériles, dentro de un matraz  
que contiene 1 litro del siguiente medio de inoculación  
acuoso en un matraz o frasco de Fernbach de 2,8 litros  
(el medio ha sido previamente esterilizado en un autoclave  
20 durante 45 minutos a 121°C):

	<u>Por litro</u>
N-Z Amine B	5,0 g
Concentrado de proteína de soja	
25 Extracto de levadura	2,0 g
Almidón soluble	10,0 g
D-mannita	5,0 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	15,0 mg
Solución de microelemento	1,0 ml
30 Preparación de caseína hidrolizada comercial	
Preparación comercial, Soytone	

328347



Solución de microelemento: Fe /- como  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 mg/ml; Zn (como  $\text{ZnSO}_4$ ), 1,0 mg/ml; Mn (como  $\text{MnSO}_4$ ), 0,50 mg/ml; Cu (como  $\text{CuSO}_4$ ), 0,08 mg/ml; Co (como  $\text{CoSO}_4$ ), 0,10 mg/ml; B (como  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), 0,10 mg/ml.

5 Los matracas son incubados en un agitador rotatorio a 28°C durante 96 horas durante cuyo tiempo tiene lugar un considerable crecimiento.

Un medio de producción de enzima es preparado y esterilizado en proporciones de 2 litros en recipientes de fermentación de 4 litros calentado en un autoclave durante 1 hora a 121°C. El medio tiene la siguiente composición:

	<u>gramos litro</u>
Harina de soja	30,0
15 Cerelesa (glucosa)	10,0
$\text{NaN}_3$	3,0
Leche desnatada	10,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25

20 El medio tiene un pH de aproximadamente 6,8

Después de enfriar el medio de crecimiento a 28°C, se añaden 100 ml del agente de inoculación al recipiente que contiene 2.000 ml de medio de crecimiento estéril, y se lleva a cabo la fermentación a 28°C al mismo tiempo que se introduce aire a la velocidad de 0,5 volúmenes de aire por volumen de caldo de cultivo por minuto y mientras se agita el medio a 1.700 r.p.m. Después de 48 horas, se encuentra que está presente suficiente cantidad de enzima para hacer posible que 4,5 ml de caldo de cultivo coagulen 5,0 ml de leche dulce en un espacio de 3 minutos. El pH final es de aproximadamente

328347



6,0-6,5.

La enzima es aislada por filtración del caldo de cultivo a través de un embudo Buchner recubierto previamente con un auxiliar de filtración a base de diatomeas y la torta de filtro es lavada con 100 ml de agua desionizada. El agua de lavado y el filtrado combinados son secados por congelación y los sólidos secados por congelación dan un análisis de aproximadamente 1:8.000. Los sólidos secados por congelación son entonces reconstituidos en agua desionizada hasta 5 veces la concentración de caldo de cultivo originado y la solución es enfriada a 1°C. Durante el periodo de enfriamiento y en todas las operaciones subsiguientes, se hace pasar nitrógeno sobre las soluciones y sólidos para ayudar a la exclusión del oxígeno. Se añade entonces acetona, a -25°C, lentamente con agitación a la solución de enzima hasta que se haya añadido una cantidad equivalente al doble del volumen original. Hacia el final de la adición de acetona, la enzima precipitada resulta completamente congelada. La capa flotante de acetona-agua es decantada desde el recipiente dejando detrás de sí el precipitado congelado viscoso. El líquido en exceso es exprimido a partir del sólido frío apretándolo con una espátula y la enzima es secada más aún en una rápida corriente de nitrógeno. El precipitado es suspendido entonces en un volumen igual de agua, y es rápidamente secado por congelación; estos sólidos contienen el 85 % de la actividad. Una solución acuosa al 15 % (peso/volumen) de los sólidos purificados secados por congelación es preparada, enfriada a 1°C y se añade lentamente, con agitación, un volumen de acetona, enfriada a - 25°C, hasta que se añade una cantidad tal que comienza justamente la congelación del precipitado.

328347



Se requiere una cantidad de acetona aproximadamente equivalente a 1,5 volúmenes de solución original. El precipitado es dejado sedimentar y la parte flotante es decantada y a esto se añade lentamente, con agitación, un volumen de acetona fría (-25°C) equivalente a 0,75 volúmenes de la solución originalmente tomada. El precipitado que se forma es dejado sedimentar, la capa flotante es decantada, el exceso de acetona es separado tal como se describe anteriormente. Los sólidos son disueltos en un volumen igual de agua desionizada y son recuperados por secado por congelación. Los sólidos secados por congelación contienen 40 % de la actividad original y dan un análisis de aproximadamente 1:45.000. Este precipitado es disuelto en un volumen igual de agua y es dializado frente a agua corriente fría durante 5 días. El aparato de diálisis propiamente dicho es refrigerado durante este tiempo. Los materiales no dializables son entonces secados por congelación. El producto sólido tiene un valor de análisis de actividad de 1:100.000.

Se prepara un queso Cheddar sustituyendo la preparación de cuajo animal ordinariamente utilizada en la operación de curado por una cantidad equivalente de la preparación de enzima. Se ajustan la temperatura de 45°C de leche dulce pasteurizada entre 30 y 31°C y se añade 1% en peso de una solución iniciadora de ácido láctico comercial para fabricación de quesos. La mezcla es agitada durante 1 hora y entonces es ajustada a 31°C y se añaden 93 g de la preparación de enzima disueltos en 120 ml de agua desionizada y se agitan a fondo. Se interrumpe la agitación y, después de 30 minutos, se ensaya la firmeza del coágulo o cuajada insertando un instrumento despuntado y elevándolo lentamente con lo que el coágulo se rompe delante del instrumento. El coágulo

328347



es cortado en cubos de 6 mm con cuchillos para coágulos, después es agitado y después de 15 minutos es afirmado por calentamiento durante 3<sup>u</sup> minutos desde 31°C hasta 38°C. El coágulo es agitado lentamente durante el calentamiento. El

5 suero, que se separa del coágulo es escurrido 2,25 horas después de que se ha añadido la preparación de enzima. Después que el suero ha sido escurrido, el coágulo es acanalado y envasado después en capas en lonchas de aproximadamente 125 a 15<sup>u</sup> mm de ancho. Las lonchas son volteadas 5

10 veces a intervalos de 1<sup>u</sup> minutos y después son nuevamente apilados y el coágulo es molido. La temperatura del coágulo en la molienda es de 37°C. El coágulo triturado es extendido uniformemente y es tratado con 1,35 kg de sal en escamas para fabricante de queso rociada sobre la superficie. Después que la sal se ha disuelto en el coágulo, lo

15 cual requiere aproximadamente 3<sup>u</sup> minutos, el coágulo es trasladado a moldes anulares y los moldes llenos son prensados durante 3<sup>u</sup> minutos. La tela que recubre la parte exterior del molde es ajustada y entonces el queso es nuevamente colocado en la prensa y es sometido a un prensado final. Este prensado final libera la corteza de orificios y

20 de defectos superficiales y requiere aproximadamente 24 horas. El queso es secado entonces durante 4 días a 13°C y después es recubierto con parafina, es colocado en cajas y es curado con una humedad relativa de 75 % y a 7°C. La

25 muestra clínica tomada cuando el queso tiene 3 semanas está exenta de aberturas de origen mecánico y el queso está libre de sabor ácido y aspereza. Cuando el queso tiene 1 mes, posee consistencia ccrea suave y firme y está exento

30 de aberturas de origen mecánico, está exento de sabores

328347



desagradables y retiene estas propiedades hasta que está curado, cuyo proceso requiere de 6 meses a 1 año.

5 Ejemplo II: Se repite el proceso del ejemplo I, sustituyendo la E. parasítica ATCC 14.729 por la cepa de E. parasítica designada "CBS Angera III" por la Centralbureau voor Schimmelculture, Baarn, Holanda. La potencia coaguladora de leche parece ser algo superior a la de la cepa del ejemplo I. Se obtiene un queso satisfactorio.

10 Ejemplo III: Se repite el proceso, del ejemplo I, sustituyendo la E. parasítica, ATCC 14.729 por la cepa de E. parasítica designada "CBS Luino" por Central Bureau voor Schimmelculture, Baarn, Holanda. La potencia coaguladora de leche parece ser ligeramente mayor que la de la cepa del ejemplo I. Se obtiene un queso satisfactorio.

15 Ejemplo IV: Se repite el procedimiento del ejemplo I, sustituyendo la E. Parasítica, ATCC 14.729 por la cepa de E. parasítica designada "CBS Brescia" por Central Bureau voor Schimmelculture. Se obtiene un queso satisfactorio.

20 Ejemplo V: Se repite el proceso del ejemplo I sustituyendo la E. parasítica ATCC 14.729, por la cepa de E. parasítica designada "CMI nº 59.815" por Commonwealth Mycological Institute, Kew, Inglaterra. Se obtiene un queso satisfactorio.

25 Ejemplo VI.- Se repite el proceso del ejemplo I sustituyendo respectivamente la E. parasítica ATCC 14.729 por las cepas designadas 36 y 54 por Central bureau voor Schimmelculture, Baarn, Holanda. Se obtienen quesos satisfactorios.

30 Ejemplo VII.- En un proceso alternativo de aislamiento, la enzima es separada del caldo de cultivo preparado como se describe en el ejemplo I, de la siguiente manera: El caldo

328347



de cultivo es filtrado a través de un embudo Buchner recubierto previamente con un auxiliar de filtración de diatomeas y la torta de filtro es lavada con 1<sup>00</sup> ml de agua desionizada. El agua de lavado y el filtrado combinados son ajustados con HCl diluido hasta un pH de 4,5 y la solución es  
5 concentrada 15 veces en vacío a una temperatura de 35-40°C. A la solución concentrada agitada se añaden 4<sup>00</sup> en peso de cristales de sulfato de amonio anhidro. La enzima que precipita es recogida por filtración. En esta etapa es eminentemente apropiada para su utilización en la producción de  
10 queso. Después es purificada más aún dializando durante 1 día y secando por congelación los materiales no dializables. Con los sólidos secados por congelación se forma una solución al 15 % en agua y es enfriado a 0°C. Se añade entonces  
15 acetona que ha sido enfriada previamente a -15°C en una cantidad suficiente para proporcionar aproximadamente 2 volúmenes de acetona basado sobre la solución original. La enzima es depositada en forma de precipitado pegajoso y la parte flotante es decantada. Con la enzima se forma entonces una solución al 15% en agua fría y se agita en  
20 ella 5 % de carbón activado, basado sobre el volumen total que después es seprado por filtración después de 45 minutos. El filtrado, que contiene la enzima, es secado por congelación. Con los sólidos se forma una solución en  
25 agua hasta una concentración de 15 % y se enfría a 0°C. Se añade lentamente isopropanol frío (a 0°C) con agitación hasta que la solución queda opalescente. La suspensión es retirada hacia el refrigerador y mantenida hasta que la enzima cristalina se ha depositado de forma sustancialmente completa.  
34

328347



Esta enzima cristalina con actividad muy alta de  
coagulación de leche parece ser un polipéptico: Después de  
hidrólisis y nueva disolución, se identifican los siguien-  
tes aminoácidos: Acido cistéico, aspártico, treonina, seri-  
na, prolina, ácido glutámico, glicina, alanina, valina,  
isoleucina, leucina, fenilalanina, histidina, arginina,  
cistina y tirosina.

5

10

N O T A

15

Los puntos de invención propia no nueva pero no presentada  
practicada ni divulgada en España, que se presenta para que  
sean objeto de esta solicitud de Patente de Introducción  
por DIEZ años son los siguientes:

20

1º.- Un procedimiento para producir una enzima para  
cuajar la leche, suavemente proteolítica, caracterizada (a)  
por ser soluble en agua; (b) por no ser dializable; (c)  
porque su capacidad de cuajar la leche es destruída por ca-  
lentamiento a aproximadamente 60°C durante cinco minutos,  
(d) por tener estabilidad máxima a un pH de aproximadamen-  
te 4,5; (e) por ser precipitable a partir de una solución  
acuosa de la misma por sulfato de amonio; y (f) por tener  
un punto eléctrico iónico de aproximadamente 5,5, que com-  
prende inocular un medio que contiene fuentes de hidratos  
de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas con un hongo de  
la especie Endothia parasitica, permitir que tenga lugar

25

30

328347



fermentación aerobia hasta que se produzca una cantidad sustancial de dicha enzima y después recuperar la enzima así producida del medio de fermentación.

5           2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el microorganismo utilizado es la cepa Endothia parasítica ATCC 14729.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el microorganismo utilizado es la cepa Endothia parasítica CMI 59815.

10           4.- Un procedimiento para hacer queso, que incluye la operación de preparar cuajadas de leche, caracterizado por la mejora que comprende sustituir al menos parte de la renina en dicha operación por la enzima coaguladora de la leche elaborada por una cepa de Endothia parasítica.

15           5.- Un procedimiento según la reivindicación 4, en el cual el microorganismo utilizado es la cepa de Endothia parasítica ATCC 14729.

20           6.- Un procedimiento según la reivindicación 4, en el cual el microorganismo utilizado es la cepa de Endothia parasítica CMI 59815.

7.- Un procedimiento para producir una enzima para cuajar la leche suavemente proteolítica.

328347 29



Tal y como se ha descrito en la memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta memoria consta de veinte hojas escritas a máquina por una sola cara.

29 Abril 1967

12.4.67

-20-