



333190

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

formulada el 9 de Noviembre de 1966, con el número 333.190

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de MILES LABORATORIES, INC., entidad norteamericana, establecida en 1127 Myrtle Street, Elkhart, Indiana, Estados Unidos de América, por:

" UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UNA ENZIMA COAGULANTE DE LA LECHE"

=====

Esta invención se refiere a una nueva enzima coagulante de la leche, y a los procedimientos para producir la enzima y emplearla para producir queso. Más particularmente, la invención se refiere a una enzima coagulante de la leche, sustancialmente desprovista de propiedades proteolíticas, capaz de producir queso desprovisto de sabor amargo y que tiene una consistencia y una textura deseables, y a un procedimiento de producción de tal enzima por fermentación empleando el Bacillus cereus ATCC 19124 o sus mutantes.

5

10

En la técnica generalmente practicada para fabricar



queso, la leche se cuaja o coagulo para formar un requesón o cuajada, la cuajada se corta en múltiples trozos y los trozos se someten colectivamente a cocción. El suero líquido se separa de la cuajada cocida, que después se corta en bloques o
5 tacos, se comprime, y se cura durante varios meses para formar el productos de queso deseado. El agente usualmente empleado en la técnica para producir el cuajo por coagulación o cuajamiento de la leche es la renina enzimática que se encuentra en el cuajar del ternero. El cuajar o cuajo de ternero
10 es un material preparado a partir de la membrana interior del cuarto estómago de los terneros no destetados. Puede apreciarse fácilmente que, de este modo, la calidad y cantidad de cuajo o agente cuajador disponible para la fabricación de queso depende un modo directo del número y de la clase de terneros
15 se sacrifican con fines de alimentación. Esto ha hecho surgir muchos intentos de la técnica anterior para desarrollar un sustituto adecuado del cuajo de ternero. En la técnica anterior se ha sugerido que para la coagulación de la leche podrían emplearse diversas preparaciones de enzimas vegetales y micro-
20 bianas. Aun cuando se han probado varias preparaciones enzimáticas que tienen las características deseadas de coagulación de la leche, estas enzimas no son comercialmente útiles en su mayoría. Tienen una actividad proteolítica tan elevada, que tienden a disolver la cuajada de la leche que han producido.
25 También dan un sabor amargo al queso preparado a partir de la cuajada que han producido. Las enzimas microbianas de la técnica anterior tienen también la desventaja de que generalmente son de baja potencia.

Es un objeto de la presente invención proporcionar
30 una enzima coagulante de la leche, sustancialmente desprovis-



ta de propiedades proteolíticas, y capaz de producir cuajada de leche que puede emplearse para producir queso desprovisto de sabor amargo.

5 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento perfeccionado para producir una enzima coagulante de la leche.

Aún otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento perfeccionado para fabricar queso, empleando la nueva enzima coagulante de la leche.

10 Según la presente invención, se da un procedimiento para la preparación de una enzima coagulante de la leche, desprovista sustancialmente de propiedades proteolíticas, que comprende hacer fermentar, bajo condiciones aerobias sumergidas, un cultivo de Bacillus cereus ATCC 19124 o sus mutantes, en un medio que contiene fuentes de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas.

15 En la figura anexa se muestran las diferentes imágenes o espectros electroforéticos producidos por el cuajo o cuajar de ternero y la enzima de Bacillus cereus. Estos espectros indican claramente que la enzima de Bacillus cereus es estructuralmente diferente del cuajo de ternero.

20 El organismo que se usa en la presente invención se clasifica, según procedimientos muy conocidos, como Bacillus cereus. La cepa particular de Bacillus cereus útil para la producción de una nueva enzima coagulante de la leche ha sido depositada a la American Type Culture Collection, y le ha sido asignado el número de identificación ATCC 19124. Esta cepa tiene las características siguientes:

Morfológicas

30 Bastoncillos de 1'2 - 1'6 micrones (valor medio



1'3 micrones) x 2'5 - 5 micrones (valor medio 3'5 micrones)

5 Medidas hechas en cultivos de 18 horas sobre agar nutricio, secados por aire y no fijados por calor; tinte de Nigrosina. Extremos redondeados. Aisladas y en cadenas de 2 - 7 células.

Esporas de 0'5-0'75 micrones (valor medio 0'7 micrones) x 1'25-1'9 micrones (valor medio 1'5 micrones).

10 Elipsoidales, de pared delgada, subterminales. Esporangios no hinchados.

15 Gram positivas. Encapsuladas (células 18 horas en agar nutricio, teñidas por el método Anthony). Aspecto esponjoso de las células ligeramente teñidas con fucsina o safranina diluída (células 48 horas sobre agar nutricio de glucosa). Cuerpos grasos de color azul-negro con el método de Burdon (células 24 horas en agar nutricio de glucosa)

Movilidad: resultado positivo por los ensayos de gota suspendida y de agar semisólido.

20 Características de cultivo y fisiológicas

Temperatura para el desarrollo: óptima a aproximadamente 30°C, intervalo de 20°C a 45°C, negativo a 55°C (ensayos en cultivos de leche. Los ensayos se hicieron a 30°C, si no se indica otra cosa)

25 Aeróbias, facultativamente anaeróbias; crecimiento ensayado con agua con levadura de glucosa bajo cierre hermético anaerobio; pH 4'8 a las 168 horas; "pH usualmente inferior a 5'2".

Placa de gelatina: licuefacción 48 horas.

30 Placa estriada con agar de gelatina: Zona amplia de hidrólisis



a las 48 horas

Colonias en agar nutricio: grandes, irregulares, ligeramente elevadas, borde irregular, de color blanco crema.

48 horas

5 Cultivo inclinado de agar nutricio: desarrollo abundante, opacas, blandas, color blanco crema, bordes equinulados. 48 horas.

Cultivo inclinado de agar nutricio de glucosa: desarrollo ligeramente más abundante, similar al anterior. 48 horas.

10

Cultivo inclinado de agar de glucosa-nitrato: buen desarrollo pero menor que sobre agar nutricio (medio de Smith, Gordon y Clark 1952). 48 horas.

15

Caldo nutritivo: turbio, muy flocculento, cerco o anillo y cutícula, sedimento en el fondo. 48 horas

Lechada de tornasol: reducida, cuajada sólida, proteolisis

Placa de agar de leche: Zona amplia de hidrólisis de caseína (Smith, Gordon y Clark, 1952). 168 horas.

20

Cultivo inclinado de patata: abundante, húmedo, blanco, pardeamiento ligero de la patata (Smith, Gordon y Clark 1952). 168 horas.

25

Hidrato de carbono (con sales de amonio como fuente de nitrógeno; medio de Smith, Gordon y Clark 1952, lectura a 48 y 186 horas): ácido, ningún gas a partir de glucosa y glicerina; ni ácido ni gases a partir de manita, lactosa, xilosa y arabinosa.

Hidratos de carbono (con base de caldo nutritivo): ácido, ningún gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa; ni ácido ni gas a partir de manita.

30

Producido acetilmetilcarbinol.



Citratos empleados como única fuente de carbono.

Nitritos obtenidos a partir de nitratos.

Ningún gas a partir de nitratos (Smith, Gordon y Clark, 1952; 7 - 14 días).

5 Reacción de lecitinasa positiva (agar nutricio más caldo Colbeck de yema de huevo, 4:1)

Yema de huevo, positiva. 24 horas. Ensayó más intenso a 30°C.

Hemolisis positiva (agar de sangre de oveja, 24 horas a 30°C)

Amoníaco como fuente de nitrógeno: negativo. La adición de

10 aminoácidos a un medio basal de Knight y Proom permite el desarrollo; se ensayaron 14 aminoácidos.

Caldo de levadura de glucosa con 7, 10, y 15% de ClNa: desarrollo al 7% positivo a 48 horas, al 10% positivo 168 horas, al 15% negativo a 168 horas.

15 Acido polibeta-hidroxibutírico: se desarrollaron células en Caldo de levadura de glucosa en 24 horas a 30°C; se recogieron por centrifugación; se mataron por calor en presencia de ClH al 2%. El extracto en cloroformo a 45°C, se evaporó, y añadió éter frío para dar el precipitado blanco típico de PHB.

20 Almidón: no hidrolizado. Ensayos hechos en almidón soluble Fisher y almidón de patata.

La referencia de Smith, Gordon y Clark 1952 mencionada anteriormente es "Aerobic sporeforming bacteria", Depmto. 25 de Agricultura de Estados Unidos, Monografía de Agricultura Nº 16.

Ha de entenderse que el procedimiento de la presente invención no se limita exclusivamente al empleo del Bacillus cereus ATCC 19124, sino que pueden emplearse también las cepas 30 mutantes naturales y artificiales del Bacillus cereus

29 NO



ATCC 19124. Estas cepas mutantes pueden obtenerse por medio de técnicas muy conocidas, tales como la irradiación con rayos X y ultravioletas.

5 El organismo de Bacillus cereus ATCC 19124 se mantiene sobre cultivos inclinados de agar y puede desarrollarse en un caldo nutritivo o en un medio que contiene fuentes de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas. La sustancia de inoculación puede prepararse convenientemente cultivando el organismo en el medio a aproximadamente 33°C durante 24
10 horas. El material o sustancia de inoculación se lleva después a un medio estéril que contiene fuentes de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas. Hidratos de carbono ilustrativos son la lactosa, dextrosa, sólidos de la leche, salvado de trigo y similares. Fuentes de nitrógeno ilustrativas
15 son el fosfato diamónico, el extracto de levadura, las proteínas, el caseinato de sodio, y similares. Sales inorgánicas ilustrativas son el carbonato de calcio, el fosfato diamónico, el acetato de cinc y similares. Estos hidratos de carbono, fuentes de nitrógeno y sales inorgánicas son muy conocidos en
20 la técnica de la fermentación. El medio se airea después en una proporción de aproximadamente 1 volumen de aire por volumen del medio por minuto. Esta aireación proporciona el oxígeno necesario para la fermentación aerobia, así como también la agitación deseada en el medio. Puede emplearse también la
25 agitación mecánica. Esta fermentación aerobia sumergida se lleva a cabo a una temperatura de desde aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 33°C. Preferiblemente, la temperatura es desde aproximadamente 29°C hasta aproximadamente 33°C. El pH inicial del medio de fermentación es desde aproximadamente 6
30 hasta aproximadamente 7. Preferiblemente, el pH inicial es des-



de aproximadamente 6'2 hasta aproximadamente 6'4. La fermentación se lleva a cabo durante desde aproximadamente 20 horas hasta aproximadamente 75 horas, Preferiblemente, el tiempo de fermentación es desde aproximadamente 40 horas hasta aproximadamente 72 horas. Se emplean preferiblemente condiciones de presión atmosférica, pero si se desea pueden emplearse presiones superiores o inferiores a la atmosférica, sin que haya ventaja o desventaja particular alguna.

La enzima deseada coagulante de la leche de la presente invención se forma fuera de las células de cultivo, y puede recogerse en la forma líquida preferida, simplemente separando por filtración las células y conservando el filtrado. La enzima líquida resultante tiene una estabilidad de almacenamiento comparable a la del cuajo de ternero de la técnica anterior. La enzima puede recogerse en forma de polvo, si se desea, por medio de técnicas muy conocidas de recuperación de enzimas. Esta enzima en polvo también es estable durante su almacenamiento. El líquido de fermentación puede tratarse con etanol para precipitar la enzima. La enzima precipitada se lava después con etanol, y se seca por vacío a temperatura ambiente, Para precipitar la enzima pueden usarse, alternativamente, acetona u otros disolventes orgánicos. También puede emplearse el sulfato de amonio para precipitar la enzima a partir de una disolución acuosa.

Por medio de técnicas electroforéticas, se comparó el contenido de proteína y la estructura de la enzima bacteriana producida a partir del Bacillus cereus ATCC 19124 y el cuajo de ternero. Se colocaron muestras sobre geles de poliacrilamida que contenían tampón de veronal a pH 8'6 y una concentración iónica de 0'04, y se sometieron a una electroforesis a 100 vol-



5 tios y 10 miliamperios durante 18 horas a 4°C. Los geles se
trataron después con colorante Amidoblak 10B para revelar o
hacer aparecer las fracciones proteínicas. Este procedimiento
se explica con más detalle en Biochim. Biophys. Acta, 82, 188 -
191 (1964). Los espectros o imágenes electroforéticos apareci-
dos para el cuajo de ternero y para la enzima bacteriana de
Bacillus cereus ATCC 19124 se muestran en la figura anexa. Se
deduce fácilmente que la enzima bacteriana es significativa-
mente diferente, en composición, del cuajo de ternero.

10 La nueva enzima coagulante de la leche preparada se-
gún el procedimiento anteriormente explicado tiene buena acti-
vidad con respecto a la coagulación de la leche, estando tam-
bién al mismo tiempo sustancialmente desprovista de caracte-
rísticas proteolíticas. Así pues, no ataca o reblandece apre-
ciablemente a la cuajada formada durante la coagulación de la
15 leche. Esta enzima es soluble en agua, lo que facilita el mez-
clarla con la leche antes de que tenga lugar la acción coagu-
lante. Tiene también las características de perder sustancial-
mente todas sus propiedades de coagulación de la leche al ca-
lentarla a 70°C durante 20 minutos. Esta característica indi-
ca que es más resistente al calor que las enzimas microbianas
coagulantes de la leche de la técnica anterior, que pueden
perder sus propiedades coagulantes de la leche calentándolas
hasta solamente 60°C durante 5 minutos. Exhibe su máxima ac-
25 tividad coagulante de la leche a valores de pH al menos tan
bajos como 4.8. Esto es deseable porque en la técnica de fa-
bricación de queso se acostumbra, a través de un largo tiempo
de uso del cuajo de ternero, a formar la cuajada bajo condi-
ciones ácidas. La nueva enzima de esta invención puede emplear
30 se en las condiciones usuales de coagulación de la leche por



medio de cuajo de ternero, y esto la hace fácilmente adaptable a las técnicas actuales de fabricación de queso. Así pues, puede emplearse en lugar de todo el cuajo de ternero, o parte de él, en la fabricación normal de queso. Los ensayos sobre el queso también han de mostrado que el queso hecho a partir de la cuajada producida por medio de la enzima coagulante de la leche del Bacillus cereus ATCC 19124, muestra, después de un período de curado prolongado, un sabor deseable y ausencia de amargor. Esto es absolutamente único, porque las enzimas microbianas coagulantes de la leche de la técnica anterior tenían características proteolíticas, que producían amargor en el queso inmediatamente, o después de un breve período de curado. Otra propiedad que distingue a esta enzima se encuentra en el hecho de que el queso fabricado a partir de su cuajada cura mucho más rápidamente que el fabricado a partir de cuajada producida por el cuajo de ternero. Por ejemplo, el queso fabricado empleando la nueva enzima de Bacillus cereus ATCC 19124 produjo, en seis meses, resultados de curado comparables a los resultantes en queso producido con cuajo de ternero que había curado durante un año. Esta es una característica importante desde el punto de vista comercial. En la manipulación del queso durante su curado está implicada una considerable cantidad de mano de obra. Por tanto, cualquier reducción en el tiempo de curado no sólo reduce los costes de almacenamiento, sino que reduce también los costes globales de mano de obra reduciendo así sustancialmente el coste global de la producción de queso.

La enzima coagulante de la leche producida por el procedimiento de la presente invención se sometió a ensayo para determinar su actividad coagulante de la leche de la siguiente



te manera. Se prepara una disolución acuosa al 10% (en peso/volumen) disolviendo en agua la cantidad apropiada de sólidos secos de leche no grasos. A esta disolución se le añade después $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hasta producir una concentración 0'01 M de calcio.

5 Una porción de 0'5 ml. de la enzima diluída en agua se mantiene a 35°C en un tubo de ensayo al que se añaden 5 ml. de la disolución láctea anterior. La concentración de la enzima se elige de modo que el tiempo de coagulación esté entre aproximadamente 1 y 2 minutos. Se agita la disolución de enzima-leche y se mide el tiempo transcurrido hasta la formación del primer coágulo. La actividad de la enzima se calcula como sigue:

10

$$\text{Unidades Soxhlet} = \frac{M \text{ (ml)}}{E \text{ (mg)}} \times \frac{2400 \text{ (seg.)}}{T \text{ (seg.)}}$$

15

M = volumen de leche

E = peso de enzima

T = tiempo hasta formarse el primer coágulo

20

La actividad de la enzima se expresa después en términos de unidades Soxhlet (SU) por gramo. Cuando el volumen de la enzima se expresa en mililitros, se emplea en la fórmula anterior el volumen E apropiado, y la actividad de la enzima se expresa en unidades Soxhlet por mililitro.

25

La actividad coagulante de la leche de esta nueva enzima puede aumentarse por medio de la presencia en la disolución de enzima-leche de una concentración de calcio de al menos aproximadamente 0'01 M. Este contenido de calcio puede obtenerse convenientemente por adición de sales solubles en agua, tales como el cloruro de calcio. No parece haber ninguna ventaja sustancial en emplear una concentración de calcio superior

30



a aproximadamente 0'015 M.

La invención se describe con más detalle en los ejemplos siguientes.

EJEMPLO 1

5 Se cultivó Bacillus cereus ATCC 19124 durante 24 horas a 33°C en un medio acuoso que contenía los siguientes constituyentes, siendo los valores de los tantos por ciento en peso/volumen:

	Lactosa	----	2'5%
10	Dextrosa	----	7'5%
	Sólidos de leche	----	5'0%
	Salvado de trigo molido		5'0%
	CO ₃ Ca	----	1'0%
	PO ₄ H(NH ₄) ₂	----	0'5%
15	Acetato de cinc	----	0'0067%

La sustancia de inoculación resultante se llevó después a un aparato de fermentación de 5 litros, equipado con un agitador mecánico y un aireador. El aparato de fermentación contenía 3 litros de un medio estéril que tenía la anterior composición.

20 La fermentación se llevó a cabo con agitación durante 72 horas a 25°C. El pH inicial era de 6'6, y la velocidad de aireación era de 3 litros de aire por minuto (1 volumen de aire por volumen del medio por minuto). El líquido de fermentación se separó por filtración de las células de cultivo, y se comprobó

25 por ensayo que contenía una actividad enzimática de 6.000 unidades Soxhlet por ml.

La enzima preparada anteriormente se empleó después para fabricar queso. A una cuba de queso se añadió una cantidad de 108 kilogramos de leche intefral, y se calentó a 31°C.

30 Después se añadió a la leche una cantidad de 1'12 kg. de cul-



tivo iniciador láctico. También se añadió una cantidad de 23 g. de Cl_2Ca anhidro para dar una concentración de calcio de 0'00193 M. Una hora después se añadió a una cuba de queso una cantidad de la enzima anteriormente preparada que contenía una potencia enzimática total de 700000 unidades Soxhlet. La leche coaguló, y se preparó en 18 minutos una cuajada satisfactoria. Después se cortó en la forma deseada y se coció a 39°C en 70 minutos. El suero se decantó y se llevaron a cabo las operaciones usuales de prensado, amasado, salificación y moldeado para obtener un queso fresco. Se preparó un queso de control al mismo tiempo empleando un cuajo de ternero con una potencia total de 700.000 unidades Soxhlet en lugar de la enzima bacteriana antes descrita. Se comprobó que la calidad de corte de la cuajada y la textura del queso fresco preparado a partir de la enzima bacteriana eran comparables con las del preparado a partir de cuajo de ternero. Los quesos se maduraron a 7°C y una humedad relativa del 90% durante seis meses. La evaluación de las características organolépticas, tales como el olor, sabor, fractura y similares indicaron que el queso preparado a partir de la enzima bacteriana tenía excelente sabor y textura y estaba completamente desprovisto de amargor alguno. También el procedimiento de maduración fue notablemente más rápido que el del queso preparado a partir de cuajo de ternero. Los quesos preparados a partir de la enzima bacteriana y de cuajo de ternero se analizaron además, con los siguientes resultados:

<u>Características del queso</u>				
<u>Enzima</u>	<u>% de grasa</u>	<u>% de humedad</u>	<u>% de sal</u>	<u>% de proteína en el suero</u>
Bacteriana	34'0	38'52	1'61	1'109
Cuajo de ternero	33'5	37'16	1'44	0'948



Los datos anteriores indican que la enzima bacteriana preparada a partir del Bacillus cereus ATCC 19124 puede emplearse para preparar queso con el contenido deseado de grasa, humedad y sal. La enzima bacteriana también tiene baja actividad proteolítica, comparable a la del cuajo de ternero, como indica el bajo contenido de proteínas del suero.

EJEMPLO 2

Se empleó también para fabricar queso enzima bacteriana preparada como se explica en el Ejemplo 1 anterior. La enzima bacteriana tenía una potencia total de 700.000 unidades Soxhlet. Durante la operación de coagulación de la leche, la leche contenía 0'0126 M de calcio en forma de $Cl_2Ca.2H_2O$. Una parte de la enzima bacteriana se mezcló con cuajo de ternero en la relación de 500.000 unidades Soxhlet de enzimas bacterianas: 200.000 unidades Soxhlet de cuajo de ternero, y la mezcla resultante se empleó para fabricar queso. Esta mezcla de enzimas tenía una potencia total de 700.000 unidades Soxhlet. Durante la operación de coagulación de la leche con la mezcla de enzimas, la leche contenía 0'0063 M de calcio en forma de $Cl_2Ca.2H_2O$. Se preparó también un queso de control empleando cuajo de ternero sólo. No se añadió calcio durante este experimento, y el cuajo de ternero tenía una potencia total de 700.000 unidades Soxhlet. Los resultados se muestran a continuación.

Enzima	<u>Características del queso</u>			Rendimiento (Kg. por 240 kg. de leche)
	% de grasa	% de humedad	% de sólidos en el suero	
Bacteriana	33'0	37'66	7'62	24'0
Mezcla	33'0	38'65	7'52	24'5
Cuajo de ternero	33'0	37'51	7'63	24'0



Los datos anteriores indican que la enzima bacteriana preparada a partir de Bacillus cereus ATCC 19124, y las mezclas de esta enzima bacteriana con cuajo de ternero, pueden emplearse para preparar queso con el contenido deseado de grasa y de humedad. La baja actividad proteolítica de la enzima bacteriana se demuestra por el bajo contenido de sólidos del suero. El rendimiento global en queso es también elevado. Todos los quesos resultantes estaban desprovistos de amargor y tenían la consistencia y textura deseadas.

10 EJEMPLO 3

Se cultivó Bacillus cereus ATCC 19124 durante 24 horas a 33°C en un medio acuoso que contenía los siguientes constituyentes, de los que los tantos por ciento son en peso/volumen:

15	Lactosa	...	3'3%
	Dextrosa	...	6'7%
	Sólidos de leche	...	10'0%
	Extractos de levadura	...	0'5%
	CO ₃ Ca	...	0'5%
20	PO ₄ N(NH ₄) ₂	...	0'05%
	Acetato de cinc	...	0'0067%

La sustancia de inoculación resultante se transfirió después a un aparato de fermentación de 5 litros, equipado con un agitador mecánico y un aireador. El aparato de fermentación contenía 3 litros de un medio estéril que tenía la composición anterior. La fermentación se llevó a cabo con agitación durante 66 horas a 32°C. El pH inicial era de 6'5 y la velocidad de aireación era de 3 litros de aire por minuto (1 volumen de aire por volumen del medio por minuto). Después, el líquido de fermentación se separó de las células de cultivo



por filtración, y se determinó que tenía una actividad de enzima bacteriana de 2.667 unidades Soxhlet/ml. El pH del líquido de fermentación filtrado se ajustó a 6'6. A 1 litro del líquido se añadió lentamente etanol frío de 95%. Se empezó a formar un precipitado después de la adición de aproximadamente 1 litro de alcohol. Se añadió medio litro más de alcohol, y después se dejó sedimentar el precipitado. El líquido transparente que sobrenadaba se decantó. El precipitado se recogió y se lavó en 1 litro de etanol de 95% con agitación lenta. El precipitado se recogió por centrifugación, se lavó con etanol absoluto y se secó por vacío durante toda la noche a temperatura ambiente. La enzima bacteriana en polvo resultante, que tiene una potencia de 127.000 unidades Soxhlet por gramo, puede emplearse para fabricar queso.

15

EJEMPLO 4

Se cultivó Bacillus cereus ATCC 19124 durante 24 horas a 33°C en un medio acuoso que contenía los constituyentes siguientes, cuyos tantos por ciento son en peso/volumen:

	Lactosa	...	12%
20	Sólidos de leche	...	10%
	Extracto de levadura		0'25%
	CO ₃ Ca	...	0'5%
	PO ₄ H(NH ₄) ₂	...	0'05%

La sustancia de inoculación resultante se llevó después a un aparato de fermentación de 15 litros equipado con un agitador mecánico y un aireador. El aparato de fermentación contenía 10 litros de un medio estéril que tenía la anterior composición. La fermentación se llevó a cabo con agitación durante 48 horas a 32°C - 33°C. El pH inicial era de aproximadamente 6'3, y la velocidad de aireación era de 1 volumen de aire

30



5 por volumen de medio por minuto. El líquido de fermentación se separó después por filtración de las células de cultivo, y se determinó que tenía una actividad de enzima bacteriana de 4.137'75 unidades Soxhlet/ml. Después se precipitó la enzima con tres volúmenes de etanol del 95%, y se secó bajo vacío. Se obtuvo una producción de 18'54 g. de polvo seco por litro de líquido filtrado. Se comprobó que el polvo tenía 184.620 unidades Soxhlet/g. Esta enzima en polvo puede emplearse para fabricar queso según los métodos antes explicados.

10 En resumen, esta invención se refiere a una nueva enzima coagulante de la leche, a un procedimiento para producir esta enzima a partir de Bacillus cereus ATCC 19124 y sus mutantes, y a un procedimiento para fabricar queso utilizando la nueva enzima.

15 La presente solicitud que corresponde a la presenta en Estados Unidos de América, con fecha 10 de Noviembre de 1965, bajo el número 507.192 se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

20 N O T A

25 Los puntos de Invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de Patente de Invención en España por Veinte años, son los siguientes:

1º.- Un procedimiento para la producción de una



5 enzima coagulante de la leche, que comprende hacer fermentar, bajo condiciones aeróbicas sumergidas, un cultivo de Bacillus cereus ATCC 19124 o sus cepas mutantes, en un medio que contiene fuentes de hidratos de carbono, de nitrógeno y de sales inorgánicas.

10 2º.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fermentación tiene lugar a desde aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 33°C, y a un pH inicial de desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 7, durante desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 75 horas.

15 3º.- Un procedimiento de fabricación de queso, que incluye la operación de preparar cuajadas a partir de leche poniendo en contacto la leche con una enzima coagulante de la leche, que comprenden emplear, como enzima coagulante de la leche, la enzima preparada por el procedimiento de la reivindicación 1.

20 4º.- Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que la enzima coagulante de la leche se obtiene a partir del Bacillus cereus ATCC 19124 o sus cepas mutantes.

25 5º.- Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que la enzima coagulante de la leche se prepara haciendo fermentar, bajo condiciones aeróbicas sumergidas, un cultivo de Bacillus cereus ATCC 19124 o sus cepas mutantes en un medio que contiene fuentes de hidratos de carbono, de nitrógeno y de sales inorgánicas.

6º.- Un procedimiento para la producción de una enzima coagulante de la leche.

30 Tal y como se ha descrito en la memoria que antecede, representado en el dibujo que se acompaña y para los fines que se han especificado.



Esta Memoria consta de diecinueve hojas escritas
a máquina por una sola cara.

17 JUL 1967

Madrid,

P.A.

Alberto de Ezábir
F. P. P.

PSO/.

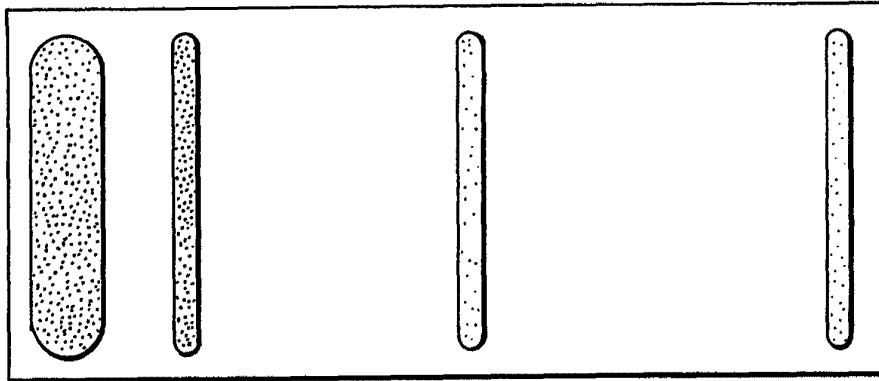
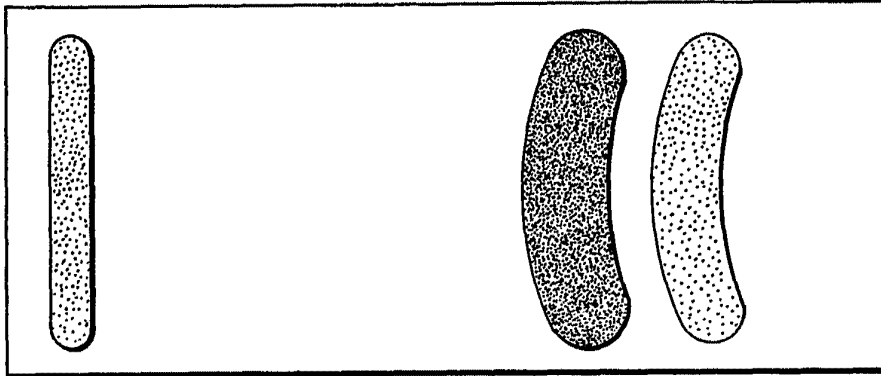
333100



28 NOV 1950

-

+



Alberto de Elizalde
P. 1000